

Aus der Medizinischen Klinik mit Schwerpunkt Nephrologie und Internistische  
Intensivmedizin CVK und  
dem Institut für Medizinische Immunologie CCM  
der Medizinischen Fakultät Charité – Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

**Standardisiertes Immunmonitoring  
in der Frühphase nach  
Nierentransplantation zur  
pharmakodynamischen Erkennung einer  
Über- oder Untersuppression**

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

vorgelegt der Medizinischen Fakultät  
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Gantuja Bold

aus Ulan-Bator, Mongolei

Gutachter: 1. Prof. Dr. med. Petra Reinke  
2. Prof. Dr. med. Dr. h.c. U. Heemann  
3. Prof. Dr. med. W. Schareck

Datum der Promotion: 24.01.2008

## ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
Abb.	Abbildung
Ak	Antikörper
ALG	Antilymphozytenglobulin
APAAP	Alkalische Phosphatase Anti-Alkalische Phosphatase
APC	Antigen-präsentierende Zelle
ATN	akute tubuläre Nekrose
ATG	Antithymozytenglobulin
BSA	bovines Serumalbumin
B-Zelle	B-Lymphozyt
bzw.	beziehungsweise
ca.	circa
CD	Cluster of Differentiation, Differenzierungsantigene
CMV	Zytomegalievirus
ConA	Concanavalin A
CTL	zytotoxische T-Lymphozyten
CyA	Cyclosporin A
DACH	Deutsche Akkreditierungsstelle Chemie
DGF	delayed graft function
d.h.	das heißt
DNA	desoxyribonucleid acid, Desoxyribonukleinsäure
DTH	Delayed Graft Function
ECP	Eosinophiles Kationisches Protein
EBV	Epstein-Barr-Virus
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
ELISA	Enzyme linked immunoabsorbent assay
et al.	und Mitarbeiter
FACS	Fluorescent Activated Cell Sorter
Fc	Fragment crystallizable, kristallisierbares Fragment von Antikörpern nach enzymatischer Spaltung
FCS	Fetal Calf Serum, fötales Kälberserum
FITC	Fluoresceinisothiocyanat

FK506	Tacrolimus, Prograf®
ggfs.	gegebenenfalls
GFR	glomeruläre Filtrationsrate
GM-CSF	Granulocyte Macrophage-Colony Stimulating Factor
Gpt/l	Gigapartikel/Liter
HLA	Human Leucocyte Antigen, humanes Leukozyten-Antigen
HWI	Harnwegsinfektion
ICAM-1	Intracellular Adhesion Molecule-1, CD54
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
IFN	Interferon
i.v.	intravenös
kDa	kilo Dalton
KG	Körpergewicht
LBP	Lipopolysaccharide-Binding-Protein
LFA-3	Lymphocyte Function-Associated antigen-3, CD58
LPS	Lipopolysaccharid
mAb	monoklonale Antikörper
mg	Milligramm
MHC	Major Histocompatibility Complex, Haupthistokompatibilitätskomplex
min	Minute
ml	Milliliter
MMF	Mycophenolatmofetil
MPA	mycophenolic acid
mRNA	messenger RNA, Boten-RNA
ng	Nanogramm
NF-AT	nuclear factor for activated T-cells
NF-κB	nuclear factor κB, Kernfaktor κB
NK-Zellen	natürliche Killerzellen
o.g.	obengenannt
PBMC	periphthal blood mononuclear cells, Mononukleäre Zellen aus Peripheralblut
PBS	Phosphat gepufferte Saline

RT-PCR	Real-time polymerase change reaction
PE	Phycoerythrin
PerCP	Peridinin chlorophyll protein
pg	pikogramm
PRA	panel reactive antibodies, panel reaktive Antikörper
PTLD	posttransplantation lymphoproliferative disease
RNA	ribonucleic acid, Ribonukleinsäure
RPMI	Zellkulturmedium
Rx	Rejektion, Abstoßung
SEM	standard error of mean
sIL-2R	soluble Interleukin 2 receptor, löslicher Interleukin 2-Rezeptor
Tab.	Tabelle
TCR	T cell receptor, T-Zell-Rezeptor
TGF	tumor growth factor, Tumor-Wachstumsfaktor
Th-Zellen	T-Helfer-Lymphozyten
TNF	Tumor Nekrose Faktor
T-Zelle	T-Lymphozyt
Tx	Transplantation
U	Unit
vs.	versus
z.B.	zum Beispiel

# INHALTSVERZEICHNIS

<b>ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS .....</b>	<b>3</b>
<b>1 EINLEITUNG.....</b>	<b>8</b>
<b>2 PROBLEMSTELLUNG .....</b>	<b>11</b>
<b>3 THEORETISCHER HINTERGRUND .....</b>	<b>12</b>
<b>3.1 Akute Abstoßung nach Nierentransplantation .....</b>	<b>12</b>
3.1.1 Klinik und Diagnostik akuter Abstoßungen.....	12
3.1.2 Immunologische Grundlagen der akuten Abstoßung.....	13
<b>3.2 Infektionen nach der Transplantation .....</b>	<b>17</b>
3.2.1 Zytomegalievirusinfektion (CMV) nach Nierentransplantation.....	17
3.2.2 Immundepression und Sepsis in der Transplantation.....	18
<b>3.3 Immunsuppression.....</b>	<b>20</b>
3.3.1 Basistherapie .....	20
3.3.2 Induktionstherapie.....	23
<b>3.4 Zytokine in der Transplantation und in der Abstoßung .....</b>	<b>28</b>
3.4.1 Proinflammatorische Zytokine.....	29
3.4.2 Antiinflammatorische Zytokine .....	32
3.4.3 T-Zell-Zytokine (Lymphokine).....	32
3.4.4 Interleukin-2-Rezeptor .....	35
<b>4 IMMUNSUPPRESSIONSPROTOKOLLE .....</b>	<b>36</b>
<b>5 PATIENTEN .....</b>	<b>38</b>
<b>5.1 Demographische und Transplantat-Daten .....</b>	<b>38</b>
<b>5.2 Probenentnahme/Dokumentation und Beurteilung des klinischen Verlaufs.....</b>	<b>40</b>
<b>6 METHODEN.....</b>	<b>42</b>
<b>6.1 Materialien .....</b>	<b>42</b>
6.1.1 Chemikalien und Materialien für die <i>in vitro</i> Stimulationsteste.....	42
6.1.2 Chemikalien und Materialien für die durchflußzytometrische Bestimmung .....	42
6.1.3 Enzymimmunoassays.....	43
<b>6.2 Meß- und Arbeitsgeräte / Software .....</b>	<b>43</b>
<b>6.3 Methodik.....</b>	<b>44</b>
6.3.1 Bestimmung der löslichen Mediatoren und Zytokine im Plasma und Urin .....	44
6.3.2 LPS-stimulierte Monokinfreisetzung im Vollblut.....	44
6.3.3 ConA-induzierte Lymphokinfreisetzung im Vollblut .....	44
6.3.4 Fluozytometrische Quantifizierung von HLA-DR und CD86-Expression auf Monozyten .....	45
6.3.5 Leukozytenzählung und Differentialblutbild .....	46
<b>6.4 Statistische Auswertung .....</b>	<b>47</b>
<b>7 ERGEBNISSE.....</b>	<b>48</b>

<b>7.1</b>	<b>Vergleich zwischen ATG- und Basiliximab-Induktionsgruppe .....</b>	<b>48</b>
7.1.1	Vergleich von klinischen Daten .....	48
7.1.2	Ergebnisse der <i>in vitro</i> Funktionsteste .....	52
<b>7.2</b>	<b>Vergleich zwischen den Patienten mit Abstoßung (Rx) und mit stabiler Funktion (non Rx) .....</b>	<b>65</b>
7.2.1	LPS-stimulierte Zytokinfreisetzung .....	65
7.2.2	ConA-induzierte T-Zell-Zytokinfreisetzung .....	69
7.2.3	HLA-DR- und CD86-Expression auf Monozyten .....	73
7.2.4	Analyse der Zytokine im Urin .....	75
<b>7.3</b>	<b>Patienten mit Abstoßung (Rx-Gruppe) .....</b>	<b>76</b>
7.3.1	Monozytenfunktion .....	76
7.3.2	T-Zell-Zytokine .....	78
<b>8</b>	<b>DISKUSSION .....</b>	<b>79</b>
<b>9</b>	<b>ZUSAMMENFASSUNG .....</b>	<b>88</b>
<b>10</b>	<b>LITERATURVERZEICHNIS .....</b>	<b>90</b>
<b>11</b>	<b>ANHANG .....</b>	<b>100</b>

# 1 Einleitung

Die Organtransplantation hat sich zur Therapie der Wahl bei irreversiblen Funktionsverlust von Organen wie Niere, Leber, Herz etc. entwickelt. Das Verständnis von Regulationsprinzipien und der Komplexität des Immunsystems hat es ermöglicht, neuere immunsuppressive Medikamente zu entwickeln. Durch den Einsatz dieser modernen Immunsuppressiva wurde die Inzidenz von akuten Transplantatabstoßungen reduziert. Die 1-Jahres-Transplantatüberlebensrate nach einer Nierentransplantation beträgt je nach Zentrum 85-95%<sup>1</sup>. Trotz der Erfolge in der Entwicklung der Immunsuppressiva bleibt das Verhältnis von Risiko für eine Abstoßung zu Risiko für eine Infektion nach der Transplantation ein insbesondere in der Frühphase wichtiges klinisches Problem. Akute Abstoßungen stellen einen signifikanten Risikofaktor für die Entstehung einer chronischen Abstoßung dar, die als eine der wichtigsten Ursachen für den langfristigen Transplantatverlust betrachtet wird.

Im klinischen Alltag der Transplantation werden Immunsuppressiva i.a. nach dem Prinzip „one size fits all“ verabreicht. Es ist allgemein bekannt, dass sowohl unterschiedliche individuelle immunologische und nichtimmunologische Faktoren sowie individuelle Unterschiede in der Absorption, Metabolisierung und Ausscheidung der immunsuppressiven Medikamente die Wirksamkeit der Immunsuppression beeinflussen. Zurzeit wird die Dosierung der Immunsuppressiva in der Klinik nach folgenden Parametern gemessen: Körpergewicht, Auftreten von Nebenwirkungen und Blutspiegelmessung. Die Therapie mit Immunsuppressiva, wie Cyclosporin A oder Tacrolimus (FK506), bedarf einer engmaschigen Kontrolle des Blutspiegels. Jedoch korrelieren diese pharmakokinetischen Parameter nur bedingt mit dem immunologischen oder toxischen Wirkungsprofil im individuellen Patienten. So kann es sein, dass die Blutspiegel der Immunsuppression laut Schema für einen Patienten exakt eingestellt sind, während ein anderer Patient bei gleichen Blutspiegeln untersupprimiert ist, mit der entsprechenden Komplikation einer akuten Abstoßung, oder übersupprimiert, mit einem erhöhten Infektions- und Nebenwirkungsrisiko. Deshalb ist die Individualisierung einer immunsuppressiven Therapie sehr wichtig. Pharmakodynamische Tests und Methoden, die die funktionelle Wirkung von Immunsuppressiva auf die Immunantwort bestimmen, könnten für die individuelle Optimierung einer immunsuppressiven Therapie aussagekräftiger sein als pharmakokinetische Parameter.

Ein pharmakodynamisches Monitoring immunsuppressiver Medikamente verlangt das Monitoring entsprechender immunologischer Parameter. Das Immunmonitoring sollte einen prädiktiven Wert haben in dem Sinne, dass es das Risiko einer akuten Abstoßung bzw. einer

Infektion aufgrund falscher Dosierung vor deren klinischen Manifestation erkennt. Somit könnte man durch Dosisanpassung eingreifen, bevor sich klinische und pathologische Veränderungen im Transplantat manifestieren.

In der Vergangenheit wurden unterschiedliche immunologische Parameter für pharmakodynamische Untersuchungen und zur Abstoßungsdiagnostik entwickelt: Nachweis aktivierter T-Lymphozyten mittels Durchflußzytometrie im peripheren Blut, Zytokinnachweis in Serum, Urin und Überstand von Zellkulturen, Nachweis löslicher Membranstrukturen, Bestimmung der Frequenz von alloreaktiven T-Lymphozyten.

Zytokine spielen eine wichtige Rolle in der Regulation von Abstoßungsreaktionen. Sie werden von den Zellen im Allgemeinen nur temporär für wenige Stunden nach entsprechender Stimulation produziert und haben eine Halbwertszeit im Minutenbereich. Daraus resultiert eine limitierte Nachweisbarkeit der Zytokine, die eine zuverlässige Quantifizierung im Plasma mittels ELISA schwierig macht. Außerdem lassen sich schwer differentialdiagnostische Schlüsse ziehen, da bakterielle, fungale und virale Infektionen zu ähnlichen Effekten führen. Zudem spiegeln die systemischen Zytokinspiegel nicht unbedingt die lokalen immunologischen Prozesse im Transplantat wider. Von vielen Arbeitsgruppen wurden Zytokinspiegel im Plasma gemessen, die widersprüchlichen Ergebnisse zeigten. Die Zytokinbestimmung im Urin scheint mehr valide Aussagen zu bringen. Jedoch sind die Berichte zur diagnostischen Wertigkeit von Zytokinbestimmungen im Plasma und Urin sehr widersprüchlich. Dies hängt u.a. mit der Problematik der unterschiedlichen Verdünnung in diesen Kompartimenten und als auch mit der schlechten Stabilität der Zytokine zusammen. Man findet aber bei der Vielzahl von Arbeiten, die sich mit der Wertigkeit von Zytokinen als Immunmonitoringsparameter beschäftigten, keinen übereinstimmenden Marker, der eine klare Korrelation zur akuten Abstoßung in allen Studien zeigte. Dies ist einerseits auf die Heterogenität des Ausgangsmaterials, andererseits auf zahlreiche Faktoren wie Zeit der Entnahme, unterschiedliche Therapien usw., aber auch auf große methodische Unterschiede zurückzuführen. Ringversuche haben gezeigt, dass die Reproduzierbarkeit der Teste oft nicht zufrieden stellend ist. Deshalb wäre die Standardisierung der verschiedenen Methoden zur Zytokinbestimmung notwendig, um die Ergebnisse unter den Arbeitsgruppen vergleichen zu können.

Wir denken, dass ein Immunmonitoring schon aus Kostengründen weniger für eine Abstoßungsdiagnostik als für pharmakodynamische Untersuchungen zur Optimierung der individuellen Immunsuppression geeignet ist. Das Ziel dieser Studie war es daher, standardisierte Immunmonitoringsparameter für die Erkennung einer Unterimmunsuppression

mit einem potentiellen Rejektionsrisiko bzw. Überimmunsuppression zu evaluieren, die eine individuelle und effektivere Immunsuppression ermöglichen würden. Ein weiterer wichtiger Risikofaktor für die Entwicklung akuter Abstoßungen ist die Qualität der Organe. Spenderfaktoren wie Alter, Hochdruck, Ischämie-/Reperfusionsschaden, Hirntod etc. bestimmen vermutlich die Immunogenität von Transplantaten. Der zunehmende Einsatz sogenannter marginaler Organe verstärkt dieses Problem. Jedoch mangelt es an objektiven Tests, um die individuelle Qualität des Organs zu bestimmen. Ein präoperatives „Entzündungsmonitoring“ könnte hier einen Beitrag leisten.

Zu diesem Zweck wurden bei uns entwickelte, standardisierte und akkreditierte (DACH) Tests eingesetzt zur:

- Messung der perioperativen Entzündungsreaktion
  - IL-8, TNF- $\alpha$ , IL-6 und sIL-2R im Urin und Plasma mittels semiautomatisierter ELISA
- Erfassung der Monozytenfunktion
  - CD86- und HLA-DR-Expression mittels Durchflußzytometrie
  - LPS-induzierte TNF- $\alpha$ -, IL-1 $\beta$ - und IL-10-Sekretion mittels semiautomatisierter ELISA
- Erfassung der T-Lymphozytenfunktion
  - ConA-induzierte Sekretion von IFN- $\gamma$ , IL-2 und IL-4 mittels ELISA.

## 2 Problemstellung

### Hypothesen

Bei der Evaluierung des neuen standardisierten Immunmonitoringprogramms zur individuellen Messung von „Unter- bzw. Übersuppression“ haben wir uns auf folgende Hypothesen gestützt:

- Untersuppression, d.h. hohe Inzidenz von Rejektionen, ist assoziiert mit einer relativ starken proinflammatorischen Antwort (TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ ) und Typ 1-Antwort (IL-2, IFN- $\gamma$ ). Rejektionen geht ein Anstieg inflammatorischer Marker in Plasma und Urin voraus.
- Übersuppression, d.h. hohe Inzidenz von Infektionen, ist assoziiert mit einer stark verminderten proinflammatorischen Antwort (TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ ) und/oder starken antiinflammatorischen Antwort (IL-10) bzw. mit einer stark verminderten Typ 1-Antwort (IL-2, IFN- $\gamma$ ) und/oder starken Typ 2-Antwort (IL-4). Außerdem spricht eine Abnahme der HLA-DR- und CD86-Expression auf Monozyten für eine Übersuppression.

Daraus leiten sich folgende Fragestellungen ab:

1. Welche Unterschiede bestehen zwischen den Patienten mit unterschiedlichen Induktionstherapien hinsichtlich der immunologischen Parameter?
2. Wie unterscheidet sich die Zytokinproduktionskapazität bei Nierentransplantierten und normalen Kontrollprobanden?
3. Welche Parameter eignen sich als Risikomarker für das Auftreten einer akuten Abstoßung?
4. Besteht eine Korrelation zwischen den gemessenen immunologischen Parametern und dem 1-Jahres-Kreatininwert bei den Transplantierten? Eignet sich einer der Parameter als prognostischer Marker für die 1-Jahres-Transplantatfunktion?
5. Ist die Zytokinbestimmung im Urin als nichtinvasive diagnostische Methode geeignet, Aussagen zur Immunogenität eines Organs und damit eine Voraussagbarkeit von akuten Abstoßungen zu treffen?

## 3 Theoretischer Hintergrund

### 3.1 Akute Abstoßung nach Nierentransplantation

Die akute Abstoßung ist die häufigste Komplikation in der Frühphase nach einer Nierentransplantation. Sie stellt einen signifikanten Risikofaktor für die Entstehung einer chronischen Abstoßung dar<sup>2-5</sup>, die wiederum als eine der wichtigsten Ursachen für einen Transplantatverlust betrachtet wird<sup>6,7</sup>.

Die meisten akuten Rejektionsepisoden treten bereits in den ersten Tagen bis Wochen nach der Transplantation auf. Akute Abstoßungsreaktionen können sich aber auch im späteren Verlauf Jahre nach Transplantation entwickeln. Im Gegensatz zu akuten Abstoßungen der Frühphase zeichnen sich späte akute Abstoßungen durch einen protrahierten Verlauf, eine mildere Symptomatik und ein schlechteres Ansprechen auf eine Abstoßungstherapie aus. Darüber hinaus sind späte akute Abstoßungen prognoserelevant, d. h. korrelieren mit einer hohen Inzidenz mit chronischen Abstoßungen, Funktionsverlusten und verkürzten Langzeittransplantatfunktionsraten<sup>8-10</sup>. Die Erfolgsrate einer Abstoßungstherapie beträgt in der Frühphase über 90% und liegt in der Spätphase nur bei 55-75%.

#### 3.1.1 Klinik und Diagnostik akuter Abstoßungen

Als klassische klinische Symptome einer akuten Rejektion gelten Fieber, Kreatininanstieg, Transplantatschwellung und Oligurie. Seit der Einführung der modernen immunsuppressiven Medikamente ist es nicht immer einfach, die Diagnose der akuten Abstoßung zu stellen, weil es bei den Patienten zur Abschwächung dieser klinischen Zeichen kommt. Deshalb ist für die Sicherung einer korrekten Diagnose und zur Abgrenzung gegenüber anderen transplantatschädigenden Prozessen eine histologische Beurteilung des Gewebes durch die Transplantatbiopsie notwendig.

Im Verlaufe einer akuten Abstoßung kommt es zur Entstehung eines interstitiellen Ödems und einer Schädigung der Gefäße und Tubuli durch infiltrierende Zellen. Ausgeprägte zelluläre Infiltrate durch mononukleäre Zellen des Empfängers (T- und B-Lymphozyten, natürliche Killerzellen, Granulozyten, Makrophagen und einige immunologisch unspezifische Zellen), ödematöse und nekrotische Veränderungen werden als morphologisches Korrelat akuter Abstoßungsreaktionen charakterisiert.

Akute Rejektionen werden nach Kriterien der „Banff-Klassifikation“ in 4 Schweregrade unterteilt <sup>11, 12</sup>: sehr milde akute Rejektion („borderline changes“), milde akute Rejektion (Grad I), moderate akute Rejektion (Grad II) und schwere akute Rejektion (Grad III).

### 3.1.2 Immunologische Grundlagen der akuten Abstoßung

#### ***3.1.2.1 Antigenpräsentation und T-Zell-Aktivierung***

Die akute Abstoßung ist ein T-Zell-vermittelter Prozess, bei dem eine Anzahl von Effektormechanismen zur Zerstörung des Transplantatgewebes führt. T-Zellen spielen eine zentrale Rolle bei der Auslösung einer Transplantatabstoßung. Für eine optimale T-Zellaktivierung werden zwei Signale benötigt (Abb. 1).

Signal 1 wird über die Wechselwirkung zwischen dem antigenspezifischen T-Zell-Rezeptor (T cell receptor, TCR) der T-Lymphozyten des Empfängers und dem Alloantigen, der an das MHC (major histocompatibility complex)-Molekül des Spenders gebunden ist, vermittelt. T-Zellen können ein Alloantigen auf direktem und indirektem Wege erkennen <sup>13</sup>.

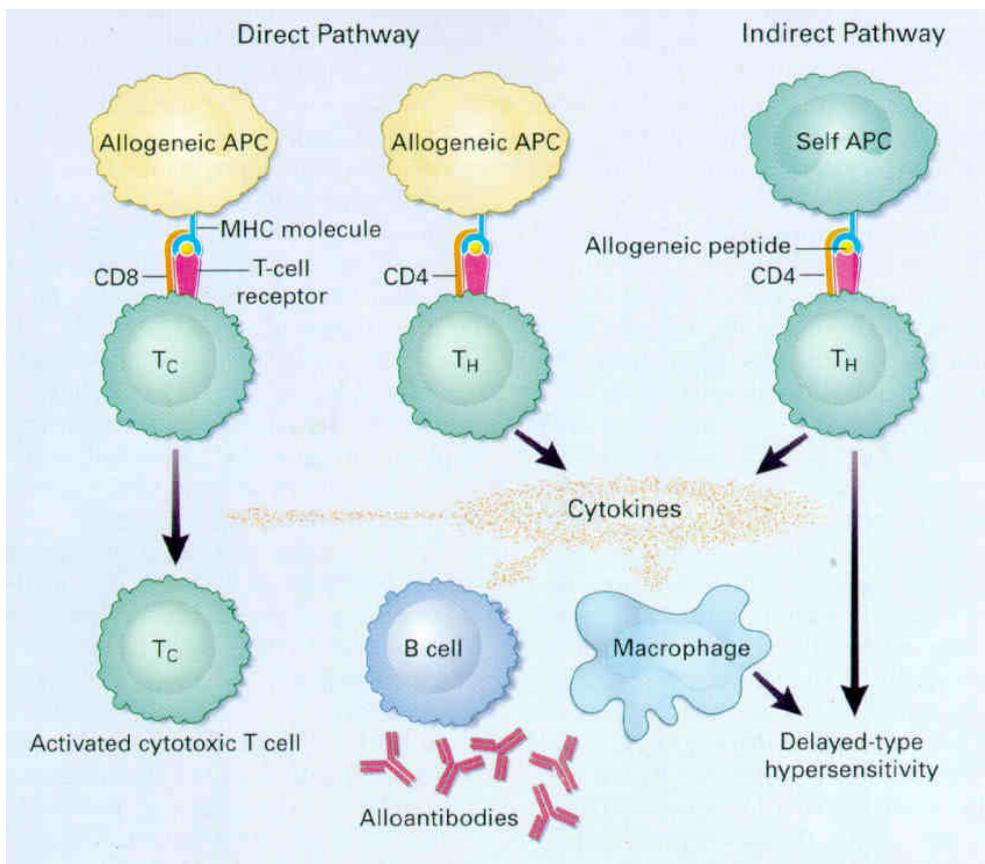
Das Transplantat enthält antigenpräsentierende Zellen (antigen presenting cells, APC) des Spenders (dendritische Zellen im Bindegewebe, Makrophagen), die Spender-MHC-Moleküle tragen. Nach der Transplantation wandern diese Zellen in die regionalen Lymphknoten und in die Milz, wo sie direkt Empfänger-T-Zellen stimulieren (direkte Alloantigenpräsentation). Da die T-Zellen die Spender-MHC-Moleküle als körpereigene MHC-Moleküle, die ein fremdes Antigen gebunden haben, erkennen, und die Dichte sehr hoch ist, werden auch niedrig-affine T-Lymphozyten aktiviert, so dass die Frequenz der alloreaktiven T-Zellen sehr hoch ist <sup>14</sup>.

Während in den ersten Wochen nach der Transplantation die direkte Präsentation von Fremdantigenen durch APC des Donors dominiert, herrscht im späteren Verlauf die indirekte Alloantigenpräsentation durch APC des Empfängers vor. Beim indirekten Weg der Antigenerkennung exprimieren die MHC-Moleküle des Empfängers durch die APC aufgenommenen MHC-Antigene des Donors. Die indirekte Antigenerkennung erzeugt viel weniger alloreaktive T-Zellen und scheint eine wichtige Rolle bei der Entwicklung einer chronischen Rejektion zu spielen <sup>15</sup>.

Für die T-Zellaktivierung ist die Antigenerkennung allein nicht ausreichend. Ein zweites Signal, das über die Interaktion zwischen kostimulatorischen Molekülen auf T-Zellen bzw. APC induziert wird, ist erforderlich. Diese Interaktion wird durch eine Wechselwirkung über Adhäsionsmoleküle und Oberflächenmarker mittels Zell-Zell-Kontakte oder durch lösliche

Faktoren (Zytokine wie IL-1, IL-12) vermittelt. Die am besten charakterisierten kostimulatorischen Moleküle auf APC sind Glykoproteine B7.1 (CD80) und B7.2 (CD86). Der Rezeptor für B7 auf der T-Zelle ist das Molekül CD28<sup>16-18</sup>. CD40-CD154 (gp39, CD40-Ligand) Interaktionen stellen ein anderes wichtiges kostimulatorisches Signal dar<sup>19,20</sup>.

Die Stimulation beider Signalwege führt zur T-Zellaktivierung und Proliferation, wobei Zytokine ausgeschüttet werden, die T-Zellen selbst und auch andere Zellen des Immunsystems aktivieren. Eine Stimulation der T-Zellen über Signal 1 ohne Signal 2 führt zur Anergie, d.h. T-Zellen sind nicht in der Lage zu proliferieren, Zytokine zu produzieren und können durch den programmierten Zelltod (Apoptose) untergehen<sup>21,22</sup>.



**Abb. 1: Mechanismen der zellulären Abstoßung.** Die T-Zellen erkennen Antigen auf direktem oder indirektem Weg. Durch die zwei Signale 1. zwischen dem T-Zell-Rezeptor und Alloantigen und 2. zwischen kostimulatorischen Signalen auf T-Zellen und APC kommt es zur T-Zell-Aktivierung und Proliferation. Die aktivierten T-Zellen vermitteln über Zytokinproduktion und Zell-Zell-Interaktion Effektor-Mechanismen der Abstoßungsreaktion. Aus N Engl J Med. 1994 Aug 11; 331(6): 365-76, Review: Renal Transplantation Suthanthiran M, Strom TB.

### 3.1.2.2 T1/T2-Paradigma

Nach der Alloantigenstimulation entsteht eine humorale und/oder zelluläre Immunantwort abhängig von Zytokinen, die von T-Zellen produziert werden.

Die naiven, nicht stimulierten T-Zellen produzieren beim ersten Antigenkontakt vorwiegend IL-2 und werden als Vorläufer der anderen Typen angenommen. Nach kurzzeitigem Antigenkontakt entstehen Th0 Klone, die eine höhere Differenzierung aufweisen. Sie können Zytokine u. a. wie IL-2, IL-3, IFN- $\gamma$ , IL-4, IL-5 und IL-10 produzieren. Die wiederholte Antigenstimulation z. B. nach einer Transplantation führt zur Entwicklung von Effektorzellen mit einem entsprechenden Zytokinmuster. Die Frage der Differenzierung von Th0 Klonen zu T1 bzw. T2-Zellen ist bis jetzt noch nicht endgültig geklärt. Das umgebende Zytokinmilieu, APC- und kostimulatorische Signale werden als wichtige Differenzierungsfaktoren für diesen Prozess angenommen<sup>23</sup>.

Mosmann et al.<sup>24, 25</sup> konnten zwei grundsätzlich verschiedene Typen von T-Helferzell-Klonen (Th1 und Th2) in der Maus unterscheiden. Da bei CD8+ Zellen später eine ähnliche funktionelle Unterteilung nachgewiesen wurde, bezeichnet man diese Zellen als T1- und T2-Zellen. T1-Zellen produzieren vorwiegend IL-2, IFN- $\gamma$  und TNF- $\beta$ . Sie sind an den zellvermittelten Immunantworten wie Zytotoxizität, Aktivierung von Makrophagen, DTH und der Bildung Komplement-bindender Antikörper (IgG1, IgG3) beteiligt. T2-Zellen synthetisieren vorwiegend IL-4, IL-5, IL-6, IL-10 und IL-13 und wirken als B-Zellstimulatoren bei der Produktion von Antikörpern wie IgM, IgG2, IgG4, IgA und IgE. Daher sind sie mehr an der Induktion der humoralen Immunität gegen extrazelluläre Bakterien und Parasiten und durch die Bildung von IL-5 an der Eosinophilie beteiligt.

T1- und T2-Zellen regulieren sich gegenseitig, so dass die Aktivierung des einen zu einer Suppression des anderen führt. Zytokine nehmen hierbei eine zentrale Stellung als regulatorische Bindeglieder ein, wobei die Zytokine der T1- bzw. T2-Antwort im wesentlichen gegensätzliche Wirkungen ausüben.

In mehreren Arbeiten wurde gezeigt, dass die T1-Aktivierung mit einer Rejektion assoziiert ist<sup>26, 27</sup>, während das Überwiegen der T2-Antwort eine Transplantatakzeptanz oder sogar eine Toleranzinduktion begünstigt<sup>28-30</sup>. Jedoch gibt es auch Berichte über eine Transplantat-zerstörende T2-Antwort<sup>31, 32</sup>.

Die Überprüfung der Rolle einzelner Zytokine im komplexen Prozess der Transplantatabstoßung bzw. der Toleranzentwicklung (Transplantation von zytokindefizienten=“knock out“ Mäusen) führte insgesamt zu widersprüchlichen

Ergebnissen<sup>33</sup>. Transplantationen in IL-2<sup>34</sup> und IFN- $\gamma$ <sup>35-37</sup> „knock out“ Mäusen zeigten, dass die Hemmung der IL-2 bzw. IFN- $\gamma$ -Produktion nicht ausreichend ist, eine Abstoßung des Transplantates zu verhindern. Die Arbeiten mit IL-4 „knock out“ Mäusen haben gezeigt, dass eine Verlängerung des Transplantatüberlebens durch „Toleranzprotokolle“ auch ohne IL-4 möglich ist<sup>38, 39</sup>. Diese Erkenntnisse relativieren die klassische Einteilung der T1- und T2-Zytokine als rejektions- bzw. als toleranzfördernde Zytokine. Erst das komplexe Zusammenwirken der unterschiedlichen Zytokine ist für die Regulation der spezifischen Immunantwort gegen das Transplantat verantwortlich.

### *3.1.2.3 Effektormechanismen bei der Zerstörung des Transplantates*

#### Makrophagen und Delayed Type Hypersensitivity-Reaktion (DTH)

Die DTH ist eine durch T-Zellen vermittelte Entzündungsreaktion. CD4<sup>+</sup> T-Lymphozyten sind verantwortlich für diese Immunantwort. Alloaktivierte CD4<sup>+</sup> T-Zellen produzieren Zytokine wie IL-2 und IFN- $\gamma$ . Dies fördert das Anlocken und die Akkumulation von Makrophagen und anderen unspezifischen mononukleären Zellen am Ort der Entzündung, welche wiederum inflammatorische Mediatoren (Monokine wie TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ ) freisetzen. Durch CD4<sup>+</sup> T-Zell-Zytokine wird auch eine Proliferation und klonale Expansion von CD8<sup>+</sup> T-Lymphozyten ausgelöst.

#### Zytotoxische T-Lymphozyten

Die Zerstörung von allogenen Zellen durch zytotoxische T-Zellen beruht auf einer Auslösung des programmierten Zelltodes (Apoptose). Die Induktion der Apoptose wird durch zwei Wege vermittelt. Im sekretorischen Weg wird die Zielzelle durch direkten Effekt der porenbildenden Proteine (Perforine) auf die Zellmembran der Zielzelle in Kooperation mit Serin-Protease (Granzyme) getötet. Im zweiten, nichtsekretorischen Weg wird der programmierte Zelltod der an CTL gebundenen Zielzelle durch Zell-Zell-Interaktion des CTL-membrangebundenen Moleküls Fas-Ligand mit dem Apoptose-induzierenden Zelloberflächenrezeptor Fas der Zielzelle induziert. Als ein weiterer Mechanismus der CTL-induzierten Zerstörung von Zielzellen wird die TNF- $\alpha$ -Sekretion angenommen.

#### Natürliche Killerzellen (NK-Zellen)

NK-Zellen tragen zur alloantigenunspezifischen Zerstörung des Transplantates durch Proteasen bei oder rufen durch Prostaglandine eine Entzündung hervor.

### Eosinophile

Eosinophile unterstützen proinflammatorische Prozesse im Transplantatgewebe. Durch die Ausscheidung von Eosinophilem Kationischen Protein (ECP) üben sie eine direkte zytotoxische Wirkung auf die Gewebezellen des Transplantates aus. Eine Eosinophilie im Transplantat kann während akuter und chronischer Abstoßungen diagnostiziert werden.

### B-Lymphozyten

Früher ist man davon ausgegangen, dass B-Lymphozyten in Kooperation mit dem Komplementsystem ausschließlich für hyperakute und/oder vaskulär dominierte akute Abstoßungen verantwortlich sind. Diese Form der Abstoßungsreaktion beruht auf induzierten oder bereits existierenden Antikörpern gegen donorspezifische HLA-Moleküle. Präformierte Antikörper können durch vorangehende Bluttransfusionen, Schwangerschaften bzw. Transplantationen entstanden sein. Heutzutage hat die hyperakute Abstoßung durch ein verbessertes Cross-match an Bedeutung verloren.

Demgegenüber mehren sich die Hinweise, dass B-Zellen und Plasmazellen in sehr vielen Biopsien mit akuter interstitieller Abstoßung nachweisbar sind und stellen einen wesentlichen Initiator, Vermittler und Unterhalter chronischer Transplantatschädigung dar<sup>40</sup>. Sie sind in Prozesse der Arteriosklerose und Glomerulosklerose involviert.

## **3.2 Infektionen nach der Transplantation**

### **3.2.1 Zytomegalievirusinfektion (CMV) nach Nierentransplantation**

Unverändert spielen CMV-Infektionen als häufigste opportunistische Infektion eine Rolle in der Transplantationsmedizin, obwohl letal verlaufende Erkrankungen nur noch zu ungefähr 4% diagnostiziert werden.

Serologische Untersuchungen zeigen, dass in Mitteleuropa mindestens 60-90% der Bevölkerung latent mit CMV infiziert sind<sup>41</sup>. Die häufigste Ursache aktiver CMV-Infektionen in immunsupprimierten Patienten ist die Reaktivierung latenter Viren, die in

Vorläuferzellen der Monozyten und Makrophagen im Knochenmark persistieren<sup>42</sup>. Bei Transplantatempfängern sind das eigene, endogen vorhandene Viren oder mit dem Spenderorgan bzw. Blutprodukten übertragene Viren. Bei CMV-negativen Transplantatempfängern kann es durch Übertragung eines Organs von einem latent mit CMV-infizierten Spender zu Primärinfektionen kommen<sup>43</sup>.

Aktive CMV-Infektionen können direkte und indirekte Effekte zur Folge haben. Direkt vermittelt das Virus akute oder chronische Erkrankungen mit klinischen Zeichen wie Fieber, Leukopenie, Thrombopenie, Pneumonie, Hepatitis usw. Indirekt bewirkt das Virus über „bystander“-Effekte im Sinne der akuten und/oder chronischen Immunsuppression Schädigungsprozesse, die klinisch und histologisch dem Bild einer akuten und/oder chronischen Abstoßung gleichen<sup>44</sup>. Darüberhinaus induziert das Virus häufig eine Immundepression, die opportunistische Superinfektionen bakterieller oder mykotischer Art begünstigt<sup>45</sup>. Desweiteren konnte gezeigt werden, dass CMV-Reaktivierung/Erkrankung ein wichtiger Risikofaktor für die Entstehung von EBV-assoziierten PTLD's (posttransplantation lymphoproliferative disease) nach Transplantation darstellt<sup>46</sup>.

### 3.2.2 Immundepression und Sepsis in der Transplantation

Eine Sepsis entsteht immer dann, wenn es zu einer schnellen ungehemmten Vermehrung von Bakterien und/oder mykotischen Erregern in der Zirkulation kommt. D. h., ein wichtiger pathogenetischer Faktor ist die Fähigkeit des Wirtes (Patienten) eine balancierte effektive Immunantwort zu etablieren, die die Erregerinvasion kontrolliert und die Erreger eliminiert. Bei Transplantation ist diese Fähigkeit des Immunsystems durch die Immunsuppression individuell unterschiedlich stark eingeschränkt. Die Sepsis stellt ein Syndrom systemischer Toxizität dar, das aus der Anwesenheit infektiöser Keime oder deren Produkte im Blut resultiert<sup>47</sup>. Die Aktivierung der gewebeständigen Makrophagen und Monozyten durch in das Gewebe eindringende Keime oder fokale Gewebeerstörung spielt eine Schlüsselrolle im Krankheitsgeschehen und ist verbunden mit einer erhöhten Phagozytoseaktivität, mit phänotypischen Veränderungen dieser Zellen, mit der Freisetzung toxischer Substanzen sowie mit der Sekretion löslicher niedermolekularer Mediatoren<sup>48, 49</sup>. In der Bakterienwand gramnegativer Bakterien enthaltenes Lipopolysaccharid (LPS) ist entscheidend für die Aktivierung von Monozyten und Gewebemakrophagen. LPS bildet einen Komplex mit dem Lipopolysaccharide-Binding-Protein (LBP). Das Oberflächenantigen CD14 auf Monozyten stellt den spezifischen Rezeptor dieses LPS-LBP-Komplexes dar. Innerhalb von Minuten bis

Stunden nach Bindung des LPS-LBP-Komplexes an die Monozyten/Makrophagen kommt es zur Freisetzung proinflammatorischen Zytokine IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-8 und TNF- $\alpha$ , die in Serum nachweisbar werden. Die Intensität und Quantität der systemischen Freisetzung dieser Zytokine ist von besonderer Bedeutung für die Induktion des septischen Schocks.

#### HLA-DR-Expression auf den Monozyten

HLA-DR-tragende Monozyten phagozytieren Bakterien, zerlegen intralysosomal die Proteine der Bakterien in Polypeptidsequenzen und präsentieren diese in Kombination mit dem HLA-DR-Antigen auf der Zelloberfläche. Dieser Antigen-HLA-DR-Komplex wird durch antigenspezifische T-Helferzellen erkannt. Dies führt zu deren Aktivierung mit nachfolgender Induktion entsprechender Effektormechanismen. Verschiedene Mediatoren haben einen regulatorischen Einfluss auf diese Prozesse. Zytokine, die insbesondere die zelluläre Immunantwort stimulieren, wie IFN- $\gamma$ , GM-CSF, IL-12-Heterodimer, führen direkt oder indirekt zu einer Stimulation der monozytären HLA-DR-Expression, was zu einer hohen Moleküldichte pro Zelle führt<sup>50-56</sup>. Zytokine wie IL-10 und TGF- $\beta$  oder Prostaglandine regulieren die Moleküldichte pro Zelle herunter und verringern damit die Kapazität zur Phagozytose, Antigen-Prozessierung und Antigenpräsentation<sup>57, 58</sup>. Auch immunsuppressive Medikamente verringern direkt oder indirekt die HLA-DR-Expression auf Monozyten. Aufgrund dieser komplexen Regulation durch wichtige immunmodulierende Mediatoren spiegelt die HLA-DR-Expression auf Monozyten gut den aktuellen Status der zellulären Immunkompetenz wider.

Volk et al. beobachteten in zytofluometrischen Analysen peripherer mononukleärer Zellen von Sepsispatienten eine Verminderung des Anteiles HLA-DR-Antigen-positiver Monozyten<sup>59</sup>. Eine starke Verminderung der monozytären HLA-DR-Expression gilt als Zeichen für eine global eingeschränkte Immunkompetenz. Bei immunsupprimierten Transplantationspatienten mit stark verminderter HLA-DR-Expression auf den Monozyten können septische Komplikationen durch eine starke Reduktion der immunsuppressiven Therapie überwunden werden, ohne jedoch Rejektionskrisen zu induzieren<sup>60</sup>. Dieser Zustand, in dem das Immunsystem weder in der Lage ist, eine Infektion zu bekämpfen, noch ein Allograft abzustößt, wird als „Immunparalyse“ bezeichnet. Immunologisch ist sie durch eine Monozytendeaktivierung gekennzeichnet, deren Leitparameter die drastisch verminderte monozytäre HLA-DR-Expression bzw. exakter die Verminderung der Moleküldichte pro Zelle ist.

Bei uns im Labor wird seit Jahren die Expression von HLA-DR auf frisch gewonnenen Blutmonozyten als Parameter eines „*in vivo*-Bioassays“ der Immunkompetenz genutzt. Bei dieser Arbeit wurde der neue standardisierte Assay von Becton Dickinson mit einer automatischen Quantifizierung der monozytären HLA-DR-Expression als Anzahl der gebundenen anti-HLA-DR-Antikörper pro Monozyt (mAb/Zelle) verwendet <sup>61</sup>.

### **3.3 Immunsuppression**

#### 3.3.1 Basistherapie

##### **3.3.1.1 Calcineurininhibitor: FK506 (Tacrolimus, Prograf®)**

Calcineurininhibitoren Cyclosporin A (CyA) und FK506 (Tacrolimus, Prograf®) sind heutzutage die wichtigsten Bausteine der immunsuppressiven Therapie. Die beiden Immunsuppressiva haben einen ähnlichen Wirkungsmechanismus. Sie entfalten ihre pharmakologische Wirkung durch Bindung an eine Gruppe zytoplasmatischer Proteine, die sogenannten Immunophilinen, nämlich an Cyclophiline für CyA und an FK-bindende Proteine (FKBP) für FK506 <sup>62-64</sup>. Die so gebildeten Substanz-Immunophilin-Komplexe hemmen selektiv die enzymatische Aktivität von Calcineurin, einer Calcium-abhängigen Serin/Threonin-Phosphatase. Das Calcineurin wird aktiviert, wenn sich der intrazelluläre Calciumspiegel als Folge der Bindung des TCR an entsprechende Antigen:MHC-Komplexe erhöht und deshalb das Calmodulin an das Calcineurin bindet. Das aktivierte Calcineurin dephosphoryliert die zytosolische Komponente des Transkriptionsfaktors NF-AT (nuclear factor for activated T-cells), NF-ATp, die daraufhin in den Zellkern wandert und die Transkription der Gene für IL-2 und andere Zytokine induziert <sup>65</sup>. NF-ATp ist ein Phosphoprotein und wird nur in lymphoiden Zellen exprimiert. Somit beruht die primäre immunsuppressive Wirkung von Calcineurininhibitoren auf der Blockierung der Proliferation von T-Zellen durch eine Verminderung der Expression mehrerer Zytokingene, die normalerweise bei der T-Zell-Aktivierung induziert werden. Dazu gehört IL-2, dessen Synthese durch T-Lymphozyten ein wichtiges Wachstumssignal für T-Zellen darstellt. Außerdem unterdrückt Tacrolimus die Expression von IL-2- und IL-7-Rezeptoren. Tacrolimus hemmt die Bildung von zytotoxischen T-Zellen und deren Aktivierung und unterbindet die davon abhängige B-Zell-Proliferation. Im Vergleich zu CyA ist Tacrolimus 10- bis 100-fache effektiver in seiner Wirksamkeit.

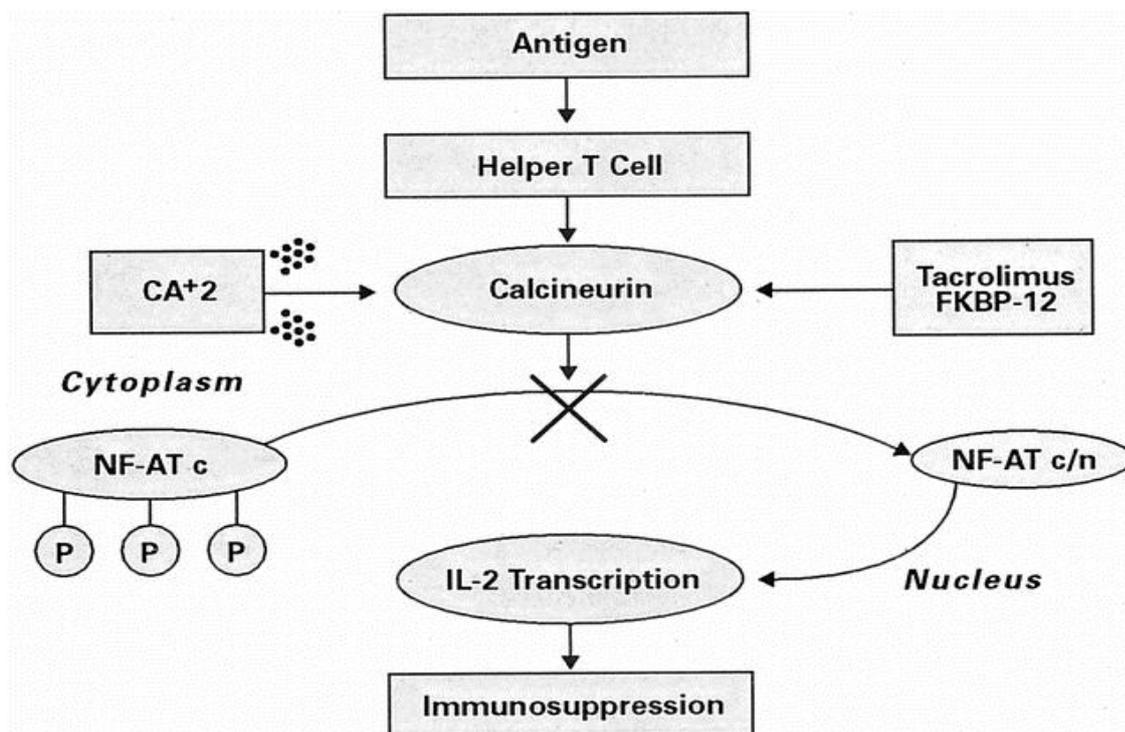


Abb. 2: Wirkungsmechanismus von Tacrolimus. Tacrolimus hemmt die Aktivierung von T-Lymphozyten durch Bindung an FKBP-12, ein intrazelluläres Protein. Der so gebildete Tacrolimus-FKBP-12-Komplex hemmt selektiv die enzymatische Aktivität von Calcineurin, einer Calcium-abhängigen Serin/Threonin-Phosphatase. Der aktivierte Calcineurin dephosphoryliert die zytosolische Komponente des Transkriptionsfaktors NF-AT (nuclear factor for activated T-cells), NF-AT, die daraufhin in den Zellkern wandert und die Transkription der Gene für IL-2 und andere Zytokine induziert. Somit beruht die primäre immunsuppressive Wirkung von Calcineurininhibitoren auf der Blockierung der Proliferation der T-Zellen durch eine Verminderung der Expression mehrerer Zytokingene, z. B. IL-2 und IFN-gamma. Aus Transplantation, Volume 77(9) Supplement, May 15, 2004.S41-S43

Tacrolimus ist ein Makrolid-Antibiotikum, das aus dem Pilz *Streptomyces tsukubaenses* hergestellt wird. Es wurde 1994 für die Basisimmunsuppression bei der Lebertransplantation eingeführt und ist seit 1997 auch für Nierentransplantationspatienten zugelassen.

Die Calcineurininhibitoren, Tacrolimus und CyA, werden im klinischen Alltag nach Blutspiegelwerten dosiert<sup>66</sup>, weil niedrige Spiegel mit einer höheren Inzidenz an akuten und chronischen Abstoßungen und hohe Blutspiegel mit einer Zunahme der Toxizität, systemischen Nebenwirkungen und Infektionen korrelieren. Die Metabolisierung von Tacrolimus erfolgt analog dem CyA über das Cytochrom P450-Isoenzym der Leber. Zahlreiche Nebenwirkungen können die systemische Anwendung von Tacrolimus einschränken. Das Nebenwirkungsspektrum von Tacrolimus ist dem von CyA ähnlich. Beide Immunsuppressiva sind nephrotoxisch<sup>67-69</sup>. Tacrolimus-behandelte Patienten haben aber eine höhere Inzidenz von Neurotoxizität, gastrointestinalen Symptomen und posttransplant

Diabetes mellitus<sup>70-73</sup>. Unter Tacrolimus-Therapie kommt es selten zu einer Gingivahypertrophie und Hypertrichose in Vergleich zu CyA-behandelten Patienten.

In den Vergleichs- und Umstellungsstudien zeigte sich ferner, dass nierentransplantierte Patienten, die mit Tacrolimus behandelt werden, weniger Hypertonie und Dyslipidämie als Cyclosporin-behandelte Patienten aufweisen<sup>69, 73, 74</sup>. Dies ist von hohem Interesse, da kardiovaskuläre Ereignisse in 30-40% die Haupttodesursache nach Nierentransplantation darstellen<sup>75</sup>. Nach neueren Daten tragen Hypertonie und Hyperlipidämie neben immunologischen Faktoren wesentlich zur Entwicklung des chronischen Transplantatversagens bei<sup>76, 77</sup>.

### **3.3.1.2 Antiproliferative Medikamente: Mycophenolat Mofetil (MMF, Cellcept®)**

Antiproliferative Medikamente verhindern die klonale Expansion von alloreaktiven T- und B-Zellen. MMF ist ein selektiver Hemmer von T- und B-Lymphozyten. Es inhibiert im Gegensatz zu Azathioprin die Proliferation bereits alloantigen-stimulierter T-Lymphozyten. MMF ist ein selektiver Hemmer des *de novo* Weges der Purinsynthese<sup>78-80</sup>. Es ist ein „Prodrug“, das sich nach der oralen Aufnahme und enteralen Resorption *in vivo* in seine aktive Form Mycophenolsäure (mycophenolic acid, MPA) umwandelt. Der Vorteil von MPA gegenüber anderen Antimetaboliten ist seine spezifische Blockierung der Proliferationsfähigkeit von T- und B-Lymphozyten. Weitere Wirkungsmechanismen von MMF sind:

- Induktion von Apoptose aktivierter T-Zellen mit der Folge der Eliminierung antigen-stimulierter Zellen
- Hemmung der Glykolytierung und damit der Expression von Adhäsionsmolekülen auf T- und B-Lymphozyten
- Hemmung der Antikörperproduktion durch B-Zellen
- Hemmung der Proliferation von glatten Muskelzellen.

Diese Wirkmechanismen haben zur Hypothese geführt, dass MMF die Entwicklung einer chronischen Abstoßung hemmen könnte. Diese Hypothese konnte in Tierexperimenten positiv unterlegt werden<sup>81, 82</sup>, während die Ergebnisse von großen multizentrischen Studien dies bisher nicht bestätigen konnten<sup>83-87</sup>.

In 3 großen multizentrischen Phase III Studien wurde MMF gegen Azathioprin bzw. Plazebo geprüft<sup>83-87</sup>. Diese Studien zeigten, dass MMF die Inzidenz von akuten Abstoßungen (50%

Reduktion) und die Rate von Therapieversagen in den ersten 6 Monaten nach Transplantation signifikant vermindert. Die 3-Jahres-follow-up Analysen der o.g. Studien brachten folgende Ergebnisse:

1. Es gab keine statistisch signifikanten Unterschiede in der Langzeitpatienten- und Transplantatüberlebensrate zwischen den Behandlungsgruppen.
2. Das Auftreten von unerwünschten Nebenwirkungen war in beiden Behandlungsgruppen vergleichbar. Ausnahmen waren gastrointestinale (Übelkeit, Erbrechen, Durchfälle, gastrointestinale Blutungen) und hämatologische (Leukopenie, Anämie) Symptome, die häufiger in der MMF-Gruppe auftraten.
3. Es wurde eine erhöhte Inzidenz von gewebeinvasiven CMV-Erkrankungen bei den MMF-Patienten beobachtet.

Im klinischen Alltag ist die Messung von MMF-Konzentration oder Aktivität nicht erforderlich, weil die interindividuelle Variabilität in MPA-Konzentrationen relativ gering ist und der klinisch tolerierte therapeutische Dosisbereich für MMF bei maximal 2-3 g/d liegt.

### 3.3.2 Induktionstherapie

#### **3.3.2.1 Polyklonale Antikörper (ALG, ATG)**

Polyklonale Antikörper wie Antilymphozytenglobuline (ALG) oder Antithymozytenglobuline (ATG) sind Immunglobulinpräparate, die in mit humanen Lymphozyten oder Thymozyten immunisierten Pferden oder Kaninchen hergestellt werden. Um einen Großteil der entstehenden, unspezifischen Antikörper zu entfernen, folgen je nach Hersteller mehrere Schritte wie selektive Adsorption an menschliche Erythrozyten, Adsorption an menschliches Plasma und Ionenaustausch-Chromatographie. Das Problem aller Antikörperpräparationen besteht in der Spezifität, in der Chargeninstabilität und in der ungenügenden Standardisierung.

Es sind verschiedene polyklonale Antilymphozyten-Antikörper weltweit verfügbar (Tab. 1). Die Pferdeimmunglobuline wie Atgam (Upjohn, Kalamazoo, Michigan, USA) und MALG (University of Minnesota, Minneapolis, USA) wurden häufiger in den USA verwendet, während Kaninchen- und Pferde-ATG und ALG (Mérieux, Lyon, Frankreich) und Kaninchen-ATG (Fresenius, Bad Homburg, Deutschland) in Europa angewendet werden.

**Tab. 1 Die verfügbare polyklonale Antilymphozyten-Antikörper. Aus Current Opinion in Organ Transplantation, Volume 4 (4), December 1999, S. 305**

Preparation	Host	Immunogen	Production	Dosage*, mg/kg/d
ATG (Atgam)	Horse	Thymus	Upjohn, Kalamazoo, Michigan, USA	10–20
ATG (Lymphoglobuline)	Horse	Thymus	Mérieux, Lyon, France	10
ATG (Thymoglobuline)	Rabbit	Thymus	Mérieux, Lyon, France	1.25–2.5
ATG (ATG-Fresenius)	Rabbit	Jurkat T lymphocyte	Fresenius, Bad Homburg, Germany	2
ALG (MALG) <sup>†</sup>	Horse	Cultured lymphoblasts and thymus	University of Minnesota, Minneapolis, MN, USA	10–20

\*Dose for induction therapy in organ transplantation recommended by the company. <sup>†</sup>Not available anymore. ATG, antithymocyte globulin; MALG, Minnesota antilymphocyte globulin.

Seit einigen Jahren ist eine Renaissance im Einsatz von ATG durch die Markteinführung von Thymoglobulin® (Genzyme, Cambridge, MA, USA) zu verzeichnen, was sich durch eine breite Anwendung insbesondere in den USA bemerkbar macht<sup>88-90</sup>. Neuere Arbeiten zum Thymoglobulin belegen eine hohe Effektivität in der Verhinderung von akuten Abstoßungen und niedrigen Inzidenzen an Infektionskomplikationen insbesondere in der Kombination mit Tacrolimus<sup>91</sup>. Sie geben Anlass zur Hoffnung, dass diese Medikamentenkombination bei einer Reihe von Transplantatempfängern Minimierungsstrategien in der Immunsuppression erlauben.

Polyklonale Antikörper haben seit den 60-er Jahren eine breite klinische Anwendung in der Organtransplantation gefunden. Sie werden als Induktionstherapie und auch in der Therapie von akuten Abstoßungen eingesetzt. In einigen Transplantationszentren werden polyklonale Antikörper als Induktionstherapie appliziert, um die Nephrotoxizität von Calcineurininhibitoren zu verringern, in dem hiermit zeitlich verzögert nach Transplantation begonnen wird und die Spiegel niedriger gehalten werden. In anderen Zentren werden ATG oder ALG nur bei Patienten mit erhöhtem Risiko für die Entwicklung einer akuten Abstoßung, d.h. Zweittransplantierte, Patienten mit präformierten zytotoxischen Antikörpern und mit verzögerter Transplantatfunktion, appliziert<sup>92, 93</sup>.

Die Rolle von polyklonalen Antikörpern als Induktionstherapie wird kontrovers diskutiert. Einige große Datenanalysen haben gezeigt, dass die Induktionstherapie mit polyklonalen Antikörpern mit einem verminderten Risiko für eine akute Abstoßung bzw. mit einer signifikanten Erhöhung des Transplantatüberlebens assoziiert ist<sup>94-97</sup>. Langzeitdaten zeigen allerdings keinen signifikanten Vorteil für das Transplantatüberleben im Verhältnis zu Patienten ohne Induktionstherapie<sup>92, 98, 99</sup>.

Eine Vergleichsstudie der Induktionstherapie mit Thymoglobulin vs. Atgam zeigte, dass unter Thymoglobulin weniger schwere Abstoßungen und Nebenwirkungen sowie weniger CMV-Infektionen aufgetreten und das Transplantatüberleben besser war <sup>100</sup>. Die Vergleichsstudie Atgam vs. ATG-Fresenius zeigte ähnliches Nebenwirkungs- und Infektionsprofil, aber unter ATG-Fresenius kam es zu einer stärkeren T-Zell-Suppression als unter Atgam. Deshalb waren auch weniger Abstoßungen bei den ATG-Fresenius-behandelten Patienten nachzuweisen <sup>101</sup>. Polyklonale Antikörper erkennen multiple T-Zell-Oberflächenmarker. Die wichtigen Antikörper sind diejenigen gegen CD2, CD3, CD4, CD5, CD8, CD25, CD40, CD54 und TCR  $\alpha/\beta$ -Antigene <sup>102-104</sup>. Neben T-Zell-spezifischen Antikörpern enthält ATG spezifische Antikörper gegen aktivierte B-Zellen (CD19, CD20, CD21), aber auch gegen Adhäsionsmoleküle (CD11a, CD18) und Zelllinien-unspezifische Marker wie  $\beta$ 2-Mikroglobulin und HLA-DR. Der Grad der Blockierung der unterschiedlichen Oberflächenmoleküle variiert von Präparat zu Präparat. Viele Antikörper in ATG/ALG erkennen auch Antigene, die an nichtlymphozytären Zellen (Erythrozyten, Neutrophilen, Thrombozyten und Endothelzellen) exprimiert werden und können deshalb bei höheren Dosierungen zum Auftreten von unerwünschten Nebenwirkungen führen <sup>102, 104</sup>. Das durchflußzytometrische Immunmonitoring von CD3+ T-Zellen mit dem Ziel 50-100 Zellen/ $\mu$ l ermöglichte die Dosisreduktion von polyklonalen Antikörpern mit einer deutlichen Abnahme der unerwünschten Nebenwirkungen aber ohne Einfluss auf die Wirksamkeit <sup>105, 106</sup>. Die immunsuppressive Wirkung von polyklonalen Antikörpern beruht auf der massiven Depletion von peripheren Lymphozyten nach der Applikation. Diese Wirkung kommt durch folgende Mechanismen zustande <sup>102, 107-110</sup>:

- Komplement-vermittelte Zelllyse durch eine Aktivierung des klassischen Komplementweges
- Aufnahme von opsonierten T-Zellen vom retikuloendothelialen System und darauf folgende Phagozytose durch Makrophagen in Milz, Leber und Lunge und
- Modulation der wichtigen Oberflächenmolekülen auf Lymphozyten.

Untersuchungen zeigten, dass ATG zu einer schnellen und massiven Depletion der peripheren Lymphozyten führt, welche über den Behandlungszeitraum bestehen bleibt <sup>104, 108, 111</sup>. Das anschließende Wiederauftreten der T- und B-Zellen ist durch eine lange Verminderung der CD4+-Lymphozyten gekennzeichnet.

Bonnefoy-Berard et al. zeigten, dass ATG eine *in vitro* Aktivierung von peripheren T-Zellen sowie eine Stimulierung der IL-2, IFN- $\gamma$  und TNF- $\alpha$ -Synthese bewirkt <sup>110, 112</sup>. In

submitogenen Konzentrationen induziert ATG eine inkomplette T-Zell-Aktivierung, charakterisiert durch einen Anstieg der Zellgröße, der Zellkondensation und der Expression von CD95 und CD69. Die Zunahme der CD95-Expression wurde allerdings nur bei ATG-Präparationen mit Antikörpern gegen CD3 und CD2 beobachtet<sup>110</sup>. Desweiteren induziert ATG eine CD25- und CD95-L-Expression und kann über TNF- $\alpha$  und CD95-L-Expression Apoptose triggern. Alle Zellen mit einer hohen Ansprechrate auf ATG zeigten eine hohe Expression des Fas-Rezeptors. Die ATG-vermittelte Apoptose konnte nur in aktivierten, jedoch nicht in ruhenden T-Zellen nachgewiesen werden.

Die wichtigsten Nebenwirkungen von ATG sind Serumkrankheit, Fieber, Schüttelfrost im Rahmen "first-dose"-Reaktionen, Thrombozytopenie, Anämie und eine erhöhte Inzidenz infektiöser Komplikationen und maligner Erkrankungen, insbesondere das Auftreten von PTLD's<sup>113, 114</sup>.

### **3.3.2.2 IL-2-Rezeptor- $\alpha$ (IL-2R $\alpha$ ; CD25)-Antikörper**

Um das Nebenwirkungsprofil von Antikörper-Therapien deutlich zu reduzieren und über eine hohe Spezifität in der Bindung an frisch aktivierte T-Zellen eine ausreichende Sicherheit in der Prävention früher akuter Abstoßungen zu erzielen, wurden monoklonale Antikörper entwickelt, die die  $\alpha$ -Kette des IL-2-Rezeptors erkennen und über Bindung blockieren<sup>115</sup>.

Am Anfang wurden murine und Ratten-Antikörper gegen den IL-2R $\alpha$  in klinischen Studien verwendet. Die Effektivität dieser murinen monoklonalen IL-2R-Antikörper wurde aber durch folgende Faktoren begrenzt:

- kurze Plasmahalbwertszeit
- Ausbildung anti-idiotypischer Antikörper gegen Maus/Ratten-Immunglobuline
- Ausbildung anti-isotypischer Antikörper im Empfänger mit der Folge einer geringeren Effektorfunktion<sup>116, 117</sup>.

Diese Probleme wurden durch die Herstellung von chimären und humanisierten monoklonalen IL-2R $\alpha$ -Antikörpern weitgehend gelöst.

Basiliximab (Simulect®) ist ein chimärer monoklonaler IL-2R $\alpha$  (CD25)-Antikörper vom IgG1 $\kappa$  Isotyp mit einem Molekulargewicht von 156 kDa. Die konstante Region vom Antikörper ist human (75%), die variable Region ist murin (25%)<sup>118</sup>. Die Plasmahalbwertszeit beträgt 6,5 Stunden. Die Hemmung des IL-2R ist bis zu 30-45 Tage nach

der Induktion nachweisbar, also in einer Phase nach der Transplantation, wo das Risiko einer akuten Abstoßungsreaktion am höchsten ist.

Neben dem wichtigsten Wirkungsmechanismus von IL-2R $\alpha$ -Antikörpern, der Blockierung der Induktion von Lymphozytenproliferation durch eine direkte Hemmung der IL-2/IL-2R-Interaktion, ist ein weiterer Mechanismus die T-Zell-Eliminierung durch Antikörper-abhängige, zellvermittelte Zytotoxizität (ADCC), die Komplement-abhängige Zelllyse und/oder Opsonierung<sup>117, 119</sup>.

Die zwei großen multizentrischen Phase III plazebokontrollierten, randomisierten Doppelblindstudien zur Untersuchung von Wirksamkeit und Sicherheit von Basiliximab zeigten folgende Ergebnisse<sup>120, 121</sup>:

- eine signifikante stabil nachweisbare Abnahme der Inzidenz von akuten Abstoßungsepisoden (29,8% in der Basiliximab- vs. 44% in der Plazebogruppe<sup>121</sup> bzw. 35,3% vs. 49,1%<sup>120</sup>)
- vergleichbare Patienten- und Transplantatüberlebensraten nach einem Jahr zwischen beiden Gruppen
- gute Verträglichkeit von Basiliximab ohne Zeichen eines Zytokin-Release-Syndroms
- höhere Effektivität ohne Zunahme des Infektions- oder Tumorrisikos nach 1 Jahr post transplantationem.

In einer weiteren plazebokontrollierten, randomisierten Studie wurde die Kombination von Basiliximab und einer Tripeltherapie aus CyA, Steroiden und MMF untersucht. Die Inzidenz der Biopsie-nachgewiesenen akuten Abstoßungen 6 Monate nach der Transplantation betrug 13,5% in der Basiliximab- vs. 25% in der Plazebogruppe<sup>122</sup>.

In den darauf folgenden multizentrischen Studien wurde Basiliximab als Induktionstherapie mit den herkömmlichen polyklonalen Antikörpern hinsichtlich der Sicherheit, Verträglichkeit und Wirksamkeit bei der Verhinderung akuter Abstoßungsreaktionen bei Nierentransplantatempfängern verglichen. Die Standardimmunsuppression bestand aus Cyclosporin A, Steroiden und MMF. Die Amerikanische Studie, die als Induktionstherapie das Pferde-ATG (Atgam) verwendet hatte, zeigte, dass die Inzidenz der durch die Biopsie-nachgewiesenen akuten Abstoßungen zwischen ATG- und Basiliximab-behandelten Patienten vergleichbar war<sup>123</sup>. Jedoch hatten die ATG-behandelten Patienten häufiger rezidivierende akute Abstoßungen. Es gab keine signifikanten Unterschiede zwischen den beiden Patientengruppen hinsichtlich des Transplantat- und Patientenüberlebens nach einem Jahr post transplantationem. In der Europäischen Multizentrischen Studie wurde die Induktionstherapie

mit dem Kaninchen-ATG (Thymoglobulin®) durchgeführt. Lebranchu et al. zeigten, dass die Rate an akuten Abstoßungen in den ersten 6 Monaten nach Transplantation in beiden Gruppen ähnlich war <sup>124</sup>. Die Basiliximab-Patienten hatten weniger schwere Abstoßungen nach der Banff-Klassifikation als die ATG-Patienten (3 von 4 milde Abstoßung (Banff Grad I) vs. 3 von 4 moderate Abstoßungen (Banff Grad II)). In dieser Studie gab es ebenso keinen signifikanten Unterschied im 1-Jahres-Graft- und Patientenüberleben zwischen den ATG- und Basiliximab-Patienten. Mourad et al. führten eine ähnliche Studie (Basiliximab vs. Kaninchen-ATG (Thymoglobulin®)) mit dem Unterschied durch, dass CyA in den beiden Induktionstherapiegruppen verzögert verabreicht wurde <sup>125</sup>. Diese Studie zeigte ebenfalls eine vergleichbare Inzidenz an akuten Abstoßungen. Ähnlich fanden sich keine statistisch signifikanten Unterschiede im Transplantat- und Patientenüberleben zwischen den Gruppen. Jedoch hatten die Basiliximab-Patienten signifikant weniger CMV-Infektionen, Leukopenien und Thrombozytopenien.

In der Literatur finden sich kaum Daten zu Basiliximab-Induktionstherapie und FK506 als Calcineurininhibitor bei der Standardimmunsuppression. Leonardi et al. untersuchten die Verträglichkeit und Sicherheit von Basiliximab als Induktionstherapie in Kombination mit einer Tacrolimus-basierter Immunsuppression <sup>126</sup>. Die Basiliximab-Induktionspatienten wurden mit den Patienten verglichen, die nur eine duale Therapie mit FK506 und Steroiden bekamen. Die Ergebnisse dieser Studie zeigten, dass die Inzidenz akuter Abstoßungen in der Basiliximab-Gruppe im 3. Monat nach Transplantation signifikant niedriger im Vergleich zu non-Basiliximab-Gruppe war. Diese Tendenz bestand auch nach einem Jahr post Tx jedoch ohne einen signifikanten Unterschied. Die Nebenwirkungsrate war vergleichbar unter den Gruppen. Das 1-Jahres-Transplantat- und Patientenüberleben sowie die 1-Jahres-Graftfunktion zeigten keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen.

### **3.4 Zytokine in der Transplantation und in der Abstoßung**

Zytokine sind lösliche Proteine, die von verschiedenen Zellen nach unterschiedlichen Stimuli freigesetzt werden. Sie entfalten ihre Wirkung durch die Bindung an spezifische Rezeptoren auf der Oberfläche von Zielzellen. Zytokine sind biologisch hochaktive Moleküle und entfalten ihre Wirkung bei Konzentrationen im pikomolaren Bereich. Die *in vivo* Halbwertszeit von Zytokinen ist sehr kurz. Die Ursachen dafür sind die Bindung an Zellen bzw. Proteine, der proteolytische Abbau und die renale Ausscheidung. Die Funktion von Zytokinen besteht vor allem in der Regulation lokaler interzellulärer

Wechselwirkungsprozesse über autokrine, parakrine und endokrine Wirkungen. Zytokine spielen eine wesentliche Rolle in der Vermittlung und Regulation von Entzündungsreaktionen, spezifischen und unspezifischen Immunreaktionen. Das gezielte An- und Abschalten von Zytokin- und Zytokinrezeptorgenen in Knock-out/Knock-in-Mäusen hat dazu beigetragen, die physiologische und pathophysiologische Rolle in definierten Situationen mit definiertem Background zu klären. Immunologisch relevant sind vor allem Zytokine, die von Monozyten (Monokine) und T-Zellen (Lymphokine) produziert werden und die Funktion und Interaktion dieser Immunzellen regulieren.

Zytokine sind bei Transplantatabstoßungsprozessen individuell und dynamisch hoch- oder runterreguliert und haben einen wesentlichen Einfluss auf die kurz- und langfristige Transplantatprognose. Im Folgenden werden die für die Abstoßung relevanten und im Rahmen dieser Arbeit untersuchten Zytokine und Zytokinrezeptoren aufgeführt. Man unterteilt nach ihrer Wirkung auf Entzündungsprozesse Zytokine in proinflammatorische und antiinflammatorische Zytokine.

### 3.4.1 Proinflammatorische Zytokine

#### **3.4.1.1 Tumornekrosefaktor-Alpha (TNF- $\alpha$ )**

TNF- $\alpha$  wird in gelöster Form (als Homotrimer von 17,4 kDa) von aktivierten Zellen, beispielsweise LPS-stimulierten Monozyten und Makrophagen bzw. T-Lymphozyten, gebildet. Neben dieser Form ist eine membrangebundene Vorstufe mit einem Molekulargewicht von 26 kDa bekannt. Praktisch fast alle Zellen exprimieren TNF-Rezeptoren und reagieren auf TNF. TNF-Induktoren sind vor allem Endotoxine von gramnegativen Bakterien (Lipopolysaccharide), Viren, Pilze und Immunmediatoren wie IFN- $\gamma$ .

Eine zentrale Bedeutung von TNF- $\alpha$  bei Entzündungen liegt in der Aktivierung des Arachidonsäurestoffwechsels mit Bildung von Prostaglandinen und der Induktion von Differenzierungsantigenen und Adhäsionsmolekülen, was eine Akkumulation von Monozyten und Lymphozyten am Ort des Geschehens bewirkt. Desweiteren verstärkt TNF- $\alpha$  die Fähigkeit der Monozyten, Antigen zu präsentieren, durch eine Erhöhung der MHC-Klasse-II-Expression oder durch Stimulation der Freisetzung von proinflammatorischen Zytokinen wie IL-1 $\beta$  und IL-6<sup>127</sup>. TNF- $\alpha$  induziert auch IL-10-mRNA- und die IL-10-Expression<sup>128</sup>.

Außerdem erhöht TNF- $\alpha$  die Zytotoxizität von Monozyten und NK-Zellen, stimuliert die Antikörperproduktion von B-Zellen und wirkt als Kostimulation bei der T-Zellaktivierung. Mehrere humane wie tierexperimentelle Studien zeigten eine Korrelation zwischen akuter Abstoßung bei Nieren- und Lebertransplantierten und der Expression von TNF- $\alpha$  <sup>129-132</sup>.

#### **3.4.1.2 Interleukin-1 (IL-1)**

Es werden 2 Typen von Interleukin-1, IL-1 $\alpha$  und IL-1 $\beta$ , unterschieden. Beide IL-1-Formen werden als eine 31-kDA-Vorstufe synthetisiert, aus der durch Proteasen das aktive 17-kDA-Peptid abgespalten wird. Beim Menschen findet man überwiegend IL-1 $\beta$ -Protein in der Zirkulation. Es ist häufig in löslicher Form in Überständen detektierbar, während IL-1 $\alpha$  als membrangebundene Form erscheint. Beide Polypeptide erkennen dieselben Rezeptoren. IL-1 wird von APC wie Monozyten, Makrophagen, dendritische Zellen, NK-Zellen und Astrozyten freigesetzt. Es wird nicht konstitutiv exprimiert. Für die Freisetzung von IL-1 werden verschiedene Stimulantien wie bakterielle Produkte (Endotoxin), aktivierte T-Zellen und Immunkomplexe benötigt.

IL-1 hat eine Reihe immunregulatorischer Funktionen. Es gilt als Induktor der Akut-Phase-Proteine und ist für die Leukozytose bei Entzündung verantwortlich <sup>133</sup>. IL-1 erhöht die Expression von Adhäsionsmolekülen. Das bedeutet *in vivo* einen erhöhten Durchsatz von Lymphozyten und Neutrophilen am Inflammationsort. IL-1 ist ein wichtiger Kofaktor der T-Zellaktivierung, indem es die Synthese von Interleukin-2 und die Expression des IL-2-Rezeptors induziert. IL-1 kann außerdem die Expression der Gene von IL-6, IFN- $\gamma$  und anderer Zytokine erhöhen und wirkt synergistisch mit diesen Mediatoren auf das Wachstum bzw. Differenzierung von T- und B-Zellen <sup>134</sup>.

IL-4 und IL-10 haben einen hemmenden Effekt auf die IL-1-Expression. Glukocortikoide inhibieren auch die IL-1-Synthese. IFN- $\gamma$  besitzt einen synergistische Wirkung mit LPS, IL-1 zu induzieren.

#### **3.4.1.3 Interleukin-6**

IL-6 ist ein 26 kDa schweres Glykoprotein. Es wird von T- und B-Lymphozyten, Monozyten, Makrophagen, Fibroblasten und von Endothel- und Epithelzellen produziert <sup>135</sup>. Im Nierenparenchym setzen mesangiale und tubuläre Epithelzellen IL-6 frei <sup>136, 137</sup>. Die IL-6-

Wirkungen werden über einen spezifischen IL-6-Rezeptor vermittelt, wobei der eigentliche Rezeptor an das Glykoprotein gp130 gekoppelt ist, das den signaltransduzierenden Teil darstellt. Ein löslicher IL-6-Rezeptor ist ebenfalls bekannt. Der lösliche IL-6-Rezeptor bindet sich *in vitro* an IL-6 und erhöht dessen biologische Wirkung durch die Bindung des Komplexes IL-6/löslicher IL-6-Rezeptor zu membrangebundenem gp130.

Der proinflammatorische Effekt von IL-6 ist weniger stark als der von TNF und IL-1. Es ist an der Induktion der Akute-Phase-Reaktion beteiligt. So supprimiert IL-6 die Produktion von IL-1 und TNF<sup>138</sup>, während auf der anderen Seite diese beiden Zytokine die Freisetzung von IL-6 induzieren.

IL-6 ist an der T-Zellaktivierung durch Induktion der IL-2-Rezeptorexpression sowie an der Differenzierung zytotoxischer T-Zellen beteiligt. Es stimuliert synergistisch mit anderen Signalen die IgM-, IgG- und IgA-Produktion. Dadurch beeinflusst IL-6 das B-Zellwachstum. Glykocortikoide und Calcineurin-Inhibitoren hemmen die Produktion von IL-6<sup>139, 140</sup>.

IL-6 ist nicht nur ein Entzündungsvermittler, sondern spielt eine wichtige Rolle bei der Balancierung der Entzündungsantwort. Eine erhöhte IL-6-Expression wurde als Ausdruck einer Immunaktivierung und Entzündungsreaktion bei akuter Abstoßung mit unterschiedlichen Nachweismethoden (in situ Hybridisation, PCR, ELISA) in Gewebe, Plasma und Urin gezeigt<sup>140-143</sup>.

#### **3.4.1.4 Interleukin-8**

IL-8 ist ein Peptidmediator mit einem niedrigen Molekulargewicht von 26kDa. Die Hauptproduzenten von IL-8 sind aktivierte Monozyten im Blut, Makrophagen, Fibroblasten, Hepatozyten, Endothel- und Epithelzellen und Keratinozyten. Wichtige Induktoren sind Endotoxin (LPS), TNF- $\alpha$  und IL-1<sup>144, 145</sup>.

IL-8 gehört zu einer Gruppe chemotaktischer Zytokine mit stimulatorischer Wirkung auf neutrophile und basophile Granulozyten und T-Lymphozyten. Schon geringe Konzentrationen von IL-8 führen zur Migration und Aktivierung dieser Zellen. Neutrophile Granulozyten tragen hochaffine IL-8-Rezeptoren. T-Lymphozyten besitzen weniger Rezeptoren, jedoch mit noch höherer Affinität.

IL-8 kann bei entzündlichen Erkrankungen die Adhäsion von Leukozyten an Endothelzellen sowie die Anlockung von Granulozyten an den Inflammationsort fördern.

## 3.4.2 Antiinflammatorische Zytokine

### 3.4.2.1 Interleukin-10

IL-10 ist ein 35 kDa schweres homodimeres Polypeptid, das überwiegend von Th2-Zellen und Monozyten/Makrophagen, aber auch von B-Zellen und Keratinozyten gebildet wird. Die Untersuchungen von Wanidworanum et al.<sup>128</sup> und Platzer et al.<sup>146</sup> haben gezeigt, dass die monozytäre IL-10-Sekretion durch TNF- $\alpha$  verstärkt wird.

IL-10 ist ein pleiotropes Zytokin. Es kann die Proliferation von T- und B-Zellen induzieren. IL-10 hemmt die Entwicklung und Funktion von Th1-Zellen durch Suppression von IL-2 und IFN- $\gamma$ <sup>147</sup>. IL-10 hat ausgeprägte monozyten-deaktivierende Effekte<sup>148</sup>. Es hemmt die Produktion und Gentranskription von TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6 und IL-8 durch Monozyten und Makrophagen. Außerdem vermindert IL-10 die MHC-Klasse II-Expression auf Monozyten.

IL-10 ist ein potenter B-Zell-Wachstums- und Differenzierungsfaktor, stimuliert die Antikörper-abhängige zelluläre Zytotoxizität und kann dadurch humorale Immunantworten gegen das Transplantat induzieren<sup>149, 150</sup>.

Ob die antiinflammatorische Wirkung von IL-10 von prophylaktischer oder therapeutischer Relevanz für die Transplantationsmedizin sein könnte, wird noch widersprüchlich diskutiert. In mehreren tierexperimentellen Arbeiten wurde gezeigt, dass das Shift von Th1- zu Th2-Zytokinen eine Toleranzinduktion bewirkte<sup>30, 151</sup>. Im Gegensatz dazu wurde von anderen Arbeitsgruppen gezeigt, dass ein erhöhter IL-10-Plasmaspiegel<sup>152</sup> oder erhöhte IL-10mRNA-Expression im Nierentransplantatgewebe<sup>153, 154</sup> mit einem Anstieg der Inzidenz akuter und chronischer Abstoßungen korrelierte.

## 3.4.3 T-Zell-Zytokine (Lymphokine)

### 3.4.3.1 Interleukin-2

Interleukin-2 (IL-2) ist ein Glykoprotein mit einem Molekulargewicht von 14-17 kDa. IL-2 ist ein essentieller Wachstums- und Differenzierungsfaktor für die T-Zellproliferation, klonale Expansion und Zytokinproduktion. Außerdem spielt IL-2 bei der Proliferation und Differenzierung von NK-Zellen eine bedeutende Rolle. IL-2 wird von aktivierten T-Zellen selbst gebildet. Das erste Zusammentreffen mit einem spezifischen Antigen in Gegenwart des erforderlichen kostimulierenden Signals bewirkt, dass die T-Zelle in die G1-Phase des

Zellzyklus eintritt und es induziert gleichzeitig die Synthese von IL-2 zusammen mit der  $\alpha$ -Kette des IL-2-Rezeptors. Der IL-2-Rezeptor wird transient an antigen-aktivierten T-Zellen und kontinuierlich an NK-Zellen exprimiert. Er besteht aus drei Ketten:  $\alpha$ ,  $\beta$  und  $\gamma$ . Erst durch die Verbindung der  $\beta$ - und  $\gamma$ -Ketten mit der  $\alpha$ -Kette entsteht ein Rezeptor mit einer sehr viel höheren Affinität zu IL-2. Die Bindung von IL-2 an diese hochaffinen Rezeptoren lässt die Zellen den Rest des Zellzyklus, d.h. den Übergang in die S-Phase mit anschließender Mitose, durchlaufen. T-Zellen, die so aktiviert worden sind, können sich weiter teilen. Es kommt zu einer T-Zellproliferation, Differenzierung und klonalen Expansion.

IL-2 stimuliert und potenziert die Sekretion von IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$  und GM-CSF und vermittelt darüber biologische Effekte und Funktionsaktivität von T-Helfer-, NK- und zytotoxischen Zellen.

Immunsuppressiva wie CyA und FK506 hemmen die IL-2-Produktion, indem sie die Signalgebung über den T-Zell-Rezeptor unterbrechen. Die genaue Wirkungsweise dieser Pharmaka wurde im vorigen Abschnitt erläutert.

IL-2 gilt als wichtigstes „Rejektions-Zytokin“ und Hauptmediator der einsetzenden alloantigenspezifischen Immunantwort. Mehrere Arbeiten haben gezeigt, dass die Expression des IL-2-Genes mit dem Auftreten und dem Schweregrad der akuten Abstoßung korreliert<sup>155-157</sup>. Auf Proteinebene fand Kutukculer, dass die IL-2-Produktion als ein sicheres Zeichen einer akuten Rejektion gelten kann<sup>158</sup>. Experimente von Steiger et al.<sup>34</sup> in der IL-2 „knock out“ Maus zeigten allerdings, dass das Fehlen von IL-2 allein weder zur Transplantatakzeptanz noch zum erwarteten Umschlagen der Immunantwort in die Th2-Richtung führt.

#### **3.4.3.2 Interferon-gamma (IFN- $\gamma$ )**

Interferon-gamma (IFN- $\gamma$ ) ist ein typisches Lymphokin, d.h. es wird von aktivierten Lymphozyten, T-Zellen und NK-Zellen produziert<sup>159, 160</sup>. Rezeptoren für IFN- $\gamma$  kommen fast an allen Körperzellen vor, deshalb ist das Wirkungsspektrum dieses Zytokins sehr vielfältig.

IFN- $\gamma$  ist ein wichtiges Zytokin bei der Aktivierung von Makrophagen. Es wirkt sowohl bei der Differenzierung und Reifung von mononukleären Phagozyten als auch bei der Aktivierung von Gewebemakrophagen. Zusätzlich stimuliert IFN- $\gamma$  auch Endothelzellen. Diese beiden Wirkungen kennzeichnen die proinflammatorische Rolle von IFN- $\gamma$ .

IFN- $\gamma$  erhöht die Fähigkeit der Zellen, Antigen zu präsentieren durch die Erhöhung der Expression von Differenzierungsmarkern auf Immunzellen, insbesondere von MHC-Klasse II Antigenen auf Makrophagen, Langerhans Zellen, Keratinozyten, vaskulären Endothel- und Epithelzellen. IFN- $\gamma$  stimuliert auch die Expression von Adhäsionsmolekülen auf Endothelzellen, wodurch es zu einer erhöhten Infiltration von T-Zellen und Monozyten und zu verstärkten Zell-Zell-Interaktionen kommt.

Virusinfektionen verursachen Zellaktivierung und einen Anstieg der Interferone im Blut. Die freigesetzten Interferone wirken als Induktoren antiviraler Proteine in anderen nicht infizierten Körperzellen. Außer Viren können andere intrazelluläre Mikroorganismen und deren Bestandteile, z.B. bakterielle LPS, sowie IL-2, IL-12 und IFN- $\gamma$ -inducing factor (IGIF) IFN- $\gamma$ -Produktion induzieren. IL-10, IL-4 und TGF- $\beta$  wirken als natürliche Antagonisten von IFN- $\gamma$ .

IFN- $\gamma$  wird als „Rejektions-Zytokin“ und zentraler Mediator der nachfolgenden akuten Abstoßung beschrieben. Dieses Zytokin wird von Th1-Klonen sezerniert und ist in seiner Wirkung für die Aktivierung von zytotoxischen T-Zellen sowie die DTH-Immunantwort verantwortlich. Gemeinsam führen beide Komponenten zur akuten Transplantatabstoßung. Mehrere Arbeitsgruppen fanden einen direkten Zusammenhang zwischen erhöhtem IFN- $\gamma$  und akuter Abstoßung<sup>28-30</sup>. Die Untersuchungen an IFN- $\gamma$  „knock out“ Mäusen haben jedoch gezeigt, dass die Hemmung der IFN- $\gamma$ -Produktion allein nicht ausreichend ist, die akute Abstoßung des Transplantates zu verhindern<sup>36</sup>.

#### **3.4.3.3 Interleukin-4**

IL-4 ist ein Glykoprotein mit einem Molekulargewicht von 20 kDa. Es wird von aktivierten Th2-Zellen, Mastzellen und Eosinophilen produziert. IL-4 wirkt als Wachstums- und Differenzierungsfaktor auf B-Zellen. Es erhöht bei B-Zellen die Expression von MHC-Klasse II, was zu einer Steigerung der Antigenpräsentation führt. IL-4 ist ein essentielles Signal zum Immunglobulin-Klassen-Switch zu den IgG1- und IgE-Isotypen in antikörperbildenden Zellen.

Die proliferative Wirkung von IL-4 auf T-Zellen betrifft in erster Linie T-Helferzellen und weniger zytotoxische T-Zellen. IL-4 reguliert die Differenzierung von naiven CD4+ Zellen zu Th2-Zellen, die dann Zytokine wie IL-4, IL-5, IL-6, IL-10 und IL-13 produzieren. Die Th2-Zellen sind an der Induktion der humoralen Immunantwort beteiligt. IL-4 wirkt

antiinflammatorisch durch die Hemmung der Genexpression von Zytokinen wie TNF- $\alpha$ , IL-1, IL-2, IL-2R $\alpha$  und IFN- $\gamma$ . Dies bedeutet, dass eine erhöhte IL-4-Ausschüttung insgesamt zur Hemmung der Th1-Antwort führt. Die Hochregulation dieses Zytokins wurde in akzeptiertem Transplantatgewebe beobachtet. Wie einige Arbeiten zeigen konnten, korreliert die Höhe der IL-4-Expression mit einer Verlängerung der Transplantatüberlebenszeit<sup>161, 162</sup>. Levy et al. stellten die Hypothese auf, dass eine Überproduktion von IL-4 im Transplantatgewebe zu seiner permanenten Akzeptanz führen könnte<sup>163</sup>. Die Arbeiten von Lakkis et al. mit IL-4 „knock out“ Mäusen haben jedoch gezeigt, dass eine Verlängerung des Transplantatüberlebens auch ohne IL-4 möglich ist<sup>33, 38</sup>. Das bedeutet, dass auch die Beschreibung der Wirkung von IL-4 nicht hinreichend für eine vollständige Darstellung der Toleranzinduktion sein kann.

#### 3.4.4 Interleukin-2-Rezeptor

Zytokine beeinflussen ihre Zielzellen, indem sie an spezifische Rezeptoren binden. In den meisten Fällen sind Zytokinrezeptoren für eine hochaffine Bindung eines einzelnen Zytokins und für die Übertragung des Zytokinsignals innerhalb der Zelle verantwortlich, was zu einer zytokinspezifischen, zellulären Antwort führt.

Der IL-2-Rezeptor besteht aus drei Ketten:  $\alpha$ -Kette (IL-2R $\alpha$ , CD25 oder TAC-Antigen) von 55kDa,  $\beta$ -Kette (IL-2R $\beta$ , CD122) mit einem Gewicht von 70-75 kDa und  $\gamma$ -Kette (IL-2R $\gamma$ , CD132) von 64 kDa. Ruhende T-Zellen exprimieren konstitutiv die  $\beta$ - und  $\gamma$ -Ketten und sind deshalb gering empfindlich für IL-2 aufgrund geringer Affinität. Wenn die  $\alpha$ -Kette hochreguliert wird und damit der IL-2R komplett ist, erfolgt ein optimales intrazelluläres Signaling mit Aktivierung, Proliferation und Potenzierung der IL-2-Zytokinproduktion. Aktivierte T-Zellen „shedden“ den IL-2R in seiner löslichen Form. Stark erhöhte sIL-2R-Spiegel sind ein gutes Maß für eine Immunaktivierung, aber gering spezifisch für alloantigen-getriggerte Rejektionsprozesse<sup>142, 164, 165</sup>.

## 4 Immunsuppressionsprotokolle

29 Nierentransplantationsempfänger wurden prospektiv untersucht, die im Zeitraum von 15.04.99 bis zum 07.12.99 in der Klinik für Allgemein-, Viszeral- und Transplantationschirurgie der Charité, Campus Virchow-Klinikum transplantiert und in die klinische Studie „Induktionstherapie mit dem polyklonalen Antikörper ATG (Fresenius®, Bad Homburg, Deutschland) vs. dem monoklonalen IL-2R $\alpha$ -Antikörper Basiliximab (Simulect®, Novartis, Schweiz)“ eingeschlossen wurden.

14 Patienten wurden mit dem polyklonalen Antikörper ATG behandelt (Tab. 2). ATG wurde als hochdosierte Bolustherapie i.v. (9 mg/kg KG) intraoperativ vor der Anastomoseneröffnung appliziert<sup>166, 167</sup>. In der zweiten Gruppe haben die Patienten den monoklonalen IL-2R $\alpha$ -Antikörper Basiliximab 20 mg am Tag der Transplantation und am Tag 4 nach der Transplantation intravenös erhalten.

Die Basisimmunsuppression war gleich bei allen Transplantationsempfängern und bestand aus FK506 (Tacrolimus, Prograf®) und Methylprednisolon (Urbason®). FK506 wurde mit einer Initialdosis von 0,5 mg/kg Körpergewicht (KG) pro Tag oral verabreicht. Die Dosisanpassung erfolgte durch Plasmaspiegelmessung (MEIA, IMx, Abbott Laboratories, Wiesbaden, Deutschland), und es wurden initial Spiegel von 8-15 ug/ml eingestellt. Methylprednisolon wurde am Tag der Operation vor Anastomoseneröffnung bis zum 2. postoperativen Tag als i.v. Infusion mit einer Dosis von 5-7 mg/kg KG appliziert, danach oral in abnehmender Dosierung. Vier Patienten in der ATG-Gruppe und fünf Patienten in der Basiliximab-Gruppe mit einem erhöhten Risiko für eine akute Abstoßung (Zweittransplantierte, Patienten mit einem erhöhten PRA „panel reactive antibody“) haben zusätzlich MMF oral in einer Dosis von 1 bzw. 2 g/Tag erhalten.

**Tab. 2 Gruppeneinteilung nach Induktionstherapie ATG vs. Basiliximab**

	<b>ATG-Gruppe n =14</b>	<b>Basiliximab-Gruppe n=15</b>
<b>Induktions- therapie</b>	ATG (Fresenius) 9 mg/kg KG i.v. Tag 0	Basiliximab (Simulect®) 20 mg i.v. Tag 0/4
<b>Basistherapie</b>	FK506 (Tacrolimus) Steroide + MMF (Cellcept®) bei Risikopatienten	FK506 (Tacrolimus) Steroide + MMF (Cellcept®) bei Risikopatienten

## 5 Patienten

### 5.1 Demographische und Transplantat-Daten

#### Demographische Daten

In der Tab. 3 sind die demographischen Daten wie Alter, Geschlecht und Ätiologie der terminalen Niereninsuffizienz der Empfänger, Alter der Spender sowie Transplantatdaten der Studienpatienten im Vergleich zwischen den beiden Induktionstherapien dargestellt.

Das mittlere Alter der Transplantatempfänger lag bei 51,1 Jahren (mean  $\pm$  SD = 51,2  $\pm$  11,9; Range 30 bis 72 Jahre). 28% der Patienten waren im Alter von 31-40 Jahren, 20% im Alter von 41-50 Jahren. Der Anteil der Transplantatempfänger über 50 Jahre betrug 52%. Insgesamt waren 18 Patienten weiblich und 11 männlich. Die Transplantatspender des gesamten Kollektivs hatten ein Durchschnittsalter von 44,7 Jahren (mean $\pm$ SD = 44,7 $\pm$ 18,7; Range 9-76 Jahre). Die Alters- und Geschlechtsverteilung der Transplantatempfänger und die Altersverteilung der Transplantatspender innerhalb der beiden Induktionstherapien waren vergleichbar und statistisch nicht signifikant.

24 Patienten wurden zum ersten Mal nierentransplantiert. 5 Transplantatempfänger hatten ihre zweite Transplantation. Davon waren 4 Patienten in der Basiliximab-Gruppe und ein Patient in der ATG-Gruppe.

Die häufigsten Erkrankungen, die zur terminalen Niereninsuffizienz führten, sind Glomerulonephritiden unterschiedlicher Ätiologie (n=11, 38% der Patienten). Bei 17% der Patienten fand sich eine chronische Pyelonephritis als Grunderkrankung. 14% der Nierentransplantierten hatten eine chronisch interstitielle Nephritis. 7% der Transplantierten litten an polyzystischen Nierendegenerationen. Desweiteren hatten 7% der Patienten eine terminale Niereninsuffizienz wegen unterschiedlicher Nierentumoren. Bei 14% der Patienten lag eine renale Mitbeteiligung bei anderen Erkrankungen z.B Alport-Syndrom oder Morbus Wegener vor. Der Rest der Patienten (7%) litt an Nierenerkrankungen unklarer Ursachen. Die Verteilung der Ätiologie der Niereninsuffizienz war vergleichbar innerhalb der beiden Induktionsgruppen.

#### Transplantatdaten

Wenn man die Anzahl der gesamten Mismatches betrachtet, waren 6 Patienten „full match“-Empfänger, d.h. alle 6 HLA-Antigene haben zu 100% übereinstimmt. Zwei Patienten hatten je eins, 14 Patienten zwei bis drei und 8 Patienten fünf bis sechs Mismatche. Es gab keinen

signifikanten Unterschied in der HLA-Mismatch–Anzahl zwischen den ATG- und Basiliximab-Patienten.

Wenn im Empfänger präformierte HLA-Antikörper gegen HLA-Moleküle des Spenders nachweisbar sind, haben die Patienten häufig ein hohes Risiko für einen positiven Cross-match oder bei negativem Cross-match für akute Abstoßungen und kürzere Transplantatfunktionsraten. Solche Antikörper entstehen durch Präsensibilisierung des Empfängers aufgrund von Bluttransfusionen, Schwangerschaften und vormaliger Transplantationen. Durch die Crossmatchmethode kann das Serum des Patienten auf die Anwesenheit von lymphozytotoxischen Antikörpern getestet werden. Dabei wird das Patientenserum mit Lymphozyten, die die HLA-Verteilung der Normalbevölkerung repräsentieren, inkubiert. Unter Zugabe von Komplement wird dann die Zytolyse dieser verschiedenen Lymphozyten bestimmt. Der Prozentsatz von positiven Reaktionen, was als „Panel reactive Antibody (PRA)“ bezeichnet wird, ist ein Maß der Wahrscheinlichkeit eines positiven Crossmatch. Bei 24 Patienten waren PRA nicht nachweisbar. 3 Transplantierte hatten PRA zwischen 11-49%. Bei 2 Patienten waren die PRA-Level über 50%. Insgesamt 4 Patienten aus der Basiliximab-Gruppe hatten erhöhte PRA-Werte im Vergleich zu ATG-Patienten. Dieser Unterschied war aber nicht statistisch signifikant.

Die kalte Ischämiezeit ist ein alloantigen-unabhängiger Risikofaktor für eine verzögerte Funktionsaufnahme (DGF=delayed graft function) und korreliert damit indirekt mit kürzeren Laufzeitfunktionsraten des Transplantates. Sie betrug  $12,4 \pm 1,4$  Stunden in der ATG-Gruppe im Vergleich zu  $16,1 \pm 1,3$  Stunden in der Basiliximab-Gruppe. Dieser Unterschied war nicht signifikant.

**Tab. 3 Die demographischen und Transplantatdaten im Überblick im Vergleich zwischen ATG- und Basiliximab-Patienten**

<b>Eigenschaften</b>	<b>ATG-Gruppe n = 14</b>	<b>Simulect-Gruppe n = 15</b>	<b>p</b>
<b>Geschlecht (männl./weibl.)</b>	9 / 5	9 / 6	n. s.*
<b>Ursachen der Niereninsuffizienz:</b>			n. s.
- Glomerulonephritis	4	6	
- Pyelonephritis	2	3	
- interstitielle Nephritis	2	2	
- Zystennieren	2	-	

<b>- Nierentumoren</b>	-	2	
<b>- unklare Genese</b>	2	-	
<b>- andere Ursachen</b>	2	2	
<b>Alter der Empfänger, Jahre (mean ± SEM, min-max)</b>	53,6 ± 3,7 (36-72)	49,0 ± 2,5 (30-61)	0,31
<b>Alter der Spender, Jahre (mean ± SEM, min-max)</b>	47,2 ± 4,6 (10-64)	38,7 ± 4,3 (9-64)	0,07
<b>CMV-Konstellation Empfänger/Spender</b>			n. s.
<b>neg./ neg.</b>	3	4	
<b>neg. /pos.</b>	3	3	
<b>pos./neg.</b>	6	4	
<b>pos./pos.</b>	2	4	
<b>HLA- Mismatch (Anzahl)</b>			n. s.
<b>0</b>	2	3	
<b>1</b>	1	1	
<b>2-3</b>	6	8	
<b>4-6</b>	5	3	
<b>Kalte Ischämiezeit, Stunden (mean ± SEM, min-max)</b>	12,4 ± 1,4 (5,2-24,1)	16,1 ± 1,3 (4,7-25)	0,06
<b>Panel reaktive antibodies (PRA)</b>			0,12
<b>0-10 %</b>	13	11	n. s.
<b>11-49 %</b>	1	2	
<b>50-100 %</b>	-	2	

(\* nicht signifikant)

## 5.2 Probenentnahme/Dokumentation und Beurteilung des klinischen Verlaufs

Die immunologischen Untersuchungen wurden 3-mal wöchentlich über die ersten 3 postoperativen Wochen bis zur Entlassung der Patienten von der Station durchgeführt. Heparin- und EDTA-Blut und Urin (Morgenurin, am Anfang Katheterurin)-Proben wurden regelmäßig 3-mal wöchentlich zwischen 8 und 9 Uhr abgenommen und innerhalb von 3 Stunden bearbeitet.

Die Probengewinnung war begleitet von der Erfassung der anamnestischen und aktuellen klinische Daten, die Laborparameter, klinischen Status und notwendige Untersuchungen umfaßten. Von großer Bedeutung für die Studie waren die Daten zur Diagnostik und Therapie von akuten Abstoßungen und Infektionen wie CMV-Infektion und infektiösen Komplikationen wie Sepsis. Dafür wurden Biopsie- und Histologiebefunde von Nierenpunktaten, CMV-Serologie- und APAAP-Befunde und mikrobiologische Befunde dokumentiert. Außerdem wurden auch die Daten zur immunsuppressiven Therapie einschließlich Dosierung der Medikamente, Blutplasmaspiegelwerte, Umstellung der Immunsuppressiva erhoben.

21 zufällig ausgewählte gesunde Labormitarbeiter (männlich=14, weiblich=7, Alter=39,7 ± 2,7 (mean ± SEM), min-max=21-62 Jahre) stellten das Kontrollkollektiv.

## 6 Methoden

### 6.1 Materialien

#### 6.1.1 Chemikalien und Materialien für die *in vitro* Stimulationsteste

- Kulturmedium RPMI 1640 angereichert mit Glutamin (Milenia® *ex vivo* Stimulationskit, DPC Biermann, Bad Nauheim, BRD)
- Lipopolysaccharide LPS (Milenia® *ex vivo* Stimulationskit, DPC Biermann, Bad Nauheim, BRD)
- Destilliertes Wasser
- Concanavalin A (ConA), Lectin von *Canavalis ensiformis* (Serva®, Heidelberg, BRD)
- Reaktionsgefäße, pyrogenfrei (Milenia® *ex vivo* Stimulationskit, DPC Biermann, Bad Nauheim, BRD)
- Eppendorf-Röhrchen (Eppendorf-Netheler-Hinz GmbH, Hamburg, BRD)

#### 6.1.2 Chemikalien und Materialien für die durchflußzytometrische Bestimmung

- Phosphatgepufferte Kochsalzlösung (PBS = phosphate buffered saline) (Gibco) mit 0,5% Bovine Serum Albumin (Serva, Kat.-Nr. 11930) und 0,01% Natriumacid
- FACST<sup>TM</sup>Lysing Solution (Lyselösung, 10-fach konzentriert) (Becton Dickinson, Kat.-Nr. 349202)
- QuantiBRITE<sup>TM</sup> Anti-HLA-DR PE / Anti-Monocyte TruRed (PerCP-Cy5.5) (Becton Dickinson Immunocytometry Systems – BDIS, San Jose, California, USA, Kat.-Nr. 340827)
- CaliBRITE<sup>TM</sup> 3-Beads (Becton Dickinson Immunocytometry Systems – BDIS, San Jose, California, USA, Kat.-Nr. 340827)
- QuantiBRITE<sup>TM</sup> PE-Beads (Becton Dickinson Immunocytometry Systems – BDIS, San Jose, California, USA, Kat.-Nr. 340495)
- Anti-CD14 PerCP (Becton Dickinson Immunocytometry Systems – BDIS, San Jose, California, USA)

- Anti-CD86 FITC (PharMingen, Hamburg, BRD)

### 6.1.3 Enzymimmunoassays

- TNF- $\alpha$  IMMULITE®, Festphasen-Chemilumineszenz-Enzymimmunoassay, Kitkomponente TNF- $\alpha$ -Teströhrchen, TNF- $\alpha$ -Reagenz-Modul, TNF- $\alpha$ -Kalibratoren (DPC Biermann, Bad Nauheim, BRD, Kat.-Nr. LKNFZ oder LKNF1)
- IL-1 $\beta$  IMMULITE®, Festphasen-Chemilumineszenz-Enzymimmunoassay, Kitkomponente IL-1 $\beta$ -Teströhrchen, IL-1 $\beta$ -Reagenz-Modul, IL-1 $\beta$ -Kalibratoren (DPC Biermann, Bad Nauheim, BRD, Kat.-Nr. LKL1Z oder LKL11)
- IL-6 IMMULITE®, Festphasen-Chemilumineszenz-Enzymimmunoassay, Kitkomponente IL-6-Teströhrchen, IL-6-Reagenz-Modul, IL-6-Kalibratoren (DPC Biermann, Bad Nauheim, BRD, Kat.-Nr. LK6PZ oder LK6P1)
- IL-8 IMMULITE®, Festphasen-Chemilumineszenz-Enzymimmunoassay, Kitkomponente IL-8-Teströhrchen, IL-8-Reagenz-Modul, IL-8-Kalibratoren (DPC Biermann, Bad Nauheim, BRD, Kat.-Nr. LK8PZ oder LK8P1)
- soluble sIL-2R IMMULITE®, Festphasen-Chemilumineszenz-Enzymimmunoassay, Kitkomponente IL-2R-Teströhrchen, IL-2R-Reagenz-Modul, IL-2R-Kalibratoren (DPC Biermann, Bad Nauheim, BRD, Kat.-Nr. LKIPZ, LKIP1, LKIP5)
- human IL-10 US UltraSensitive ELISA (Cytoscreen, Biosource, Camarillo, CA, USA)
- human IL-4 US UltraSensitive ELISA (Cytoscreen, Biosource, Camarillo, CA, USA)
- human IL-2 ELISA (Cytoscreen, Biosource, Camarillo, CA, USA)
- human IFN- $\gamma$  EASIA (Medgenix, Biosource, Camarillo, CA, USA)

## 6.2 Meß- und Arbeitsgeräte / Software

- IMMULITE Automated Analyzer (DPC Biermann, Bad Nauheim, BRD)
- Photometer Anthos Reader 2001 (Anthos Mikrosysteme GmbH, Köln, BRD)
- Durchflußzytometer FACScan oder FACSCalibur (Becton Dickinson)
- FACSCComp-Software (Version 4.0)
- CellQuest-Software (Version 3.1) mit quantitativer Kalibrierungsoption (QuantiQuest)

- QuantiCALC-Software

### 6.3 Methodik

#### 6.3.1 Bestimmung der löslichen Mediatoren und Zytokine im Plasma und Urin

Zur Plasmagewinnung wurde Heparin-Blut verwendet. Das Blut wurde bei 1730 g für 5 min zentrifugiert, das Plasma abgenommen und 150 µl davon direkt für die Messung von löslichem (soluble) sIL-2R verwendet. Der Rest des Plasmas wurde in Eppendorf-Röhrchen aliquotiert und bei  $-80^{\circ}\text{C}$  gelagert. Die Bestimmung des sIL-2R in Plasma und Urin und der Zytokine IL-6, IL-8 und TNF- $\alpha$  im Urin erfolgte mittels IMMULITE® Automated Analyzer.

#### 6.3.2 LPS-stimulierte Monokinfreisetzung im Vollblut

Zur Bestimmung einer LPS-stimulierten Sekretion von TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  und IL-10 wurde 50 µl Heparin-Blut mit 500 µl LPS-Stimulationslösung (Milenia® *ex vivo* whole blood stimulation kit, DPC Biermann, Bad Nauheim, Deutschland) mit der LPS in einer Konzentration von 500 pg/ml 4 Stunden für die TNF- $\alpha$ -Messung und 24 Stunden für die IL-1 $\beta$ - und IL-10-Messung bei  $37^{\circ}\text{C}$  in Eppendorf-Röhrchen inkubiert. Die LPS-Stimulationslösung wurde entsprechend einer SOP hergestellt. Das lyophilisierte LPS mit einer Konzentration von 10.000 pg wurde mit 1 ml sterilem, pyrogen-freiem Aqua dest. aufgelöst und für 30 min stehengelassen. Die rekonstituierte Lösung wurde dann mittels einer 1:20 Verdünnung mit dem Verdünnungsmedium auf eine Endkonzentration von 500 pg/ml gebracht. Nach der Inkubation wurden die Ansätze gemischt, 5 min bei 1000 U/min zentrifugiert und Überstände abgenommen. TNF- $\alpha$  und IL-1 $\beta$  wurden direkt nach der Inkubation mittels IMMULITE® Automated Analyzer gemessen. Zur Messung von IL-10 wurde ein kommerziell erhältliches ELISA-Testkit verwandt. Für die IL-10-Bestimmung wurden die Proben bis zur Messung mit dem ultrasensitiven ELISA bei  $-80^{\circ}\text{C}$  gelagert.

#### 6.3.3 ConA-induzierte Lymphokinfreisetzung im Vollblut

Zur Bestimmung der ConA-stimulierten Sekretion von T-Zell-Zytokinen wie IL-2, IFN- $\gamma$  und IL-4 wurde 100 µl Heparin-Blut mit 700 µl RPMI Kulturmedium, das mit 100 µl ConA einer Konzentration von 100 µg/ml angereichert war, bei  $37^{\circ}\text{C}$  in Eppendorf-Röhrchen inkubiert.

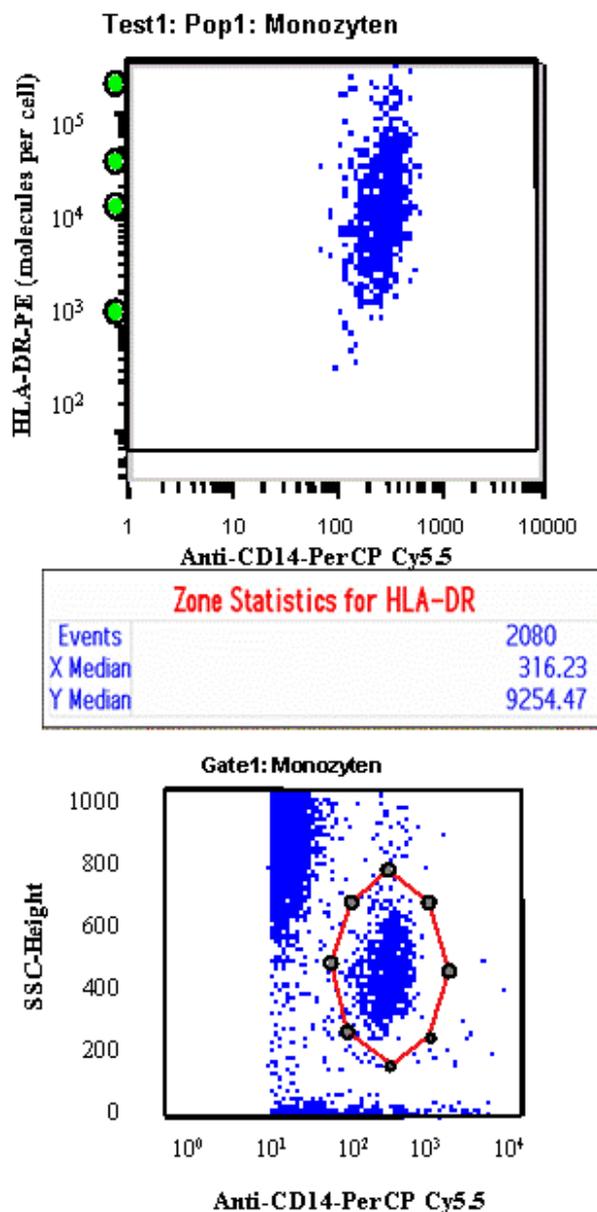
Nach 24 Stunden Inkubation wurden die Ansätze bei 1000 U/min für 5 min zentrifugiert und Überstände abgenommen. Die Proben wurden bis zur Messung der Zytokine bei  $-80^{\circ}\text{C}$  gelagert. Die Messung der Lymphokine erfolgte mittels ELISA-Kits.

#### 6.3.4 Fluozytometrische Quantifizierung von HLA-DR und CD86-Expression auf Monozyten

Für die Monozytenmarkierung wurde 50  $\mu\text{l}$  EDTA-Blut mit 10  $\mu\text{l}$  QuantiBRITE™ Anti-HLA-DR PE/Anti-Monocyte PerCP-Cy5.5 Reagenz (Becton Dickinson Immunocytometry Systems – BDIS, San Jose, California, USA) bzw. mit je 5  $\mu\text{l}$  anti-CD14 PerCP und anti-CD86 FITC für 30 min bei Raumtemperatur im Dunkeln inkubiert. Danach wurden die Ansätze mit 500  $\mu\text{l}$  FACS Lyse-Lösung für Erythrozyten-Lysis für 10 min bei Raumtemperatur inkubiert. Bei der Lyse-wash-Methode wurden Ansätze außerdem 5 min bei 3000 U/min zentrifugiert, Überstände abgenommen und mit 500  $\mu\text{l}$  PBS/0,5% BSA/0,01%NaN<sub>3</sub> resuspendiert.

Die Messung erfolgte am FACSCalibur™ Cytometer, der zuvor mit CaliBRITE™ 3 Beads mittels FACScmp™4.0-software (BDIS) kalibriert wurde. FACScmp-Programm wurde vor Optimierung verlassen. Im CellQuest-Programm erfolgte eine Optimierung der FL3-FL2-Kompensation mit einer Normalprobe. Bei dieser Instrumenteneinstellung wurden QuantiBRITE™PE Beads gemessen. Im „Quantitative Calibration“-Fenster wurde die lineare Regressionsgleichung berechnet, die für die quantitative Auswertung wichtig war. Im gleichen Dokument bei aktivierter „Quantitative Calibration“-Option wurden auch Patientenproben gemessen.

Die quantitative Auswertung von HLA-DR und CD86-Expression auf CD14+ Monozyten wurde mit Hilfe QuantiBRITE™ System von BDIS bestehend aus QuantiBRITE™ PE Beads, QuantiQuest™ Programm (Quantitative Kalibrierungsoption von CellQuest™) und QuantiCalc™-Software durchgeführt (Abb. 3). Die Verwendung eines definierten anti-HLA-DR PE 1:1-Konjugates erlaubt eine standardisierte Quantifizierung der monozytären Antikörperbindung mit dem Ergebnis „Antibodies bound per cell“ (mAb/c).



**Abb. 3:** Die quantitative Auswertung der HLA-DR-Expression auf CD14+ Monozyten mit Hilfe QuantiCalc™-Software. Unten im Bild ist die Gatung der CD14+ Monozyten dargestellt. Das obere Bild zeigt die Bestimmung der HLA-DR-Expression auf CD14+ Monozyten als Moleküle pro Zelle. Die grünen Punkte auf der y-Achse repräsentieren die gemessenen Geomean-Werte, die den Molekülen pro Zelle entsprechen. In diesem Beispiel exprimieren die Monozyten des Patienten 9254 HLA-DR-Moleküle pro Zelle.

### 6.3.5 Leukozytenzählung und Differentialblutbild

Die manuelle Leukozytenzählung erfolgte mit dem mikroskopischen Zählkammerverfahren (Zählkammer nach Neubauer). Zunächst wurde das Blut im Verhältnis 1:20 mit der 3%igen

Essigsäure verdünnt. Durch diese hypotone, saure Lösung werden Erythrozyten lysiert und Leukozyten fixiert. Nach mindestens 5 min wurde die Zählkammer gefüllt. Die Leukozyten wurden unter dem Mikroskop mit einem 10-er Objektiv in den 4 Eckquadraten des Zählnetzes gezählt. Entsprechend dem Volumen der 4 Eckquadraten und der Verdünnung um 1:20 ergibt sich ein Faktor 50, mit dem die gezählte Leukozytenzahl multipliziert wurde, um die Zahl der Leukozyten in 1  $\mu$ l Blut zu erhalten.

Für Differentialblutbild wurde das Vollblut als dünner Film auf einem Objektträger ausgestrichen, luftgetrocknet und anschließend nach Pappenheim gefärbt. Die Auswertung erfolgte am Mikroskop unter 1000facher Vergrößerung mit Immersionsöl. Zur Ermittlung der prozentualen Verteilung der Leukozytenpopulationen wurden insgesamt 100 Leukozyten differenziert. Die Zuordnung zu den einzelnen Subpopulationen erfolgt nach dem morphologischen Erscheinungsbild der Zelle.

#### **6.4 Statistische Auswertung**

Die statistische Auswertung erfolgte mit dem Statistikprogramm SPSS 10.0 für Windows. Die Ergebnisse werden als Mittelwert  $\pm$  Standardfehler (mean  $\pm$  SEM) präsentiert. Für die statistische Auswertung wurden nichtparametrische (verteilungsfreie) Tests verwendet, weil die Stichproben klein und die Bedingungen der Normalverteilung nicht garantiert waren. Der Vergleich der Ergebnisse innerhalb einer Patientengruppe wurde mit Hilfe des Wilcoxon-Tests für abhängige Stichproben durchgeführt. Dabei wurden die Zytokinspiegel von Untersuchungstagen im Follow-up im Vergleich zum Tag 1 nach Transplantation verglichen. Die Ergebnisse der Patientengruppen untereinander wurden unter Verwendung eines parameterfreien Tests für unabhängige Stichproben (Mann-Whitney-U-Test) verglichen. Der Chi-Quadrat-Test wurde zur Überprüfung der Häufigkeitsunterschiede bei kategorialen Variablen auf ihre Signifikanz verwendet. Der Chi-Quadrat-Test ist ein Verfahren, mit dem empirisch beobachteter Häufigkeiten mit sogenannten erwarteten Häufigkeiten verglichen werden. Bei allen Tests wurde eine Signifikanz bei einem  $p < 0,05$  angenommen.

## 7 Ergebnisse

### 7.1 Vergleich zwischen ATG- und Basiliximab-Induktionsgruppe

#### 7.1.1 Vergleich von klinischen Daten

##### 7.1.1.1 Inzidenz von akuten Abstoßungen

In den ersten 4 Wochen nach der Transplantation haben 7 Patienten aus der ATG-Gruppe eine akute Abstoßung bekommen (Abb. 4). D.h., die Rejektionsinzidenz in der ATG-Gruppe in den ersten Wochen nach der Transplantation betrug 50%. Bei 4 Patienten sind die akuten Abstoßungen zwischen dem Tag 6 und 7 post Tx diagnostiziert worden, je ein Patient hat an den Tagen 9, 13 und 21 post transplantationem das Transplantat akut abgestoßen. Bei histologisch nachgewiesener akuter Abstoßung I° wurden die ATG-Patienten mit einer hochdosierten Prednisolonbolustherapie (500 mg/Tag i.v.) für 3 bis 5 Tage behandelt.

In der Basiliximab-Gruppe war nur bei einem Patienten eine akute Abstoßung innerhalb der ersten 4 Wochen post Tx zu diagnostizieren. Dieser Patient hatte histologisch eine Abstoßung II-III°, die mit OKT3-Therapie behandelt werden musste. Die Rejektionsinzidenz betrug somit in dieser Gruppe 6%. Die Inzidenz akuter Abstoßungen war signifikant höher in der ATG-Gruppe im Vergleich zur Basiliximab-Gruppe ( $p < 0,05$  Chi-Quadrat-Test) innerhalb der ersten 4 Wochen nach der Transplantation.

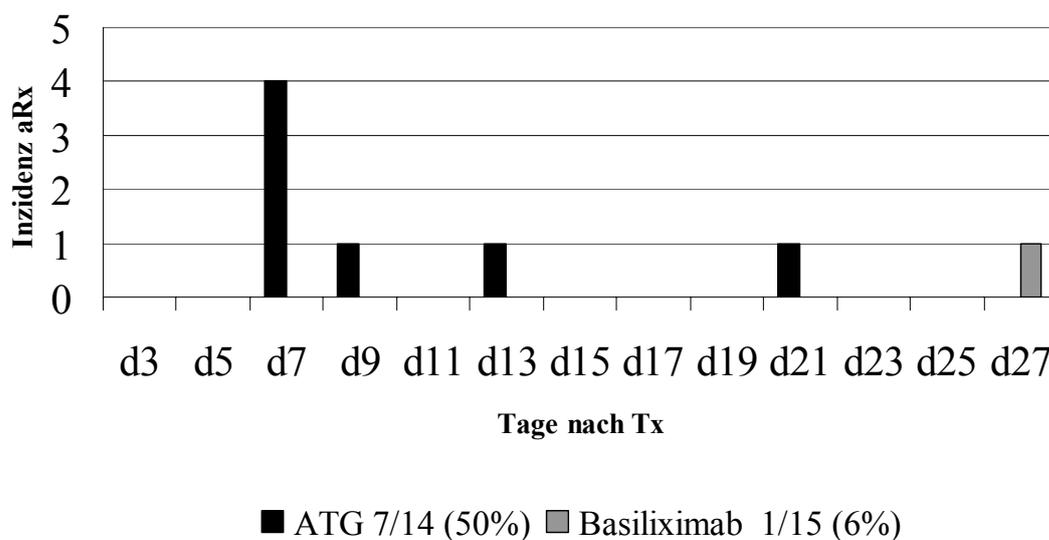


Abb. 4: Die Inzidenz akuter Abstoßungen war signifikant höher in der ATG-Gruppe im Vergleich zur Basiliximab-Gruppe ( $p < 0,05$  Chi-Quadrat-Test) innerhalb der ersten 4 Wochen nach Transplantation

Die Auswertung der Daten hinsichtlich des Auftretens akuter Abstoßungen im Follow-up bis zu einem Jahr nach Transplantation im Vergleich zwischen den beiden Gruppen ergab folgende Ergebnisse (Tab. 4).

Ein Patient aus der ATG-Gruppe hatte 2 Monate nach Transplantation eine akute Abstoßung erlitten. Zwei Empfänger aus der Basiliximab-Gruppe hatten ihre Transplantate in der 12. Woche und 6. Monat post Tx abgestoßen. Rezidivierende akute Abstoßungen traten nur bei Patienten in der ATG-Gruppe auf. Ein Transplantatempfänger entwickelte zweimal rezidivierende akute Abstoßungen im Abstand von 6 bis 10 Tagen innerhalb der ersten 4 Wochen nach Transplantation, die einmal bei Steroidresistenz mit OKT3 behandelt werden musste. 3 weitere ATG-Induktionspatienten, die eine akute Abstoßungen in den ersten 4 Wochen nach der Transplantation erlitten hatten, bekamen im späteren Verlauf in der 9. Woche, im 6. Monat sowie im 2. bzw. 5. Monat nach Transplantation eine akute Abstoßung.

**Tab. 4 Die Inzidenz, Banff-Klassifikation und Therapie von akuten Abstoßungen (aRx) sowie Inzidenz von Rezidiv-Abstoßungen (aRx-Rezidiv) bei ATG- und Basiliximab-Induktionspatienten im Vergleich im Follow-up bis zu einem Jahr nach Transplantation**

ID	ATG/Basiliximab	aRx Banff	Zeit post Tx	Rx-Therapie	aRx-Rezidiv innerhalb 1 Jahr
1	Basiliximab	II-III°	Tag 27	5 x 5 mg OKT3	nein
2	Basiliximab	I°	Wo 12	5 x 500 mg MP	nein
3	Basiliximab	I°	Mo 6	5 x 500 mg MP	nein
4	ATG	I°	Tag 9	5 x 500 mg MP	Wo 9; 3 x 500 MP
5	ATG	I°	Tag 21	5 x 500 mg MP	nein
6	ATG	I°	Tag 13	3 x 500 mg MP	nein
7	ATG	I°	Tag 7	5 x 500 mg MP	Mo 6; 5 x 500 MP
8	ATG	I°	Tag 7	5 x 500 mg MP	Tag 11; OKT3/Tag 21; 5 x 500 MP
9	ATG	I°	Tag 7	5 x 500 mg MP	nein
10	ATG	I°	Tag 7	5 x 500 mg MP	Mo 2 und Mo 5; 5 x 500 MP
11	ATG	I°	Mo 2	5 x 500 mg MP	nein

### 7.1.1.2 Auftreten von CMV-Infektionen

Die Häufigkeit des Auftretens aktiver CMV-Infektionen innerhalb der 2 Gruppen ist in der Abb. 5 dargestellt. Die Patienten hatten klinische Symptome einer CMV-Infektion und ihre CMV-APAAP-Werte waren positiv. Alle Patienten mit einer aktiven CMV-Infektion bedurften einer i.v. Ganciclovir Therapie.

Zwei Patienten aus der ATG-Gruppe hatten eine CMV-Infektion innerhalb der ersten 4 Wochen nach Transplantation. Bei zwei weiteren ATG-Patienten wurde eine aktive CMV-Infektion zu den Zeitpunkten 2. und 11. Monat nach der Transplantation diagnostiziert und behandelt. Die CMV-Serologie-Konstellation war einmal Donor positiv/Empfänger negativ, zweimal Donor negativ/Empfänger positiv und einmal Donor/Empfänger beide negativ. Ein Patient aus der Basiliximab-Gruppe hatte in der 4 Woche nach Transplantation eine akute CMV-Infektion. Bei einem weiteren Basiliximab-Patienten kam es in der 13. Woche zu einer CMV-Infektion. Die CMV-Serologie war bei beiden Patienten Donor positiv/Empfänger negativ. Die ATG-Patienten hatten eine höhere Inzidenz an CMV-Infektionen im Vergleich zur Basiliximab-Patienten. Der Unterschied war aber nicht signifikant (Chi-Quadrat-Test,  $p > 0,05$ ).

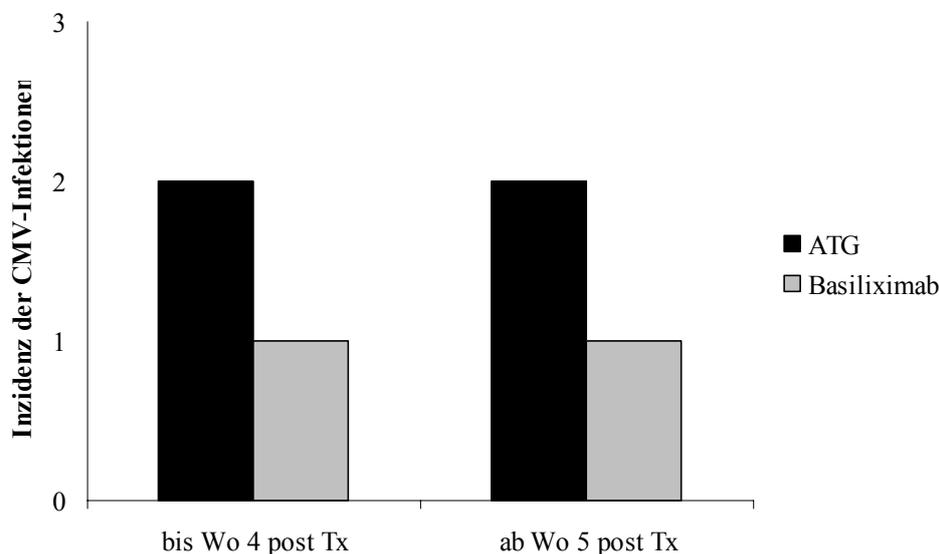


Abb. 5: Häufigkeit der CMV-Infektionen im Vergleich zwischen der ATG- und Basiliximab-Gruppe im ersten Monat und im Follow-up bis zu einem Jahr nach Transplantation

### 7.1.1.3 Andere Komplikationen

Im Verlauf des ersten Jahres post Tx hatten 2 Patienten aus der ATG-Gruppe eine Sepsis mit Multiorganversagen und ein Patient rezidivierendes Fieber unklarer Genese entwickelt (Tab. 5). Ein Patient wurde mit Verdacht auf Polyoma-Virus-Infektion aufgenommen. Eine Harnwegsinfektion trat bei 2 Patienten auf. Mit Ausnahme von einem Patienten hatten die Transplantate ihre Funktion sofort aufgenommen.

In der Basiliximab-Gruppe traten bei 2 Patienten Harnstauungen wegen einer Lymphozele auf. Eine Patientin hatte eine primäre Anurie wegen der subakuten tubulären Nekrose. Verzögerte Transplantatfunktionsaufnahmen waren bei 3 Empfängern zu diagnostizieren. 2 Empfänger hatten Komplikationen einer kardialen Dekompensation. Einer dieser Patienten ist im 8. Monat post Tx wegen kardiovaskulärer Komplikationen mit funktionierendem Transplantat verstorben.

Zusammenfassend waren mehr Infektionen als Komplikation in der ATG-Gruppe zu verzeichnen. Dieser Unterschied war signifikant ( $p < 0,05$  Chi-Quadrat-Test).

**Tab. 5 Signifikant mehr Komplikationen in der ATG-Patienten-Gruppe im Vergleich zu Basiliximab-Patienten im Follow-up bis zu einem Jahr post Tx ( $p < 0,05$  Chi-Quadrat-Test)**

<b>Komplikationen post Tx</b>	<b>ATG-Pat.</b>	<b>Basiliximab-Pat.</b>
Sepsis mit MOV	2	0
Fieber unklarer Genese	1	0
Kardiovaskuläre Komplikationen	0	2
Polyomavirus-Infektion	1	0
HWI	2	0
Lymphozele	0	2
ATN	0	1
DGF (delayed graft function)	1	3

#### **7.1.1.4 Kreatininspiegel**

Die Kreatininwerte der beiden Therapiegruppen im Verlauf des ersten Jahres nach Transplantation sind in der folgenden Graphik dargestellt. In den Monaten 1, 3 und 6 nach Nierentransplantation hatten die Basiliximab-Patienten höhere Kreatininspiegel im Vergleich zur ATG-Gruppe. Der Unterschied war aber nicht signifikant. Die Patienten der Basiliximab-Gruppe haben über das 1. Transplantationsjahr kontinuierlich ihre Kreatininwerte gesenkt jedoch nicht signifikant, während die Patienten der ATG-Gruppe nach dem 3. Transplantationsmonat bis zu einem Jahr post Tx konstante Kreatininwerte aufwiesen. Insgesamt hatten beide Gruppen bis zum Ende des 1. Transplantationsjahres vergleichbar gute

Kreatininwerte mit  $1,78 \pm 0,38$  mg/dl in der ATG- und  $1,36 \pm 0,13$  mg/dl in der Basiliximab-Gruppe.

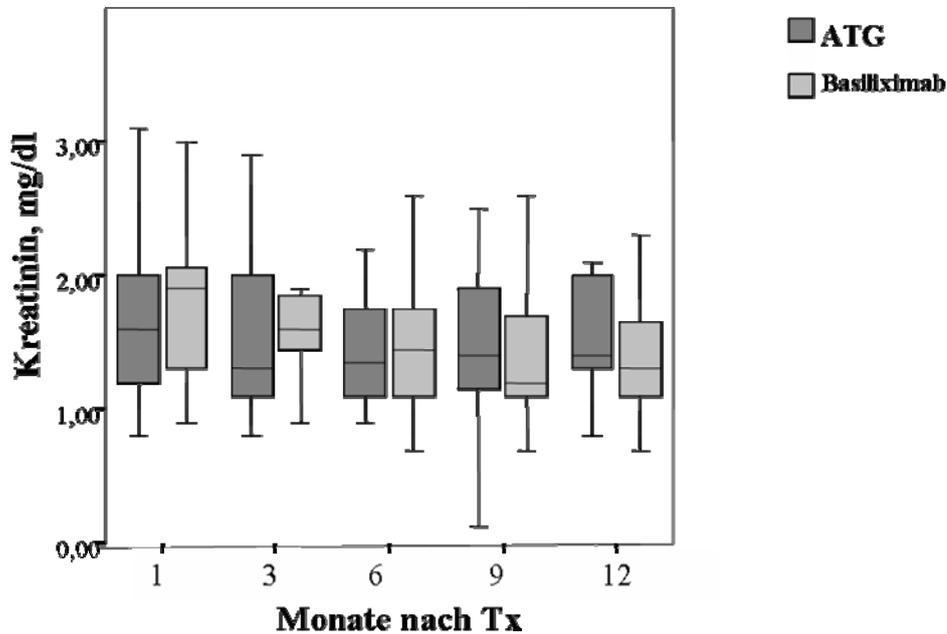


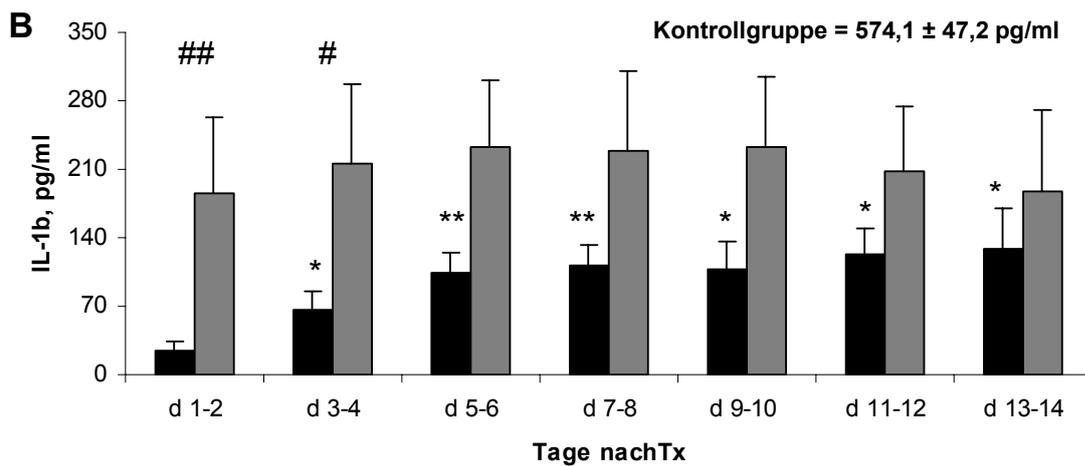
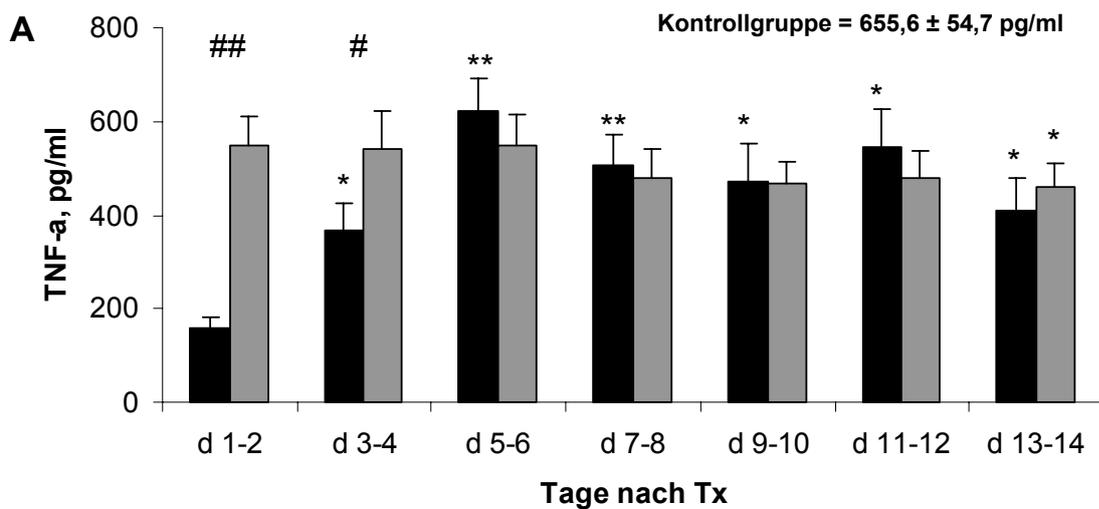
Abb. 6: Kreatininwerte im Follow-Up bis zu einem Jahr nach Transplantation im Vergleich zwischen den ATG- und Basiliximab-Patienten.

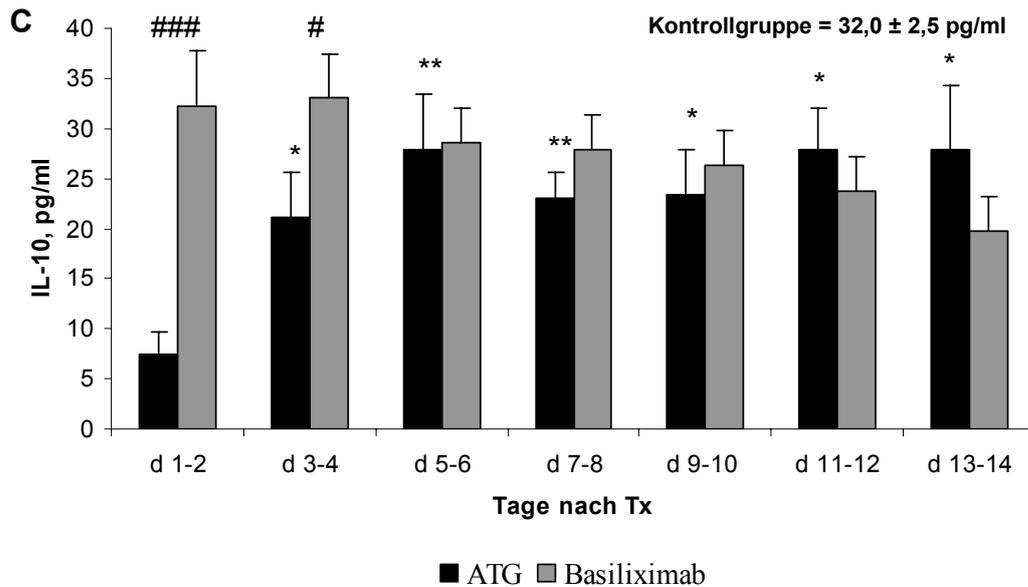
## 7.1.2 Ergebnisse der *in vitro* Funktionsteste

### 7.1.2.1 LPS-stimulierte Monokinfreisetzung

Die Freisetzung der Zytokine TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  und IL-10 in der Vollblutkultur nach LPS-Stimulation war signifikant niedriger in der ATG-Gruppe im Vergleich zur Basiliximab-Gruppe an den ersten 4 Tagen nach der Transplantation (TNF- $\alpha$ :  $p < 0,001-0,05$ ; IL-1 $\beta$ :  $p < 0,001-0,05$ ; IL-10:  $p < 0,001-0,05$  Mann-Whitney-U-Test). Wie bereits gezeigt, traten die ersten und meisten akuten Abstoßungen in der ATG-Gruppe zwischen den Tagen 6 und 7 nach der Transplantation auf. Parallel dazu ließ sich eine signifikante Erhöhung der LPS-induzierten TNF- $\alpha$ -, IL-1 $\beta$ - und IL-10-Sekretion in der Vollblutkultur bei ATG-Patienten vor dem Auftreten der akuten Abstoßungsepisoden bis zu den Tagen 5-6 post Tx feststellen (TNF- $\alpha$ :  $p < 0,05$  Tag 3 post Tx,  $p < 0,001$  Tag 5 post Tx; IL-1 $\beta$ :  $p < 0,05$  Tag 3 post Tx,  $p < 0,001$  Tag 5 post Tx; IL-10:  $p < 0,05$  Tag 3 post Tx,  $p < 0,001$  Tag 5 post Tx Wilcoxon-Test).

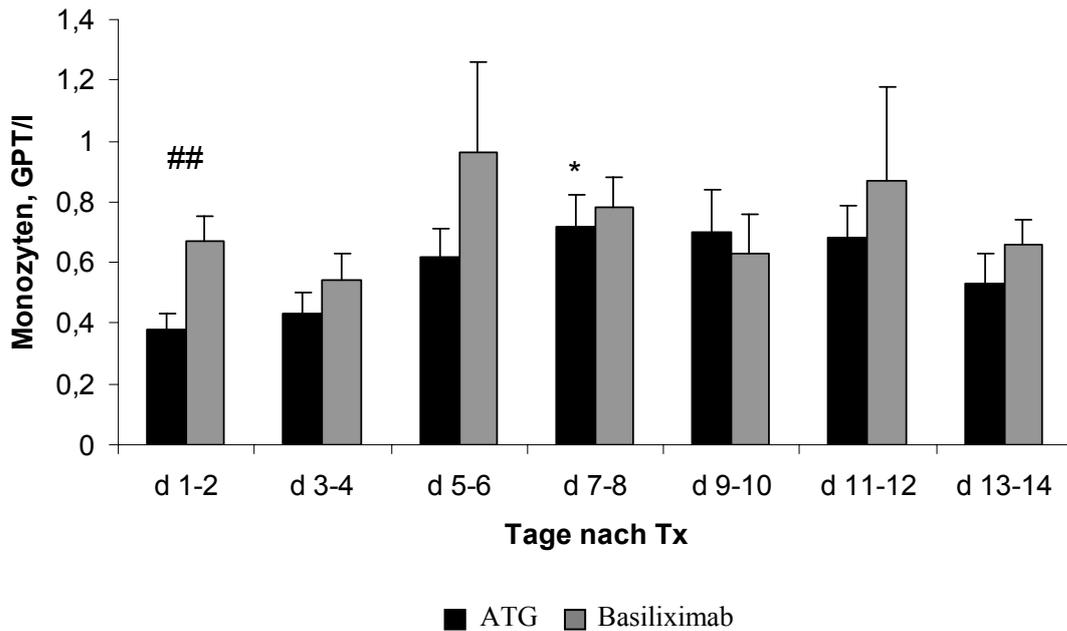
Zum Tag 7 post Tx hat sich die TNF- $\alpha$ - und IL-10-Freisetzung ( $p < 0,001$  Wilcoxon-Test) in der ATG-Gruppe signifikant reduziert, weil eine Hochdosisimmunsuppressionstherapie als Folge der Abstoßungsdiagnose begonnen wurde. In der Basiliximab-Gruppe war die TNF- $\alpha$ - und IL-1 $\beta$ -Sekretion gleichmäßig über die ersten 2 Wochen. Die IL-10-Freisetzung hat sich leicht von über 30 pg/ml bis auf 20 pg/ml reduziert. Die Freisetzung von Monokinen in der Vollblutkultur war deutlich in beiden Gruppen gegenüber normalen Probanden vermindert.





**Abb. 7:** Die LPS-induzierte Zytokinsekretion der Monozyten in der Vollblutkultur bei ATG- und Basiliximab-Patienten innerhalb der ersten 2 Wochen nach Transplantation. ATG bewirkte eine signifikante Verminderung der LPS-induzierten a) TNF- $\alpha$ , b) IL-1 $\beta$  und c) IL-10-Sekretion der Monozyten in der Vollblutkultur an den Tagen 1 bis 3 nach Transplantation im Vergleich zum Basiliximab (#  $p < 0,05$ , ##  $p < 0,001$ , ###  $p < 0,0001$  Mann-Whitney-U-Test). Bei ATG-Patienten war eine signifikante Erhöhung der Monokinsekretion zu verschiedenen Untersuchungszeitpunkten im Vergleich zum Tag 1 zu verzeichnen (\* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$  Wilcoxon-Test). Rechts oben sind die Zytokinwerte (Mittelwert  $\pm$  SEM) von gesunden Kontrollprobanden dargestellt. Die Monokinsekretion war in beiden Patientengruppen deutlich niedriger als bei Kontrollprobanden.

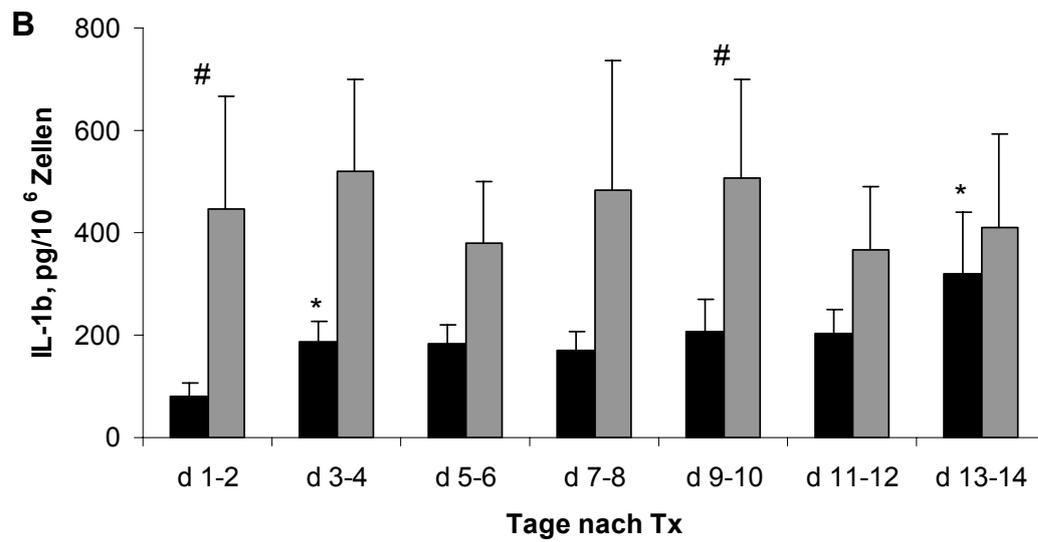
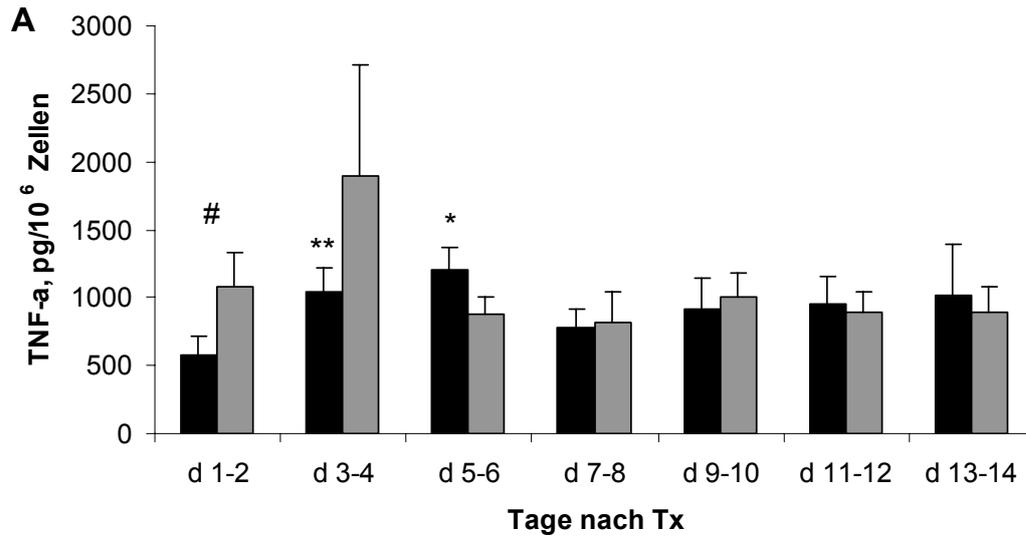
Da Monozyten die Hauptquelle der gemessenen Zytokine sind, ist eine Vergleichbarkeit der Ergebnisse zwischen den beiden Patientengruppen an den entsprechenden Tagen nach der Transplantation abhängig vom Monozytengehalt der Kulturen. Wir bestimmten diesen indirekt aus dem Differentialblutbild und der Leukozytenzählung. Die Abb. 8 zeigt die absolute Monozytenzahl im Vergleich zwischen der ATG- und Basiliximab-Gruppe. Die Monozytenzahl war im gesamten Beobachtungszeitraum in der ATG-Gruppe deutlich niedriger als in der Basiliximab-Gruppe mit einem signifikanten Unterschied am Tag 1.



**Abb. 8: Absolute Monozytenzahl.** Unter ATG kam es zu einer deutlichen Verminderung der Monozyten im peripheren Blut im Vergleich zum Simulect mit einem signifikanten Unterschied am Tag 1 nach Transplantation (##  $p < 0,001$  Mann-Whitney-U-Test). Die Monozytenzahl der ATG-Patienten war signifikant am Tag 7 zum Vergleich Tag 1 erhöht (\*  $p < 0,05$  Wilcoxon-Test).

Anschließend wurde die Zytokinfreisetzung pro Zellzahl nach der Formel „**Konzentration** (pg/ml)/Zellzahl ( $10^9/l$ )= pg/ $10^6$ Zellen“ für jeden Patienten zu jedem Zeitpunkt der Untersuchung berechnet.

Wenn man jetzt die Sekretion von TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  und IL-10 bezogen auf die Zahl der Monozyten betrachtet, sieht man, dass die Freisetzung dieser Zytokine (IL-1 $\beta$ , Tag 1 post Tx:  $p < 0,05$  Mann-Whitney-U-Test) an den Tagen 1 und 3 post Tx in der ATG-Gruppe im Vergleich zur Basiliximab-Gruppe nicht nur absolut (pro ml Blut), sondern auch relativ (pro Monozytenzahl) vermindert ist. ATG unterdrückt somit besser die Freisetzung von Monokinen. Beachtenswert ist, dass mehr akute Abstoßungen in der ATG-Gruppe trotz dieser besseren immunsuppressiven Potenz in der Unterdrückung von immunologisch-vermittelten Transplantatschädigungen diagnostiziert wurden.



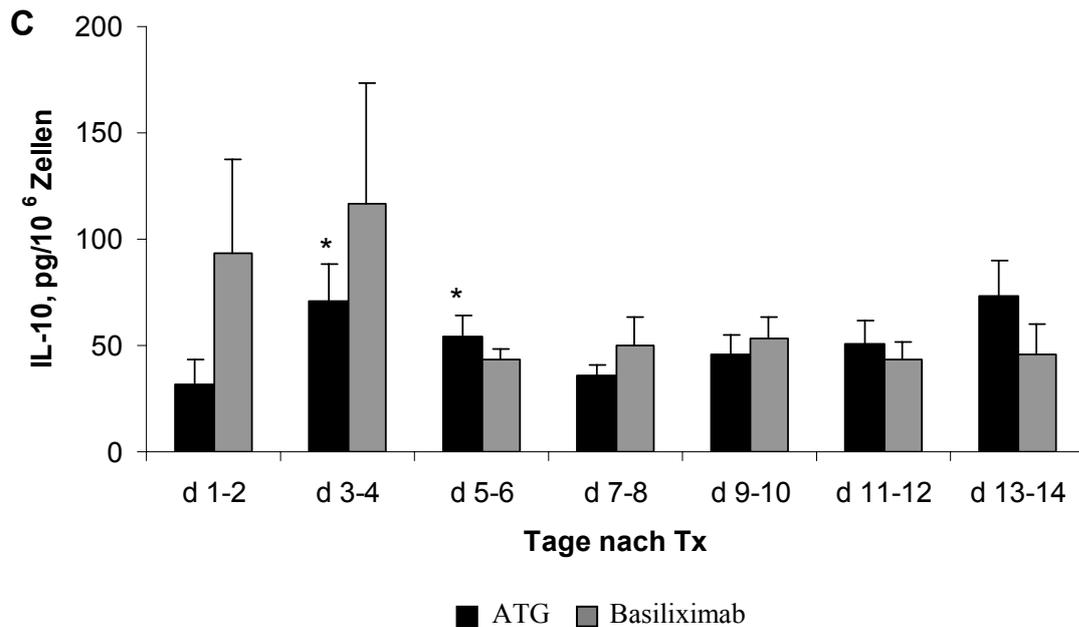


Abb. 9: Die Freisetzung von Zytokinen a) TNF- $\alpha$ , b) IL-1 $\beta$  und c) IL-10 bezogen auf die absolute Zahl der Monozyten. ATG bewirkte eine signifikante Verminderung der LPS-induzierten a) TNF- $\alpha$  und b) IL-1 $\beta$ -Sekretion der Monozyten in der Vollblutkultur pro Zellzahl an den Tagen 1 bis 3 nach Transplantation im Vergleich zum Basiliximab (#  $p < 0,05$  Mann-Whitney-U-Test). Bei ATG-Patienten war eine signifikante Änderung der Monokinsekretion pro Zellzahl im Verlauf im Vergleich zum Tag 1 zu verzeichnen (\* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$  Wilcoxon-Test).

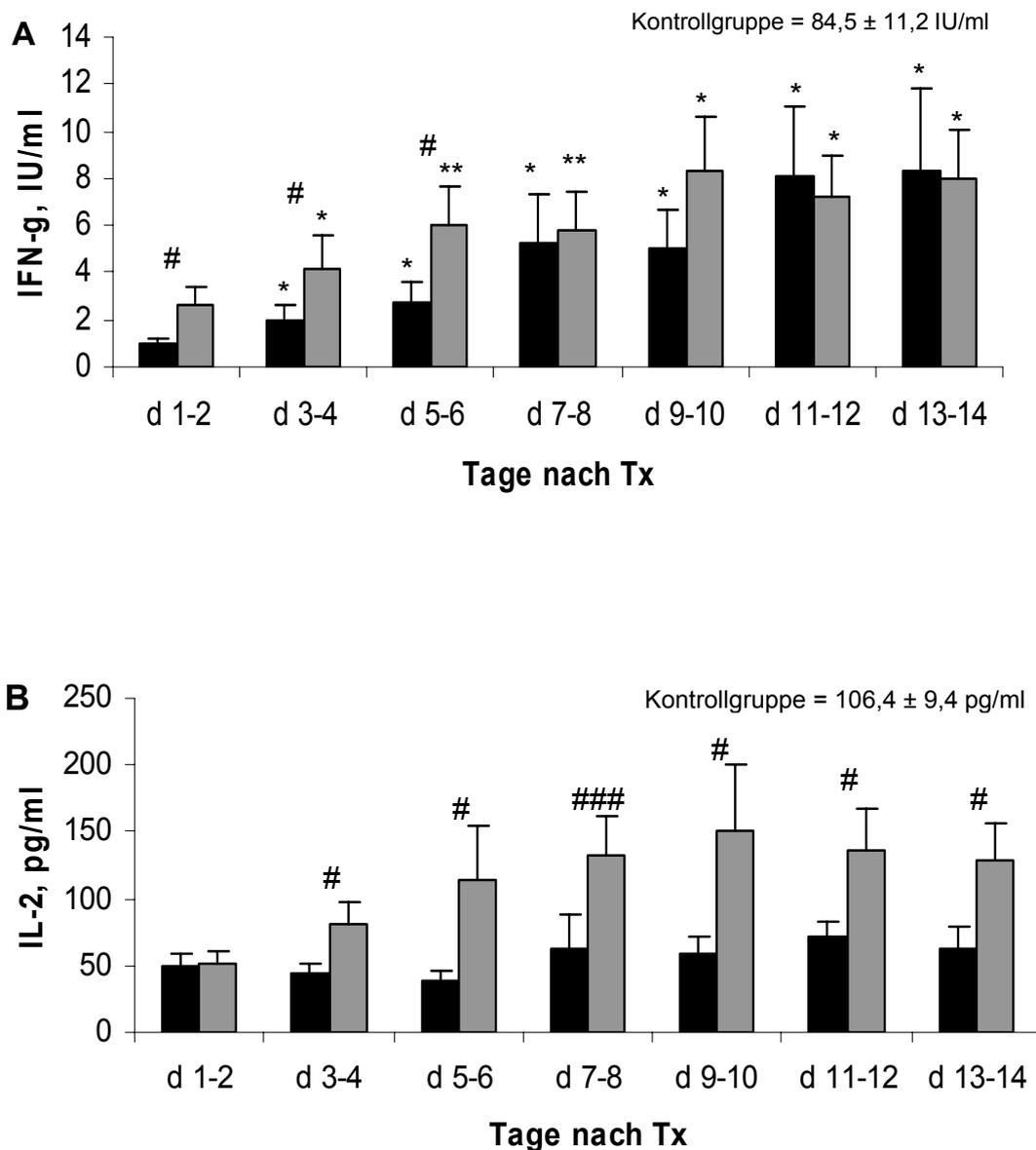
#### 7.1.2.2 ConA-induzierte T-Zell-Zytokinfreisetzung

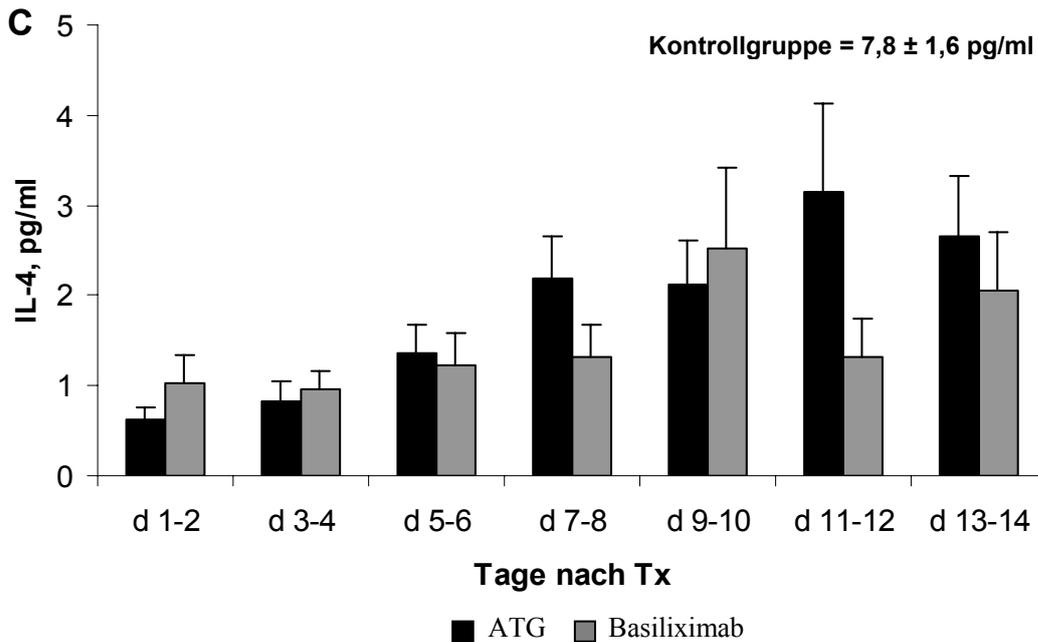
Im Vergleich der ConA-induzierten Freisetzung von Th1-Zell-Zytokinen ließ sich ebenfalls eine Reihe von Unterschieden zwischen der ATG- und Basiliximab-Gruppe nachweisen. So lag die IFN- $\gamma$ - und IL-2-Freisetzung (Abb. 10a/b) in der Basiliximab-Gruppe signifikant höher als in der ATG-Gruppe ( $p < 0,05$  Tage 1, 3, 5 post Tx Mann-Whitney-U-Test für IFN- $\gamma$ ;  $p < 0,05$  Tage 3, 5, 9, 11, 13 post Tx,  $p < 0,001$  Tag 7 post Tx Mann-Whitney-U-Test für IL-2). In der ATG-Gruppe fand sich eine signifikante Erhöhung der IFN- $\gamma$ -Freisetzung in den ersten 5 Tagen nach Transplantation, eine geringe Verminderung zum Tag 7 und wieder eine signifikante Erhöhung bis zum Tag 13 post Tx verglichen mit dem Tag 1 ( $p < 0,05$  Wilcoxon-Test). Die IL-2-Sekretion im zeitlichen Verlauf zeigte keinen signifikanten Unterschied im Vergleich zum Tag 1 post Tx in der ATG-Gruppe.

In der Basiliximab-Gruppe war eine signifikante Erhöhung der IFN- $\gamma$ -Produktion von T-Zellen nach ConA-Stimulation zu verschiedenen Untersuchungszeitpunkten in den ersten 2 Wochen post Tx im Vergleich zum Tag 1 post Tx zu verzeichnen ( $p < 0,05$ ,  $p < 0,01$  Wilcoxon-Test).

Für die Th2-Zell-Zytokin (IL-4)-Freisetzung konnte man keine signifikanten Unterschiede im Vergleich zwischen den Behandlungsgruppen und innerhalb der einzelnen Gruppen feststellen.

Die gemessenen IFN- $\gamma$ -Spiegel lagen in beiden Patientengruppen signifikant niedriger als bei Kontrollprobanden. Die ConA-induzierte IL-2- und IL-4-Sekretion bei den Transplantierten war ebenfalls deutlich niedriger als bei gesunden Kontrollprobanden.





**Abb. 10:** ConA-induzierte a) IFN- $\gamma$ , b) IL-2 und c) IL-4-Sekretion in der Vollblutkultur im Vergleich zwischen ATG- und Basiliximab-Gruppe. ATG verminderte signifikant die ConA-induzierte IFN- $\gamma$ -Sekretion von T-Zellen an den Tagen 1 bis 6 und die ConA-induzierte IL-2-Freisetzung in den ersten 2 Wochen nach der Transplantation im Vergleich zum Basiliximab (#  $p < 0.05$ , ###  $p < 0,0001$  Mann-Whitney-U-Test). In beiden Gruppen war eine signifikante Erhöhung der ConA-stimulierten IFN- $\gamma$ -Sekretion zu verschiedenen Untersuchungszeitpunkten im Vergleich zum Tag 1 nachzuweisen (\* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0,001$  Wilcoxon-Test). Die Spiegel der ConA-induzierten T-Zell-Zytokine der Transplantierten lagen deutlich niedriger als bei Kontrollprobanden. Rechts oben sind die Werte (Mittelwert  $\pm$  SEM) von gesunden Kontrollprobanden dargestellt.

Die Lymphozyten sind die Hauptproduzenten von T-Zell-Zytokinen. Um die Ergebnisse der einzelnen Gruppen in Abhängigkeit vom Lymphozytengehalt zu vergleichen, wurde die Lymphozytenzahl ebenso wie bei Monozyten indirekt aus dem Differentialblutbild und der Leukozytenzählung bestimmt. Die folgende Abbildung zeigt die Lymphozytenzahl in beiden Gruppen. Sie ist signifikant vermindert in der ATG-Gruppe im Vergleich zur Basiliximab-Gruppe ( $p < 0,001$  Mann-Whitney-U-Test). Die Lymphozytenzahl innerhalb der beiden Gruppen war signifikant im Verlauf im Vergleich zum Tag 1 nach Transplantation erhöht ( $p < 0,05$ ,  $p < 0,01$  Wilcoxon-Test).

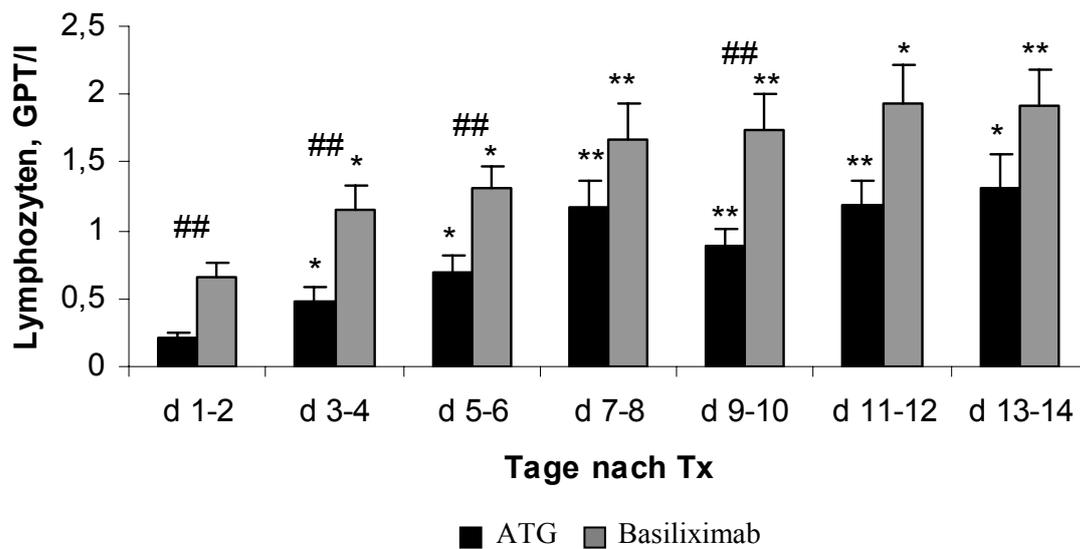
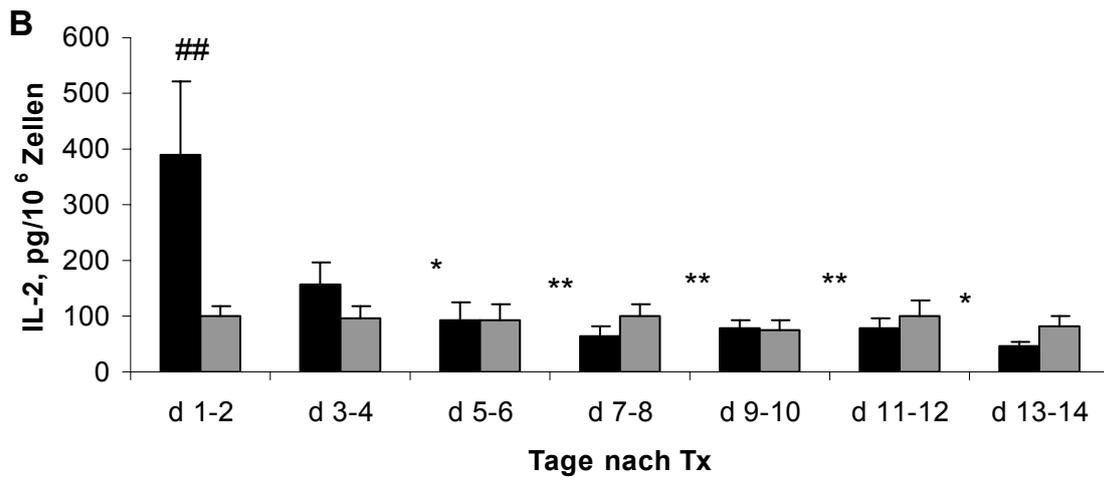
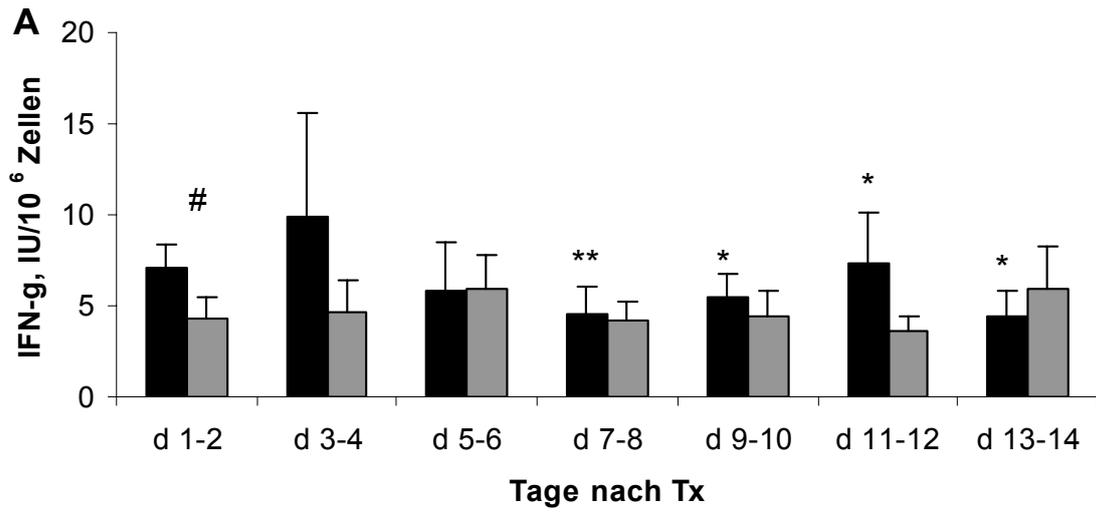


Abb. 11: Absolute Lymphozytenzahl. Unter ATG kam es zu einer signifikanten Verminderung der Lymphozyten im peripheren Blut im Vergleich zum Basiliximab (##  $p < 0,001$  Mann-Whitney-U-Test). Die Lymphozytenzahl innerhalb der beiden Gruppen war signifikant im Verlauf im Vergleich zum Tag 1 nach Transplantation erhöht (\*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,001$  Wilcoxon-Test).

Nach der gleichen Formel wie beim Monozytentest wurde die Zytokinproduktion pro Zellzahl berechnet. Die Patientengruppen wurden hinsichtlich dieser verglichen (Abb.12). Die IFN- $\gamma$ - und IL-2-Sekretion pro  $10^6$  Zellen (Lymphozyten) wurde unter Basiliximab stärker gehemmt im Vergleich zu ATG trotz der höheren absoluten Lymphozytenzahl in der Basiliximab-Gruppe. In der ATG-Gruppe war die Th1-Zell-Zytokinfreisetzung bezogen auf die Lymphozytenzahl in den ersten 3 Tagen nach Transplantation gegenüber Basiliximab-Gruppe erhöht (IL-2:  $p < 0,005$  Mann-Whitney-U-Test).

Die ConA-induzierte IL-4-Freisetzung pro Lymphozyten war signifikant angestiegen in der ATG-Gruppe über den Zeitraum von Tag 1 bis zum Tag 9 post Tx. In der Basiliximab-Gruppe war die IL-4-Sekretion durchschnittlich gleichmäßig über die gesamte Untersuchungszeit.



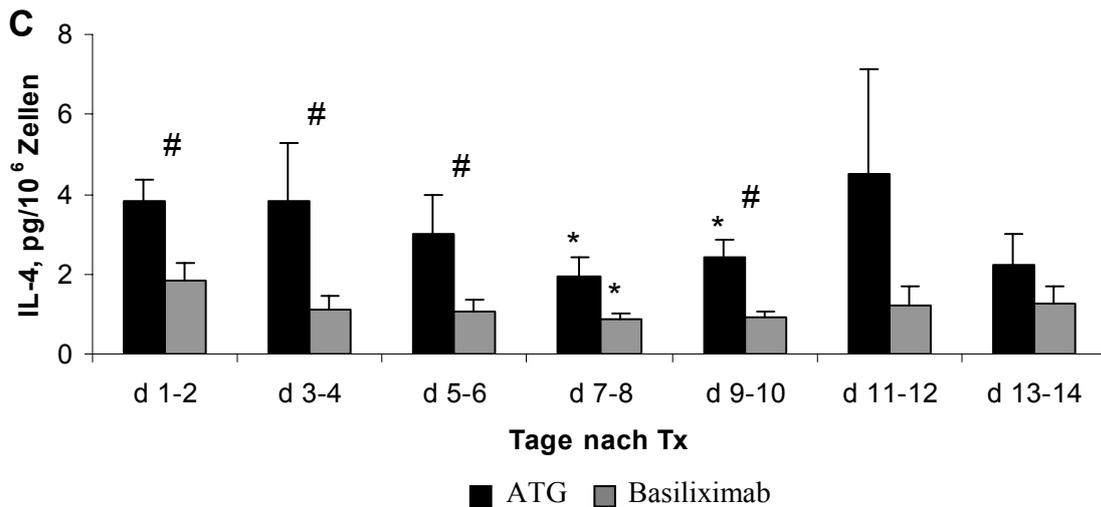


Abb. 12: Die Freisetzung von Zytokinen a) IFN- $\gamma$ , b) IL-2 und c) IL-4 nach ConA-Stimulation bezogen auf die absolute Lymphozytenzahl. Trotz der verminderten Lymphozytenzahl war aber die T-Zell-Zytokin-Produktion bezogen auf Zellzahl signifikant erhöht in der ATG-Gruppe. Somit hemmt Basiliximab stärker die Zytokinfreisetzung von T-Zellen an den ersten Tagen nach Transplantation (#  $p < 0.05$ , ##  $p < 0.001$  Mann-Whitney-U-Test). Die ATG-Patienten hatten signifikant niedrige T-Zell-Zytokin-Spiegel pro Zellzahl besonders der IL-2-Sekretion zu verschiedenen Untersuchungszeitpunkten im Vergleich zum Tag 1 nach Transplantation (\*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.001$  Wilcoxon-Test).

### 7.1.2.3 Fluozytometrische Quantifizierung von HLA-DR- und CD86-Expression auf CD14+ Monozyten

Die HLA-DR-Expression auf CD14+Monozyten war signifikant am Tag 1 nach Transplantation bei ATG-Patienten gegenüber Basiliximab-Patienten erhöht ( $p < 0.05$  Mann-Whitney-U-Test). Auch im weiteren Verlauf waren die Werte in der ATG-Gruppe leicht jedoch nicht signifikant erhöht. In der Basiliximab-Gruppe war die Expression von HLA-DR konstant über die ersten 2 Wochen nach Transplantation. Sie betrug ungefähr 12000-14000 mAb/Zelle. Die CD86-Expression auf Monozyten war vergleichbar zwischen den beiden Gruppen während der ersten 2 Wochen nach Transplantation. In der Basiliximab-Gruppe war eine signifikante Verminderung der HLA-DR-Expression am Tag 3 und eine signifikante Erhöhung der CD86-Expression auf Monozyten an den Tagen 3, 5 und Woche 2 im Vergleich zum Tag 1 nach Transplantation nachzuweisen ( $p < 0.05$  Wilcoxon-Test).

Die HLA-DR- und CD86-Expression auf Monozyten war in beiden Patientengruppen im Vergleich zu gesunden Kontrollprobanden signifikant vermindert.

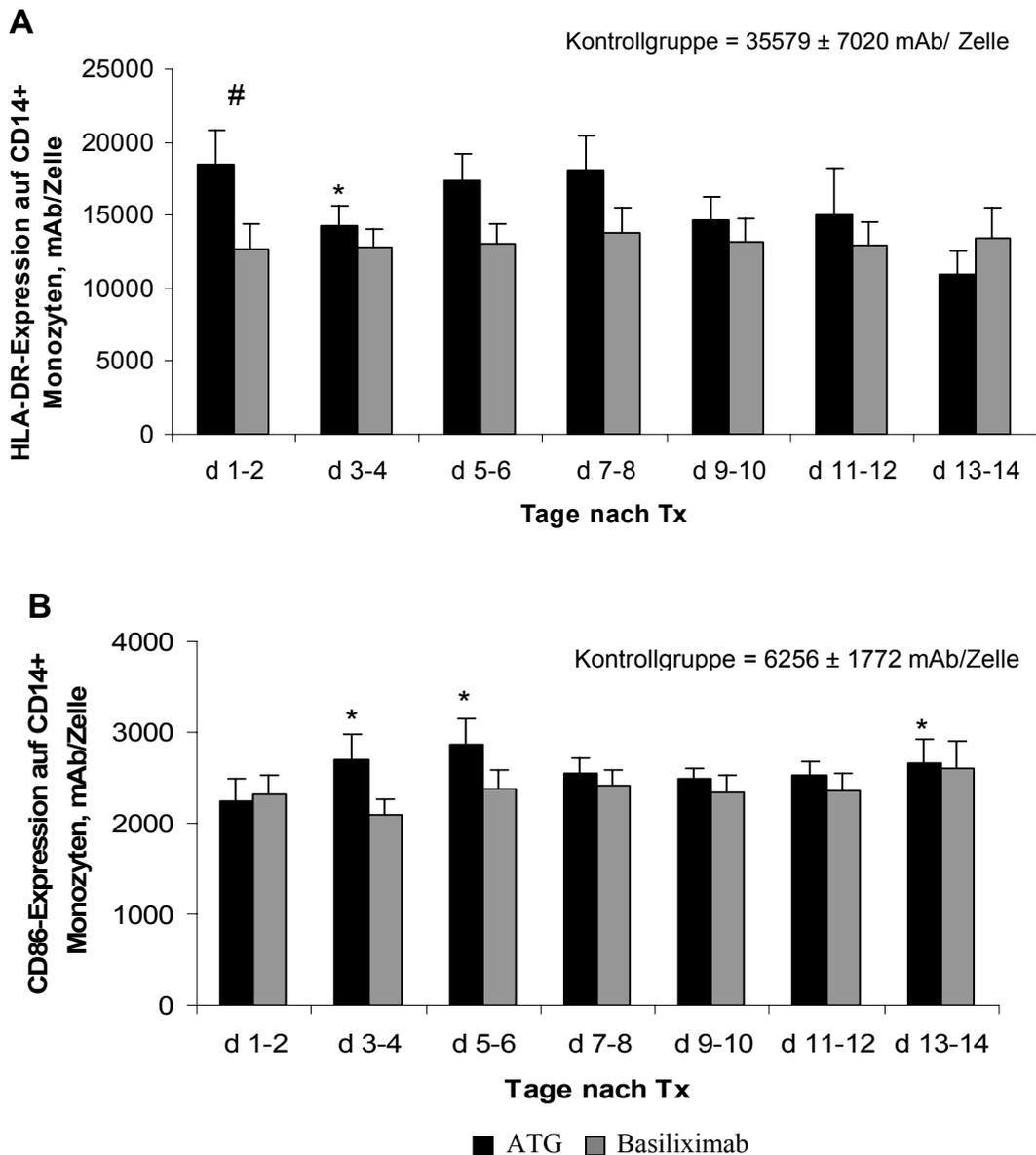
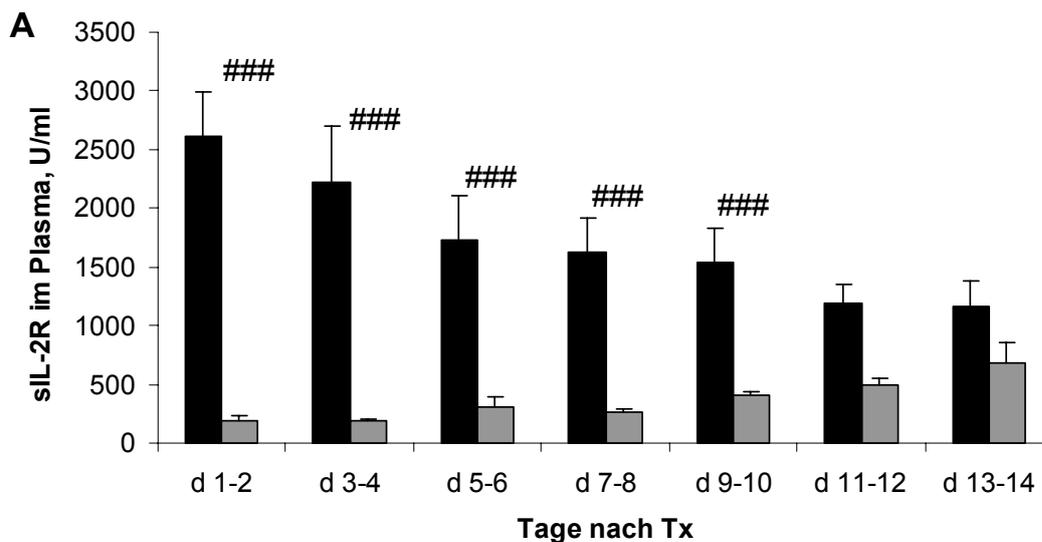


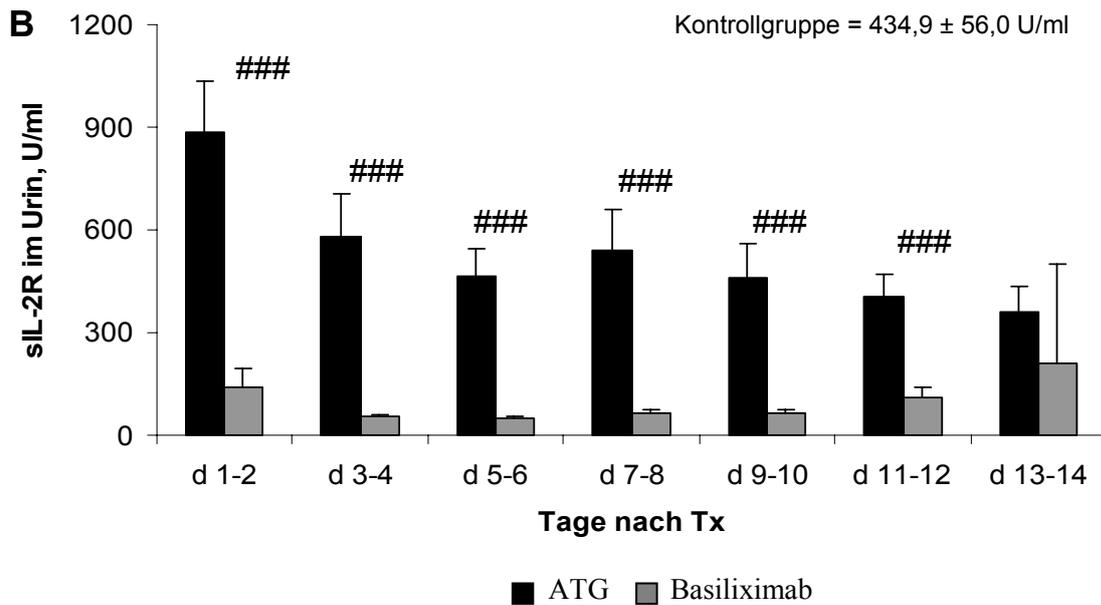
Abb. 13: a) HLA-DR- und b) CD86-Expression auf CD14+ Monozyten. Es war eine signifikant verminderte HLA-DR-Expression am Tag 1 post Tx in der Basiliximab-Gruppe im Vergleich zur ATG-Gruppe nachzuweisen (#  $p < 0,05$  Mann-Whitney-U-Test). In der Basiliximab-Gruppe zeigte sich eine signifikante Verminderung der HLA-DR-Expression am Tag 3 und eine signifikante Erhöhung der CD86-Expression auf Monozyten an den Tagen 3, 5 und Woche 2 im Vergleich zum Tag 1 nach Transplantation ( $*p < 0,05$  Wilcoxon-Test). Die HLA-DR- und CD86-Expression auf Monozyten war in den Patientengruppen signifikant im Vergleich zu gesunden Kontrollprobanden vermindert. Oben rechts sind die Werte (Mittelwert ± SEM) für HLA-DR/CD86-Expression auf CD14+ Monozyten von gesunden Kontrollprobanden dargestellt.

#### 7.1.2.4 Bestimmung des löslichen IL-2R im Plasma und Urin und der Zytokine IL-6, IL-8 und TNF- $\alpha$ im Urin

Die Konzentration von sIL-2R in Plasma und Urin war signifikant in der Basiliximab-Gruppe im Vergleich zur ATG-Gruppe vermindert ( $p < 0.0001$  Mann-Whitney-U-Test). Der Urin-sIL-2R war bei den meisten Patienten in der Basiliximab-Gruppe am IMMULITE® Automated Analyzer nicht detektierbar. Diese Werte von  $< 50$  UI/ml wurden als 50 IU/ml in die Datenbank eingegeben und ausgewertet. Demgegenüber waren die sIL-2R-Spiegel in Plasma und Urin in der ATG-Gruppe direkt nach Transplantation stark angestiegen. Diese Spiegel haben sich signifikant innerhalb der ersten 14 Tage nach Transplantation reduziert ( $p < 0,05-0,0001$  Wilcoxon-Test).

Die Vergleiche der Zytokinmessungen IL-6, IL-8 und TNF- $\alpha$  im Urin zwischen beiden Gruppen erbrachten keine signifikanten Unterschiede.





**Abb. 14:** Die Spiegel von löslichem IL-2R in Plasma (A) und Urin (B) im Vergleich zwischen ATG- und Basiliximab- Patienten in den ersten 14 Tagen nach Transplantation. In der Basiliximab-Gruppe hatten die Patienten signifikant verminderte sIL-2R-Spiegel im Plasma und im Urin im Vergleich zu ATG-Patienten (###  $p < 0,0001$  Mann-Whitney-U-Test). Oben rechts sind die Werte (Mittelwert  $\pm$  SEM) für s-IL-2R-Spiegel im Urin von gesunden Kontrollprobanden dargestellt.

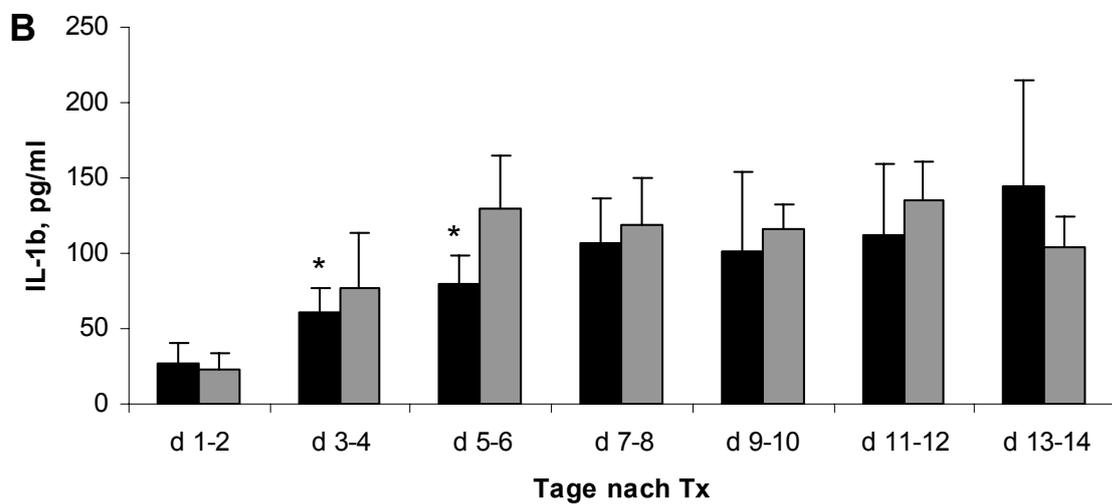
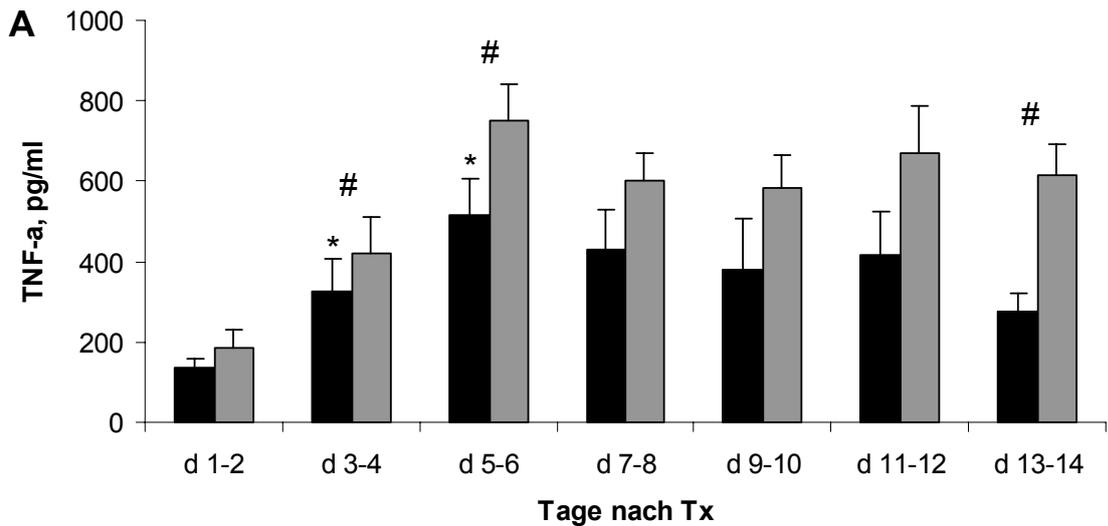
## 7.2 Vergleich zwischen den Patienten mit Abstoßung (Rx) und mit stabiler Funktion (non Rx)

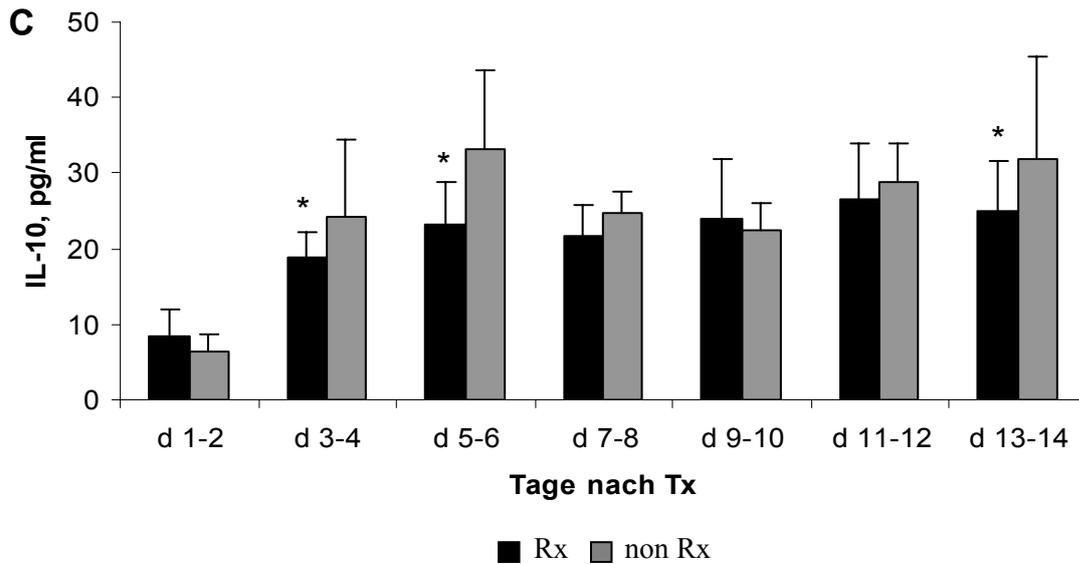
Wie bereits gezeigt, haben 7 Patienten aus der ATG-Gruppe (n=14) ihr Transplantat in der Frühphase akut abgestoßen. Um Aussagen über die Vorhersagbarkeit dieses Abstoßungsereignisses zu treffen und damit die Möglichkeiten einer individualisierten Immunsuppression zu erschließen, wurden die Ergebnisse von Untersuchungen innerhalb der ATG-Gruppe in Abhängigkeit vom Ereignis akute Abstoßung als Rejektionsgruppe (Rx-Gruppe) oder stabile Transplantatfunktion (non Rx-Gruppe) statistisch ausgewertet.

### 7.2.1 LPS-stimulierte Zytokinfreisetzung

Überraschenderweise hatten die Patienten mit akuter Abstoßung eine signifikant verminderte LPS-induzierte Freisetzung von Zytokinen TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  und IL-10 vor dem Auftreten der ersten akuten Abstoßungsepisoden im Vergleich zu Patienten ohne Abstoßung in der Frühphase (TNF- $\alpha$ , Tag 3 und 5 post Tx:  $p < 0,05$  Mann-Whitney-U-Test). Ein signifikanter Anstieg der Monokinfreisetzung wurde in der Rx-Gruppe bis zum Tag 5 im Vergleich zum Tag 1 nach Transplantation, d.h. kurz vor dem Auftreten der ersten akuten Abstoßungen,

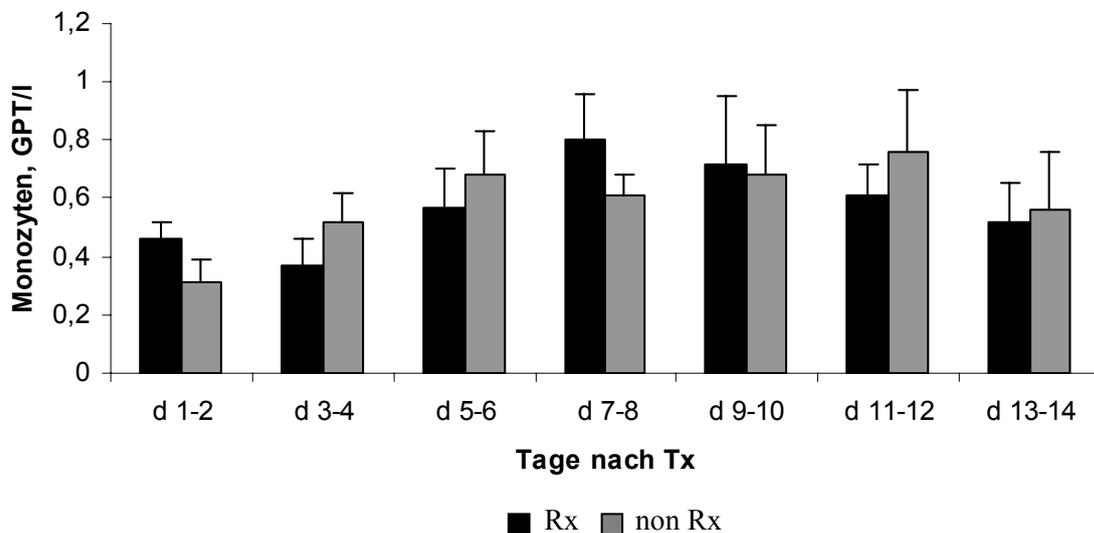
festgestellt ( $p < 0,05$  Wilcoxon-Test). Diese angestiegenen Zytokinspiegel waren rückläufig wegen der Abstoßungstherapie der ersten Rx-Patienten, für TNF- $\alpha$  und IL-10 nach dem Tag 5 post Tx, IL-1 $\beta$  nach dem Tag 7 post Tx. Bei non Rx-Patienten kam es ebenso zu einem deutlichen Anstieg der Monokinsekretion bis zum Tag 5, die Werte blieben aber im weiteren Verlauf unverändert konstant.





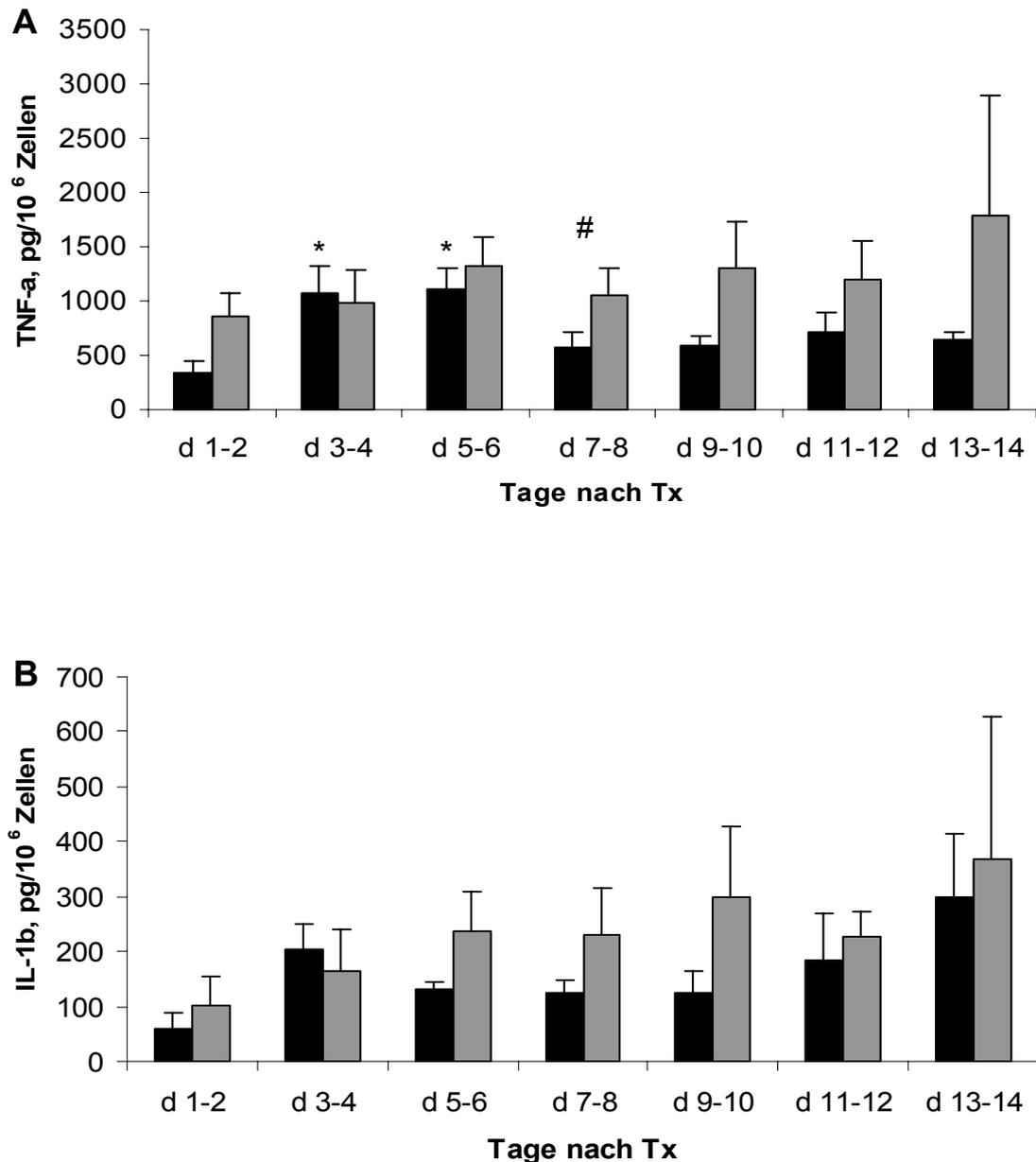
**Abb. 15:** Die LPS-induzierte Zytokinsekretion der Monozyten in der Vollblutkultur bei Rx- und non-Rx-Patienten. Überraschenderweise hatten die Rx-Patienten deutlich niedrige Spiegel der LPS-induzierten a) TNF- $\alpha$ , b) IL-1 $\beta$  und c) IL-10-Sekretion der Monozyten in der Vollblutkultur an den Tagen 1 bis 6 nach Transplantation im Vergleich zu non-Rx-Patienten (TNF- $\alpha$ , Tag 3-6: #  $p < 0,05$  Mann-Whitney-U-Test). Innerhalb der ersten 6 Tage kam es zu einer Erhöhung der Monokinsekretion in beiden Patientengruppen im Vergleich zum Tag 1 post Tx, die in der Rx-Gruppe signifikant war (\*  $p < 0,05$  Wilcoxon-Test).

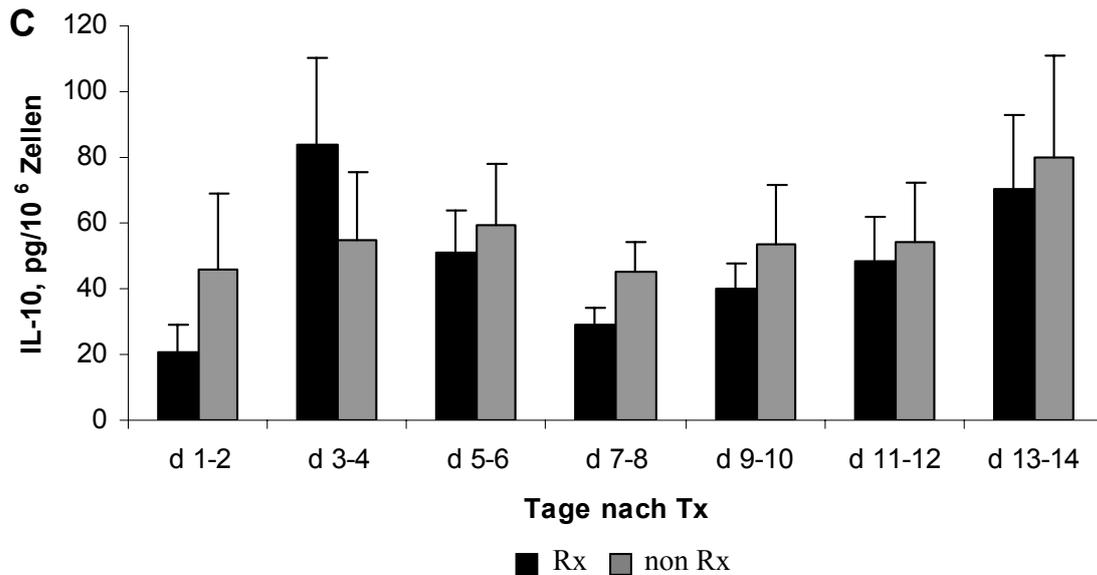
Die folgende Abbildung zeigt die absolute Monozytenzahl innerhalb der ATG-Gruppe hinsichtlich der Rx- und non Rx-Gruppe. Es bestanden dabei keine signifikanten Unterschiede im Vergleich der beiden Gruppen.



**Abb. 16: Die absolute Monozytenzahl. Es bestand kein signifikanter Unterschied zwischen den Rx- und non Rx-Patienten.**

Verglichen mit der non Rx-Gruppe war die Zytokinsekretion in der Vollblutkultur bezogen auf die Zellzahl ( $\text{pg}/10^6$  Zellen) deutlich vermindert in der Rx-Gruppe mit Ausnahme des Tages 3 nach Transplantation. Eine Signifikanz ließ sich jedoch nicht festzustellen.



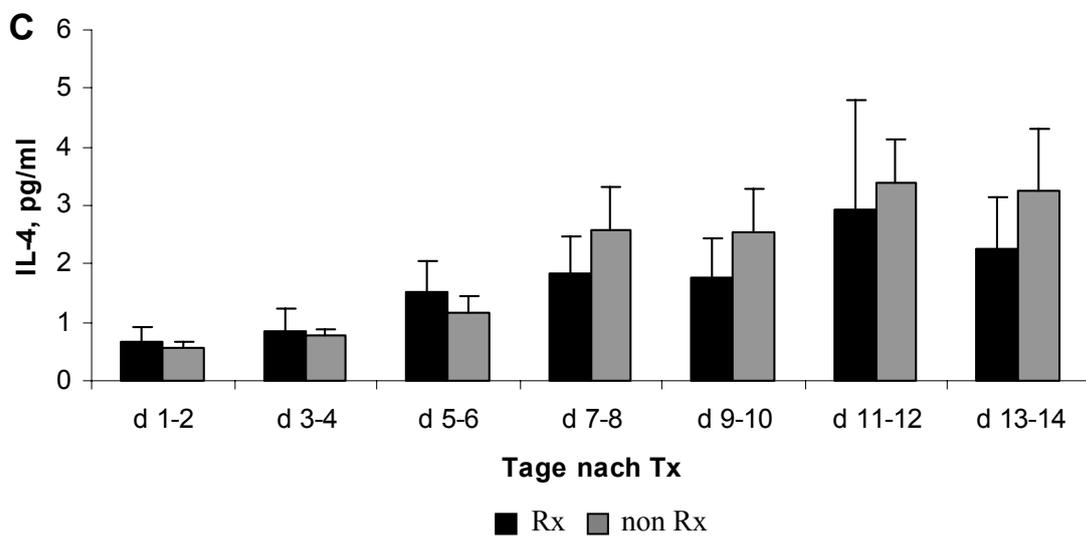
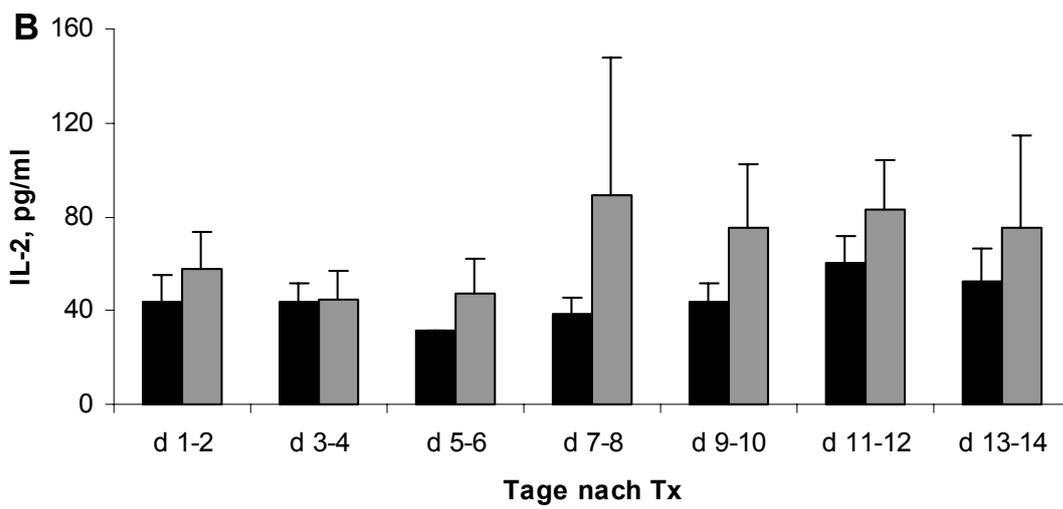
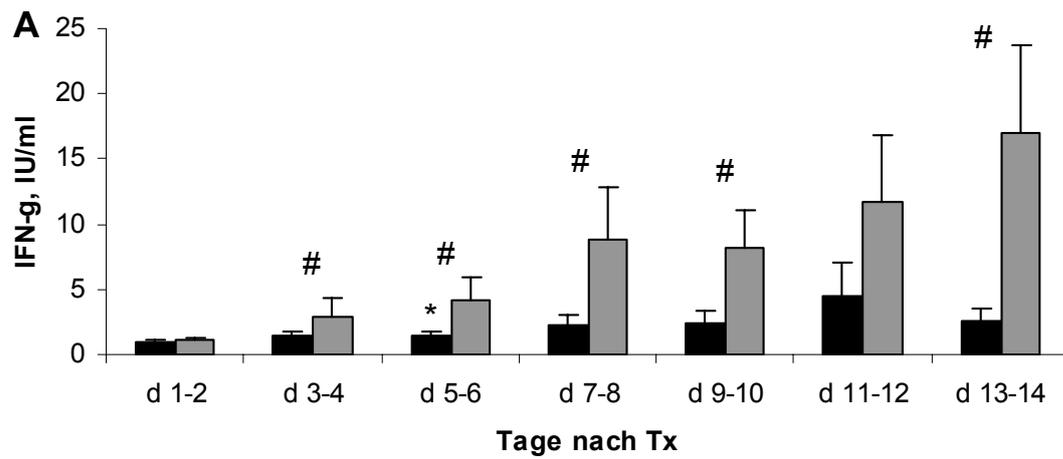


**Abb. 17:** Die LPS-induzierte Zytokinsekretion a) TNF- $\alpha$ , b) IL-1 $\beta$  und c) IL-10 bezogen auf die absolute Zahl der Monozyten. Rx-Patienten zeigten eine deutlich verminderte Zytokinsekretion der Monozyten in der Vollblutkultur pro Zellzahl.

Zusammenfassend erlitten die Patienten in der Rx-Gruppe eine akute Abstoßung trotz verminderter Sekretionskapazität proinflammatorischer Zytokine, betrachtet als Absolutwert oder bezogen auf die Zellzahl. Alle transplantierten Patienten der ATG-Gruppe hatten im Vergleich zu gesunden Probanden eine verminderte LPS-induzierte Freisetzung von Monokinen in der Vollblutkultur.

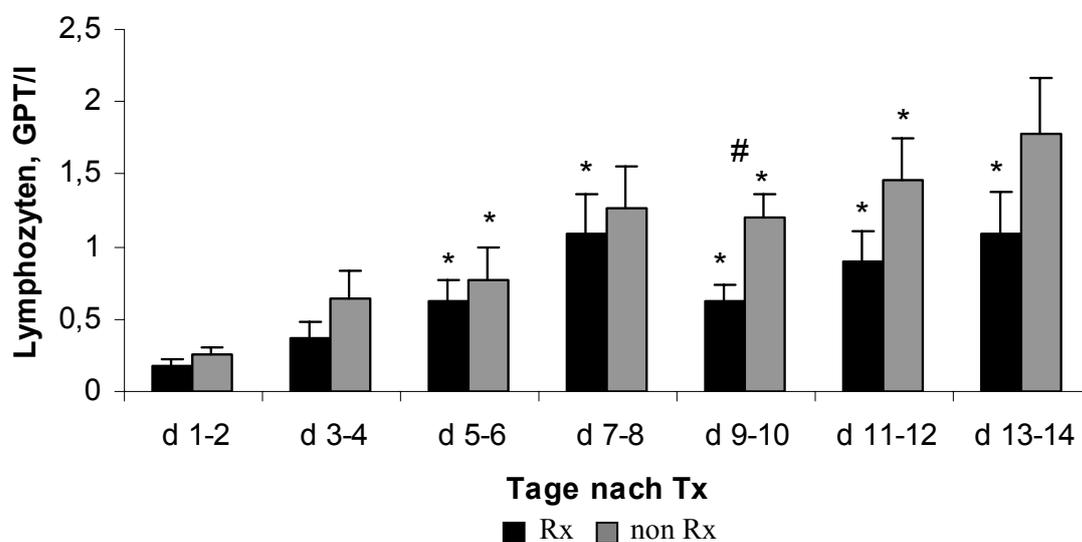
### 7.2.2 ConA-induzierte T-Zell-Zytokinfreisetzung

Die ConA-induzierte IFN- $\gamma$ -Sekretion (Abb. 18a) war in der Rx-Gruppe interessanterweise signifikant vermindert vor dem Auftreten der ersten akuten Abstoßungsepisoden im Vergleich zur non Rx-Gruppe ( $p < 0,05$  Mann-Whitney-U-Test). Auch nach den Abstoßungen und Abstoßungstherapien bestand eine signifikant verminderte Freisetzung von IFN- $\gamma$  in der Rx-Gruppe. Die IFN- $\gamma$ -Spiegel lagen auf konstantem Niveau zwischen 1,0-1,5 IU/ml über die ersten 7 Tage nach Transplantation. Die IL-2-Sekretion war ebenso im gesamten Untersuchungszeitraum in der Rx-Gruppe deutlich vermindert jedoch ohne statistische Signifikanz. Die IL-4-Spiegel waren gering erhöht an den ersten Tagen nach Transplantation bei Rx-Patienten (Abb. 18b/18c). Der Unterschied war aber nicht signifikant.



**Abb. 18:** ConA-induzierte a) IFN- $\gamma$ , b) IL-2 und c) IL-4-Sekretion der T-Zellen in der Vollblutkultur im Vergleich zwischen Rx- und non Rx-Patienten. Die Rx-Patienten hatten eine verminderte Th1-Antwort im Vergleich zu non Rx-Patienten (ConA-induzierte IFN- $\gamma$ , Tage 3-10: #  $p < 0.05$  Mann-Whitney-U-Test).

Die absolute Lymphozytenzahl, die aus dem peripheren Differentialblutbild und der Leukozytenzählung zu jedem Zeitpunkt der Untersuchung berechnet wurde, ist in der folgenden Abbildung dargestellt. Die Lymphozytenzahl in der Peripherie ist bei den Rx-Patienten deutlich erniedrigt gegenüber non Rx-Patienten besonders an den ersten 5 Tagen nach Transplantation. Eine Erklärung dafür könnte sein, dass die Lymphozyten ins Transplantat einwandern und somit nicht in der Peripherie nachweisbar sind. Die absolute Lymphozytenzahl in der Rx-Gruppe stieg weiter bis zum Tag 7 nach Transplantation an. Das war der Zeitraum, wo die meisten akuten Abstoßungen stattgefunden haben. Danach reduziert sich signifikant die Zellzahl wegen der durchgeführten Rejektionstherapien ( $p < 0,05$  Mann-Whitney-U-Test) und erholte sich langsam über die folgenden Tage.



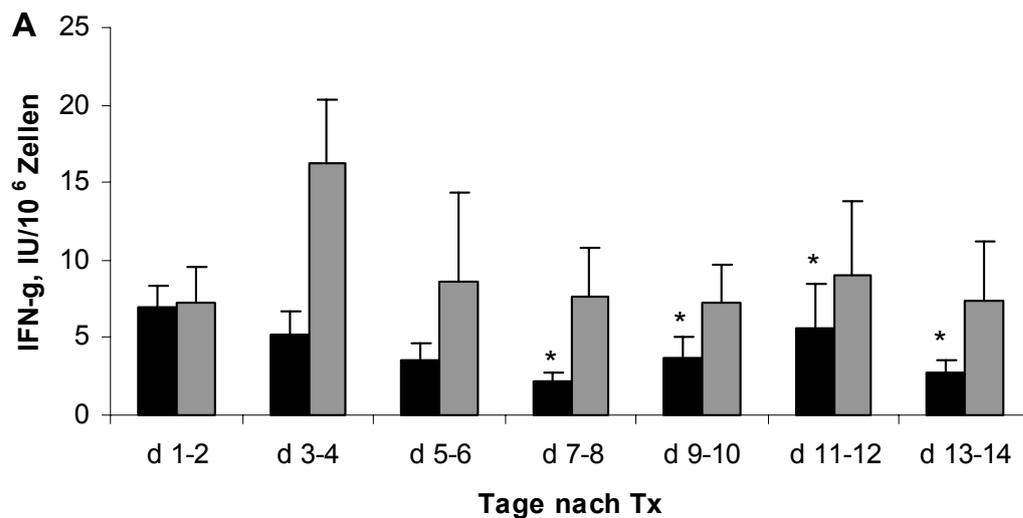
**Abb. 19:** Absolute Lymphozytenzahl im Vergleich zwischen den Rx- und non-Rx-Patienten. Rx-Patienten hatten deutlich niedrige Lymphozytenzahl in der Peripherie im Vergleich zu non Rx-Patienten. Es kam zu einem signifikanten Anstieg bis zum Tag 7 post Tx und anschließend zu einer signifikanten Abnahme der Lymphozytenzahl innerhalb der Rx-Gruppe (#  $p < 0.05$  Mann-Whitney-U-Test, \*  $p < 0,05$  Wilcoxon-Test).

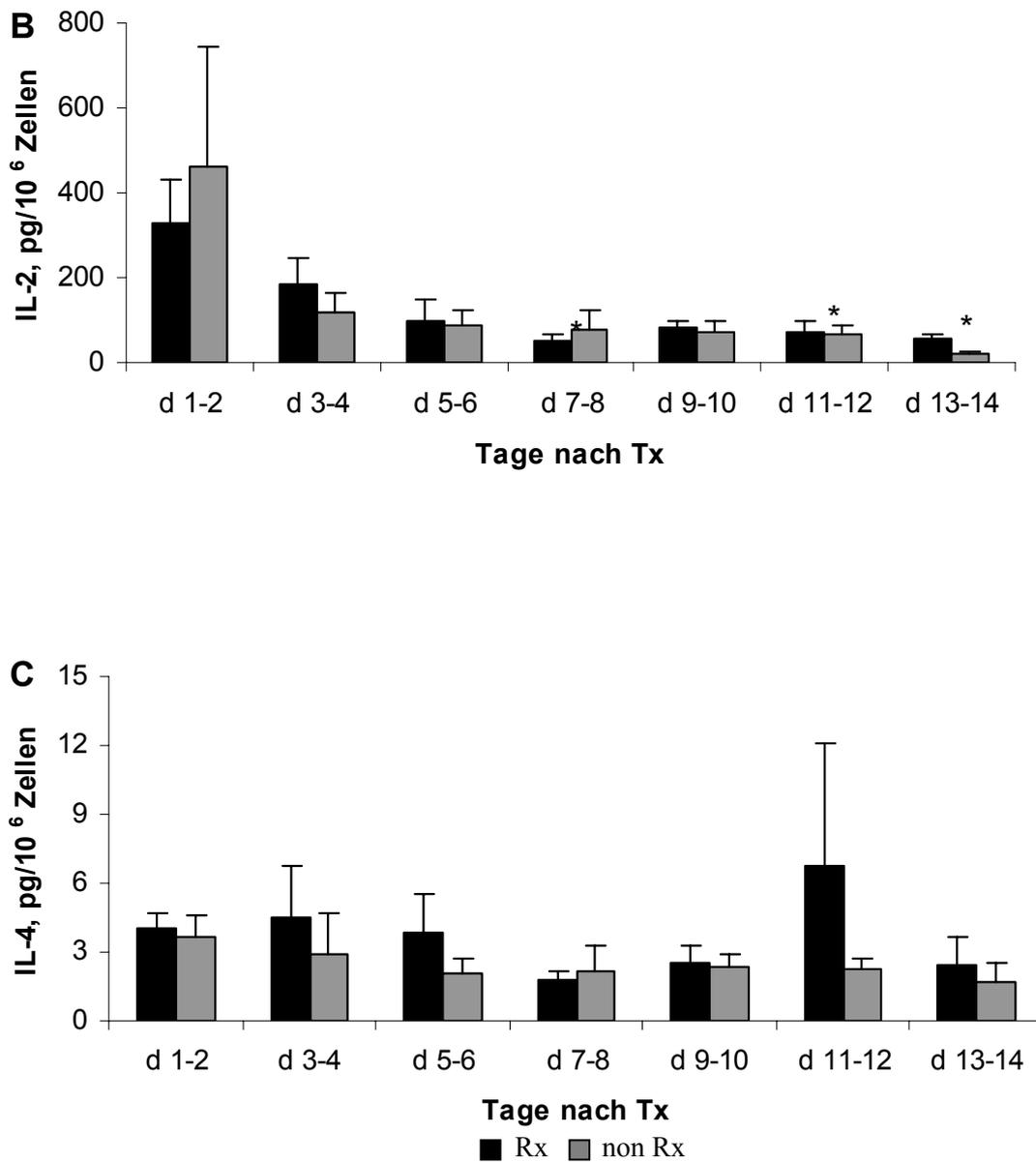
Wiederum wurde die Zytokinkonzentration pro Zellzahl zu jedem Zeitpunkt der Untersuchung für jeden Patienten berechnet und statistisch ausgewertet. Die IFN- $\gamma$ -Sekretion

pro Lymphozyten war in der Rx-Gruppe im Vergleich zur non Rx-Gruppe vermindert, jedoch ohne Signifikanz. Am Tag 1 nach Transplantation war der IFN- $\gamma$ -Spiegel bezogen auf die Lymphozytenzahl für beide Gruppen gleich. Dieser Spiegel von durchschnittlich 8 IU/10<sup>6</sup> Zellen blieb konstant für non Rx-Gruppe mit Ausnahme des Tages 3 post Tx. In der Rx-Gruppe war eine inverse IFN- $\gamma$ -Sekretion pro Lymphozytenzahl feststellbar. Das ist bedingt durch eine Lymphozytenzahl-Erhöhung bis zum Tag 7 bei konstant niedrigen IFN- $\gamma$ -Spiegel bis zu diesem Zeitpunkt.

Es sind keine signifikanten Unterschiede bezüglich der IL-2-Freisetzung pro Lymphozytenzahl zwischen den beiden Gruppen festzustellen. Die IL-2-Freisetzung pro Lymphozyt ist stark erhöht am Tag 1 post Tx bei beiden Patientengruppen. Diese Sekretion pro Zellzahl nimmt schnell zum Tag 3 post Tx ab.

Die IL-4-Sekretion pro Lymphozytenzahl war höher in der Rx-Gruppe an den Tagen 1-5 nach Transplantation im Vergleich zur non Rx-Gruppe jedoch ohne statistische Signifikanz.





**Abb. 20:** Die Freisetzung von Zytokinen a) IFN- $\gamma$ , b) IL-2 und c) IL-4 nach ConA-Stimulation bezogen auf die absolute Lymphozytenzahl im Vergleich zwischen Rx- und non Rx-Patienten.

Zusammenfassend haben die Patienten in der Rx-Gruppe trotz einer signifikant verminderten ConA-induzierten IFN- $\gamma$ -Sekretion im Vergleich zur non Rx-Gruppe ihr Transplantat akut abgestoßen. In der Rx-Gruppe war auch die IFN- $\gamma$ -Freisetzung bezogen auf die Lymphozytenzahl vermindert.

### 7.2.3 HLA-DR- und CD86-Expression auf Monozyten

Der Vergleich der monozytären HLA-DR-Expression erbrachte keine signifikanten Unterschiede zwischen der Rx- und non Rx-Gruppe.

Überraschenderweise war die CD86-Expression auf CD14+Monozyten in der Rx-Gruppe signifikant vermindert vor dem Auftreten der ersten akuten Abstoßungsepisoden gegenüber der non Rx-Gruppe ( $p < 0,05$  Tage 1, 3 und 5 post Tx Mann-Whitney-U-Test).

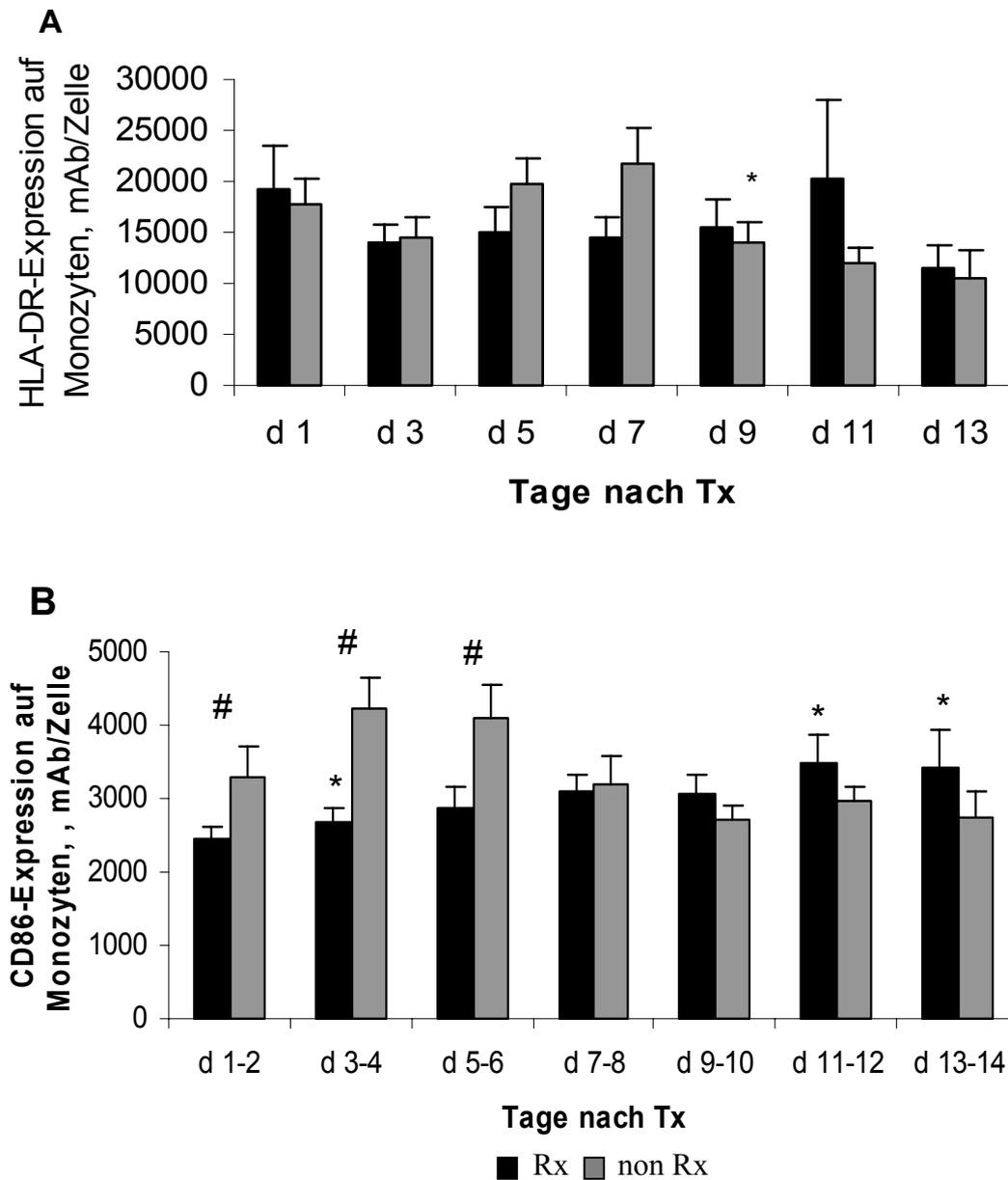
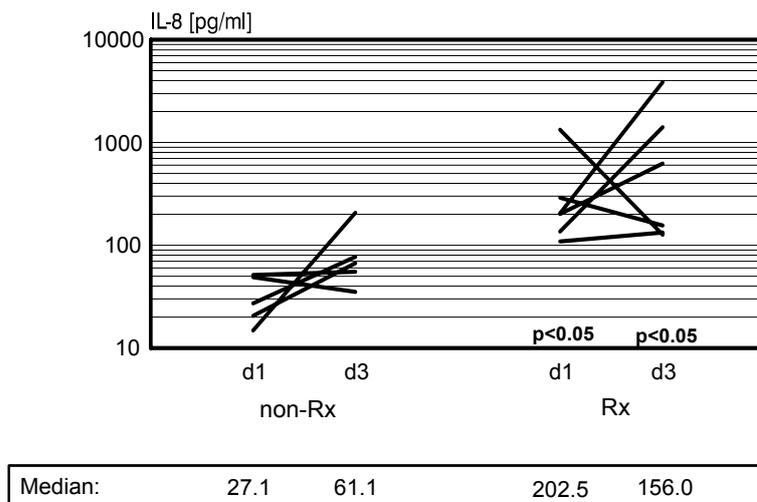


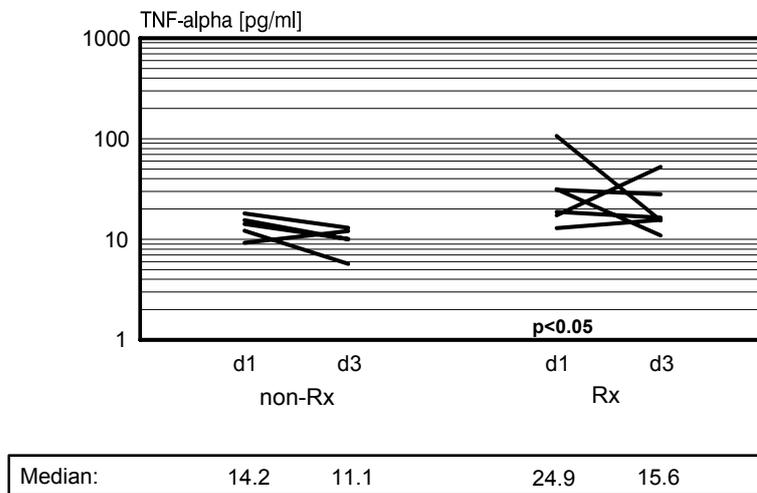
Abb. 21: Die a) HLA-DR und b) CD86-Expression auf Monozyten im Vergleich zwischen den Rx- und non Rx-Patienten. Die CD86-Expression auf CD14+ Monozyten war in der Rx-Gruppe signifikant vermindert gegenüber der non Rx-Gruppe vor dem Auftreten der ersten akuten Abstoßungsepisoden (#  $p < 0,05$  Tage 1, 3 und 5 Mann-Whitney-U-Test).

#### 7.2.4 Analyse der Zytokine im Urin

Bei Patienten der Rx-Gruppe wurden signifikant erhöhte IL-8 und TNF- $\alpha$ -Spiegel im Urin am Tag 1 und 3 nach Transplantation im Vergleich zu Patienten der non-Rx-Gruppe gemessen. In der statistischen Analyse erwies sich der IL-8-Wert am Tag 1 nach Transplantation mit einem Cut-off von 100 pg/ml am geeignetsten zur frühen Vorhersage einer akuten Abstoßung.

Der TNF- $\alpha$ -Spiegel im Urin war bei Transplantierten und Gesunden vergleichbar ( $22,5 \pm 4,4$  pg/ml, n=19). Demgegenüber waren die IL-8-Werte im Urin bei Patienten im Vergleich zu gesunden Kontrollprobanden erhöht ( $32,0 \pm 14,7$ , n=19). Der Vergleich der Ergebnisse von sIL-2R-Messungen im Plasma und Urin bzw. IL-6-Messungen im Urin erbrachte keine signifikanten Unterschiede zwischen den Rx- und non-Rx-Gruppen.





**Abb. 22: Logarithmische Darstellung der IL-8 und TNF- $\alpha$ -Spiegel im Urin an Tagen 1 und 3 nach der Transplantation. Signifikant erhöhte IL-8- und TNF- $\alpha$ -Werte wurden in der Rx-Gruppe im Vergleich zur non Rx-Gruppe festgestellt ( $p < 0,05$  Mann-Whitney-U-Test). Unten sind die Medianwerte der Zytokine für die Patientengruppen am Tag 1 und 3 post Tx dargestellt.**

### 7.3 Patienten mit Abstoßung (Rx-Gruppe)

Bei den Rejektionspatienten aus der ATG-Gruppe (n=7) wurden alle gemessenen Daten im zeitlichen Verlauf bezogen auf den Tag der Abstoßung ausgewertet. Als zeitlicher Rahmen wurden 4 Tage vor und nach der Abstoßung genommen.

#### 7.3.1 Monozytenfunktion

Die Rejektionspatienten zeigten einen Anstieg der LPS-induzierten Zytokinproduktion (TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-10) 1-2 Tage vor dem Abstoßungsereignis bzw. zum Zeitpunkt des Abstoßungsereignisses. Am 2. Tag nach der Rejektion konnte eine signifikant erniedrigte Sekretion von Monozytenzytokinen gemessen werden ( $p < 0,05$  Wilcoxon-Test), die zum Tag 4 post rejektionem wieder leicht zunahm. Ähnliche Veränderungen zeigten sich hinsichtlich der HLA-DR- und CD86-Expression auf CD14+ Monozyten. Es kam zu einer signifikanten Zunahme der HLA-DR- und CD86-Expression auf CD14+ Monozyten vor der Abstoßungsreaktion im Vergleich zum Tag der Abstoßung und anschließend zu einer

signifikanten Abnahme ( $p < 0,05$  Wilcoxon-Test).

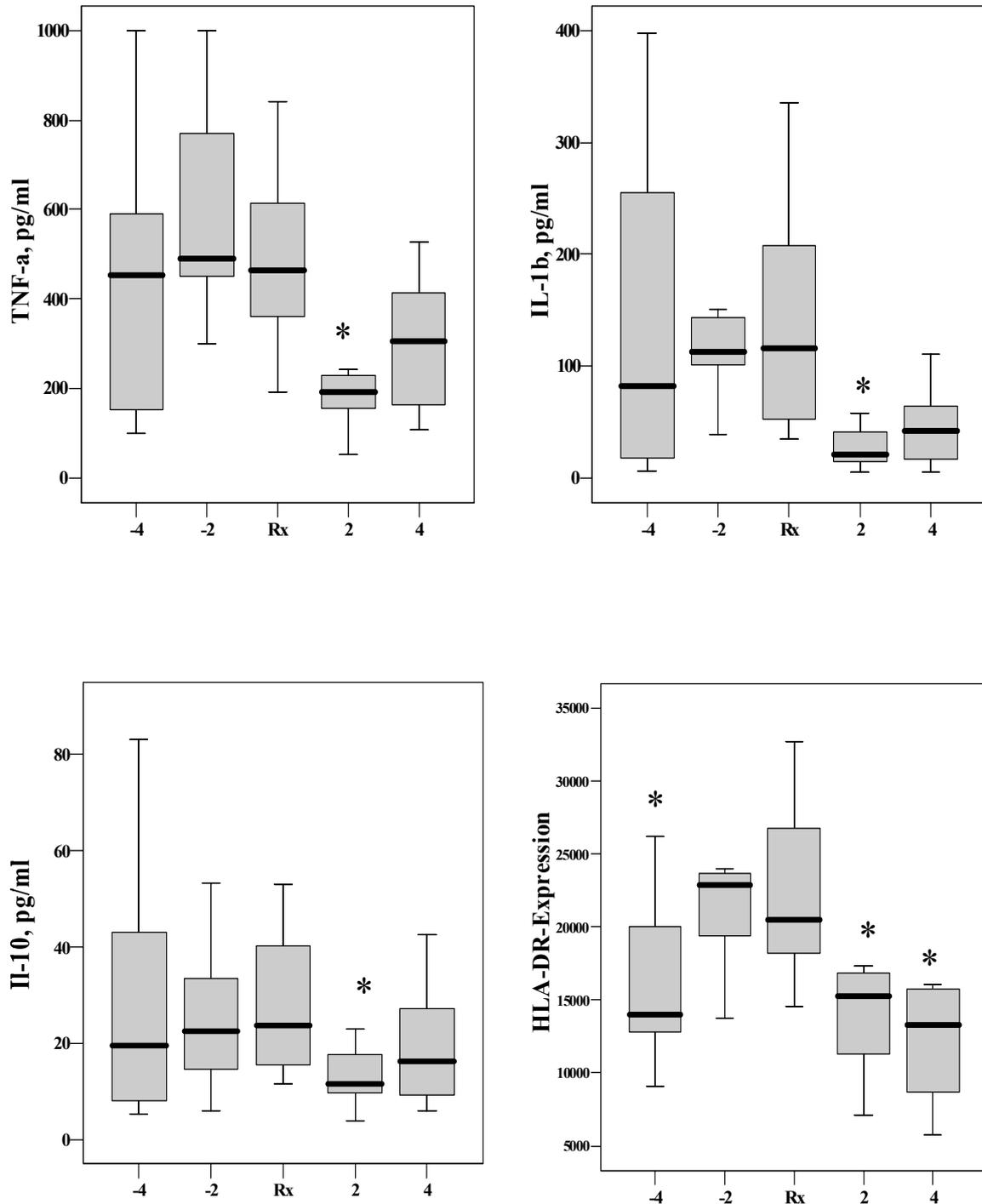
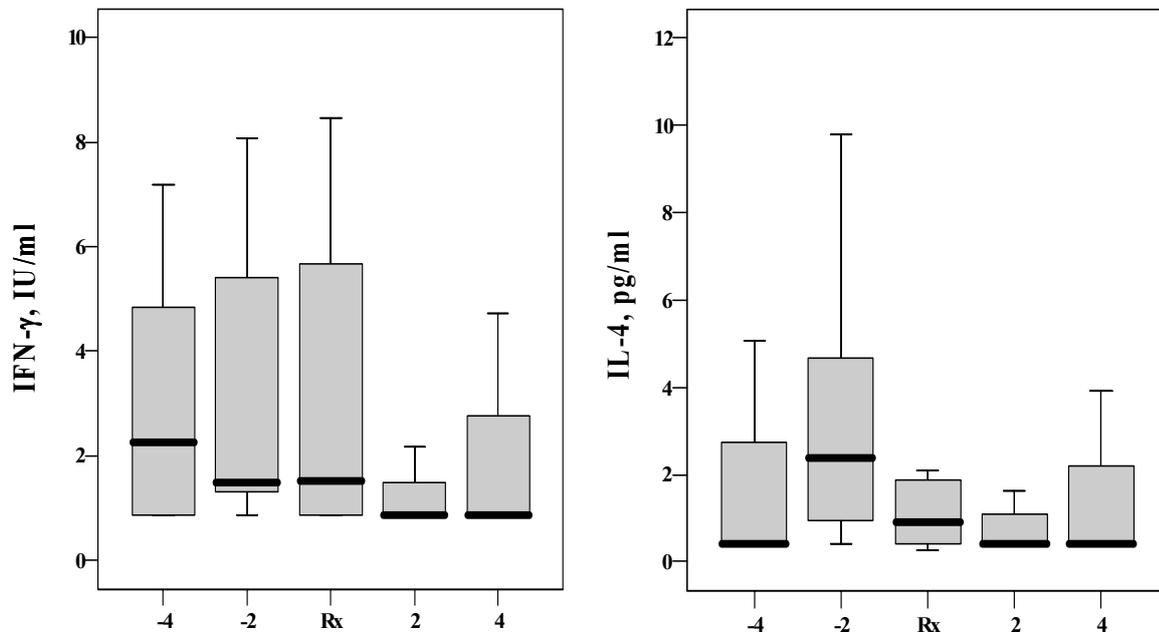


Abb. 23: Monozytenfunktion vor, zum Zeitpunkt und nach der akuten Abstoßung bei Rx-Patienten (-4/-2 → 4 bzw. 2 Tage vor Abstoßung, Rx → Abstoßungstag, 2/4 → 2 bzw. 4 Tage nach Abstoßung). Es kam zu einem deutlichen Anstieg der LPS-induzierten Zytokinproduktion und HLA-DR-Expression auf CD14 + Monozyten vor dem bzw. zum Zeitpunkt des Abstoßungsereignisses und zu einer signifikanten Abnahme der Zytokinsekretion und HLA-DR-Expression nach der Abstoßung (\*  $p < 0,05$  Wilcoxon-Test)

### 7.3.2 T-Zell-Zytokine

Die Patienten mit akuter Abstoßung zeigten eine erhöhte Th1- und Th2-Antwort zum Zeitpunkt der Abstoßung, die aber nach der Rejektionstherapie deutlich abgenommen hat. Der Unterschied war jedoch nicht signifikant.



**Abb. 24: T-Zellfunktion vor, zum Zeitpunkt und nach der akuten Abstoßung bei Rx-Patienten (-4/-2 → 4 bzw. 2 Tage vor Abstoßung, Rx → Abstoßungstag, 2/4 → 2 bzw. 4 Tage nach Abstoßung). Es kam zu einem deutlichen Anstieg der ConA-induzierten Zytokinproduktion von T-Zellen zum Zeitpunkt der Abstoßung und deutlichen Abnahme der Zytokinsekretion nach dem Abstoßungsereignis**

## 8 Diskussion

Die Inzidenz und Prävalenz der terminalen Niereninsuffizienz zeigt eine allgemein steigende Tendenz in den entwickelten Industrienationen. Grund hierfür sind verschiedene Faktoren, insbesondere jedoch die Zunahme der Lebenserwartung und der Inzidenz von Wohlstandserkrankungen, wie z. B. Diabetes mellitus Typ 2. Die Nierentransplantation ist die beste Therapieoption bei terminalem Nierenversagen und zeichnet sich gegenüber der intermittierenden Hämodialyse durch eine höhere Lebenserwartung, eine erhebliche Verbesserung der Lebensqualität sowie geringere Folgekosten aus. Eine Zunahme der in Deutschland jährlich durchgeführten Nierentransplantationen ist prospektiv nicht zu erwarten. Entscheidend für eine langfristig gute Transplantatfunktion ist die Verhinderung akuter und chronischer Transplantatabstoßungen. Diesem Ziel versucht man durch den Einsatz neuer immunsuppressiver Medikamente oder intelligenter Kombinationen vorhandener Substanzen einen Schritt näher zu kommen. Prinzipiell scheint es logisch, besonders am Anfang der Transplantation wirkungsvoll zu immunsupprimieren und insbesondere T-Zellen in ihrer Frequenz und Funktion zu beeinflussen. Diese Induktionstherapie kann mit polyklonalen Antikörpern wie ATG oder ALG oder mit monoklonalem Antikörper (IL-2R $\alpha$ -Antikörper, OKT3) erfolgen. Der Preis einer Induktionstherapie ist allerdings kurz- und mittelfristig eine höhere Infektionsrate mit opportunistischen Erregern und eine höhere Inzidenz von Tumoren<sup>113, 114</sup>. Andererseits konnte gerade für ATG-Präparate gezeigt werden, dass eine „Unterdosierung“ von einer vergleichsweise hohen Frequenz von Abstoßungen gefolgt ist<sup>168-170</sup>. Die bisher übliche Methode zur Überwachung der Immunsuppression bestand neben der Bewertung klinischer und laborchemischer Parameter im Transplantationsverlauf wie Nierenfunktionsparameter, Diurese, Entzündungszeichen, insbesondere in der Serumspiegelkontrolle der Immunsuppressiva. Da es trotz vergleichbarer Medikamentenserumspiegel zwischen verschiedenen Patienten interindividuelle Unterschiede im pharmakologischen Ansprechen der Immunsuppressiva gibt und die Spiegel nur sehr unzureichend die individuelle immunologische Wirksamkeit im Sinne der funktionellen Beeinflussung widerspiegeln, zeigt diese Vorgehensweise im klinischen Alltag leider nur unbefriedigende Resultate. Deshalb wird die Zukunft in einer dem Patienten zugeschnittenen (individuellen) Therapie liegen. Dazu ist allerdings notwendig, immunologische Tests zu validieren, die standardisiert und mit einem hohen prädiktiven Voraussagewert bei guter Sensitivität und Spezifität bedseitig einsetzbar sind. Dieses Immunmonitoring kann ein viel

versprechender Ansatz sein, der zur Reduktion der Komplikationsraten nach Nierentransplantation beitragen könnte.

Das immunologische Geschehen im Transplantat bzw. im peripheren Blut und insbesondere die Veränderungen in der Zytokinproduktion während einer Abstoßung wurden schon seit langem sehr detailliert untersucht. Hierbei zeigt sich eine erhebliche Heterogenität bei den von verschiedenen Zentren angewandten Methoden und Zielparametern. Kutukculer et al. bestimmten IL-2, IL-3, IL-4, IL-6, IL-8 und löslichen CD23 im Plasma von Nierentransplantierten und berichteten, dass der IL-2-Spiegel ein prädiktiver Marker für eine akute Abstoßung wäre<sup>158</sup>. Und auch die Messungen von IL-4 bzw. IL-6 würden zuverlässig die Differentialdiagnose einer akuten Abstoßung erlauben. Die Bestimmung anderer Zytokine war nicht hilfreich. Eine andere Arbeit der gleichen Gruppe zeigte, dass Patienten mit akuten Abstoßungen signifikant erhöhtes TNF- $\alpha$  und  $\beta$  bzw. lösliches ICAM-1 (sICAM-1) nachweisbar hatten<sup>171</sup>. Für IFN- $\gamma$  gab es keinen Zusammenhang mit dem Auftreten von akuten Abstoßungen. Ähnlich diesen Ergebnissen berichteten Cho et al. über erhöhte Plasmaspiegel von IL-2, löslichem IL-2R und TNF- $\alpha$  bei Patienten mit Abstoßung im Vergleich zu Patienten ohne Abstoßung<sup>172</sup>. Demgegenüber stehen Untersuchungen von Budde et al.<sup>173</sup> und Boratynska<sup>174</sup>, die keinen Zusammenhang zwischen gemessenen Zytokinwerten von IL-6, IL-8 und sIL-2R und dem Auftreten von akuten Abstoßungen zeigten.

Parallel zu den Zytokinen im Plasma wurden auch Zytokine in Urinproben der Transplantierten im Rahmen unseres Immunmonitoringprogramms bestimmt. Die Messung der Zytokine im Urin stellt eine einfache, nichtinvasive Methode dar, die möglicherweise besser die immunologische Situation im Transplantat widerspiegelt. Es ist mittlerweile in einer Vielzahl von Arbeiten beschrieben worden, dass verschiedene Zytokinmuster im Urin mit dem Auftreten akuter Abstoßungen einerseits und Infektionen andererseits korrelieren<sup>142, 143, 164, 173-175</sup>. Die Arbeiten dieser Arbeitsgruppen zeigten, dass erhöhte Werte von IL-6, IL-8 und sIL-2R im Urin im Zusammenhang mit Rejektionskrisen gefunden wurden. Die Parameter korrelieren mit einer guten Sensitivität (93%) aber geringer Spezifität (60%) mit einer akuten Rejektion<sup>143</sup>. Erhöhte Zytokinwerte im Urin wurden aber auch bei Ischämie- und Reperfusionsschaden, Infektionen (HWI, CMV), akuter tubulärer Nekrose (ATN) und nach ATG-Therapie gefunden<sup>141, 142, 176, 177</sup>.

Das Immunmonitoring bei Nierentransplantierten mit Hilfe von Funktionstesten, die die biologische Wirkung der Immunsuppressiva auf relevante Bereiche der Immunantwort widerspiegeln, könnte für die individuelle Optimierung einer immunsuppressiven Therapie

hilfreich sein. Diese Funktionsteste basieren auf der Messung der Zytokinproduktion nach entsprechender Stimulation der Zellen. Die freigesetzten Zytokine spiegeln hierbei die immunologische Reaktionsbereitschaft wider, so auch die Fähigkeit gegen ein Transplantat im Sinne einer Abstoßung zu reagieren. Es konnte bereits von anderen Arbeitsgruppen gezeigt werden, dass die Messung der intrazellulären Zytokinproduktion der Lymphozyten nach einer Mitogenstimulation mittels Durchflußzytometrie einen wichtigen Schritt in der Quantifizierung der Immunsuppression darstellt<sup>178-181</sup>. Van den Berg et al. zeigten, dass die IL-2-Produktion der T-Zellen nach PMA-Stimulation bei CyA-behandelten Patienten im Vergleich zu gesunden Kontrollprobanden deutlich reduziert war. Stalder et al. bestimmten IL-2, IFN- $\gamma$  und TNF- $\alpha$ -Sekretion der T-Zellen nach PMA und Ionomycin-Induktion bei Patienten, die CyA, MMF und Steroide erhielten. Die Zytokinsekretion bei Transplantierten war ebenso im Vergleich zu Normalprobanden reduziert. Diese Ergebnisse decken sich mit unseren Daten, die eine deutlich reduzierte Zytokinsekretion der Monozyten und Lymphozyten nach LPS- und ConA-Stimulation bei Transplantatempfängern im Vergleich zu gesunden Kontrollprobanden zeigten.

Weitere Arbeitsgruppen untersuchten die Zytokinproduktion der Lymphozyten nach entsprechender Mitogen-Stimulation im Vollblut mittels ELISA<sup>182</sup> und in PMBC's mittels RT-PCR<sup>183</sup> zur Möglichkeit der Vorhersage einer akuten Abstoßung. Buchwald et al. fanden keinen Zusammenhang zwischen den gemessenen Zytokinspiegel und dem Auftreten einer akuten Abstoßung. Dugré et al. zeigten dagegen, dass die Hochregulation von IL-4, IL-5, IL-6 und IFN- $\gamma$  einer akuten Abstoßung vorausging<sup>183</sup>.

Das Ziel der vorliegenden Arbeit war die Etablierung und Evaluation eines standardisierten Monitoringprogramms aus einem Panel verschiedener immunologischer Parameter zur Erkennung einer Unterimmunsuppression mit einem potentiellen Rejektionsrisiko bzw. Überimmunsuppression, um somit eine individuelle und effektivere Immunsuppression zu ermöglichen. Im Gegensatz zu anderen Studien und das sehen wir als großen Vorteil, haben wir standardisierte Funktionsteste mit einem standardisierten Auswertungsverfahren validiert. Außerdem werden alle Tests mit Vollblutproben durchgeführt, was zusätzlich zeitsparend im Vergleich zur Präparation von PMBC's ist.

Basierend auf den standardisierten Funktionstesten untersuchten wir in der Frühphase nach Nierentransplantation Zytokine der Monozyten und T-Zellen in der Vollblutkultur nach Stimulation mit LPS und ConA sowie Zytokine im Plasma und Urin. Die Patienten unterschieden sich hinsichtlich ihrer Induktionstherapie bei gleicher Basistherapie mit Calcineurininhibitor und Steroiden. Sensibilisierte Patienten erhielten zusätzlich MMF. Die

erste Gruppe wurde mit dem polyklonalen Antikörper, ATG (Fresenius®), als Induktionstherapie therapiert, während die zweite Gruppe den IL-2R-Antikörper, Basiliximab (Simulect®), erhielt.

In der Literatur existieren bereits Studien, die Antithymozytenglobuline gegen Basiliximab als Induktionstherapie auf der Basis von CyA, MMF und Steroiden hinsichtlich ihrer Effizienz bezogen auf die Verhinderung akuter Rejektionen und die Güte der Transplantatfunktion sowie des Nebenwirkungsprofils vergleichen. Basiliximab wurde gemäß den Herstellerempfehlungen am Tag 0 und 4 post Tx gegeben. In der US-Studie, die als Induktionstherapie das Pferde-ATG (Atgam®) verwendet hatte, wurde ATG über 14 Tage mit 15 mg/kg KG/Tag appliziert<sup>123</sup>. In der ATG-Gruppe wurde CyA verzögert gegeben, wenn der Serumkreatinin unter 3 mg/dl abgefallen war. Bei den Basiliximab-Patienten erfolgte eine initiale CyA-Gabe. In der Europäischen Multizentrischen Studie wurde die Induktionstherapie mit dem Kaninchen-ATG (Thymoglobulin®) durchgeführt<sup>124</sup>. Das Thymoglobulin wurde intravenös in einer Dosis von 1-1,5 mg/kg KG über 6-10 Tage verabreicht. Mourad et al. führten eine ähnliche Studie (Basiliximab vs. Kaninchen-ATG (Thymoglobulin®)) mit dem Unterschied durch, dass CyA in den beiden Induktionstherapiegruppen verzögert verabreicht wurde<sup>125</sup>. Die Ergebnisse aller Studien zeigten, dass die Inzidenz akuter Abstoßungen auch histologisch klassifiziert, die 1-Jahres-Transplantatfunktionsraten, das Patientenüberleben und die Zahl der Patienten mit einer verzögerten Transplantatfunktionsaufnahme zwischen den ATG- und Basiliximab-Patienten vergleichbar waren. Basiliximab wurde im Vergleich zu ATG, dessen Gabe mit Nebenwirkungen wie Fieber, Lymphopenie, Thrombozytopenie und Tachykardie verbunden war, gut vertragen. Die Inzidenzrate an CMV-Infektionen war in beiden Therapiegruppen vergleichbar. In der Studie von Mourad et al. dagegen war die Inzidenz von CMV-Infektionen in der Basiliximab-Gruppe signifikant niedriger verglichen mit der ATG-Gruppe.

Die Ergebnisse der Studien bei pädiatrischen Transplantatempfängern zeigten im Unterschied zu den Studien bei Erwachsenen, dass die Induktionstherapie mit Basiliximab die Inzidenz an akuten Abstoßungen und CMV-Infektionen deutlich reduzierte<sup>184-186</sup>. In der Studie von Clark et al. war die Transplantatfunktion 6 Monate nach der Transplantation berechnet als glomeruläre Filtrationsrate (GFR) signifikant besser in der Basiliximab-Gruppe verglichen mit der ATG-Gruppe. Jedoch waren die 1- und 2-Jahres-Transplantatfunktionsraten vergleichbar zwischen den Gruppen.

Das Immunsuppressionsprotokoll unserer Studie unterschied in folgenden Punkten von den oben genannten Studien:

- statt CyA wurde FK506 als Calcineurininhibitor bei der Standardimmunsuppression gegeben
- ATG wurde als hochdosierte i. v. Bolus-Therapie (9 mg/kg KG) intraoperativ kurz vor Anastomoseneröffnung appliziert <sup>166, 167</sup>.

Zu dem von uns eingesetzten ATG-Bolustherapie vs. Basiliximab einerseits und einer gleichzeitigen Gabe von FK506 als Calcineurininhibitor bei der Standardimmunsuppression andererseits liegen wenig vergleichende Daten vor. Leonardi et al. untersuchten die Verträglichkeit und Sicherheit von Basiliximab als Induktionstherapie in Kombination mit einer Tacrolimus-basierten Immunsuppression <sup>126</sup>. Die Basiliximab-Induktionspatienten wurden mit den Patienten verglichen, die nur eine duale Therapie mit FK506 und Steroiden bekamen. Die Ergebnisse dieser Studie zeigten, dass die Inzidenz akuter Abstoßungen in der Basiliximab-Gruppe im 3. Monat post Tx signifikant niedriger im Vergleich zur non Basiliximab-Gruppe war. Diese Tendenz bestand auch nach einem Jahr post Tx jedoch ohne signifikanten Unterschied. Die Nebenwirkungsrate war vergleichbar unter den Gruppen. Das 1-Jahres-Transplantat- und Patientenüberleben sowie die 1-Jahres-Graftfunktion zeigten keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen. In einer anderen Studie von Nampoory et al. wurden Patienten mit einer ATG-Bolustherapie wie in unserer Studie mit der Standard-ATG-Gabe und der Induktionstherapie mit dem monoklonalen IL-2R $\alpha$ -Antikörper Basiliximab verglichen <sup>187</sup>. Als Basisimmunsuppression wurde hier CyA/Steroid gewählt, während unsere Patienten mit FK506/Steroid geführt wurden. Nichtsdestoweniger zeigten die Daten, dass die Inzidenz und der Schweregrad akuter Abstoßungen in allen 3 Gruppen gleich waren. Demgegenüber waren die 1-Jahres-Kreatininwerte in der Basiliximab-Gruppe signifikant besser als in der ATG-Bolus-Gruppe. Die Patienten, die mit dem Standard-ATG-Schema induziert wurden, hatten die höchsten 1-Jahres-Kreatininwerte. Darüberhinaus war die Inzidenz an CMV-Infektionen in dieser Gruppe höher als in den beiden anderen.

In unserer Studie zeigte sich nun im Gegensatz zu den in der Literatur berichteten Daten, dass die Patienten mit einer ATG-Bolus-Induktionstherapie eine höhere Inzidenz akuter Abstoßungen innerhalb des ersten Transplantationsjahres im Vergleich zur Induktion mit Basiliximab aufwiesen. Die Inzidenz der CMV-Infektionen war höher in der ATG-Gruppe im Vergleich zur Basiliximab-Gruppe jedoch ohne einen signifikanten Unterschied.

In der Arbeit von Tullius et al. wurden die komplette Daten von den ganzen Patienten (n=124) einschließlich unserer Studienpatienten, die in der Klinik für Transplantationschirurgie transplantiert und in die Studie Induktionstherapie mit ATG (n=62) versus Basiliximab (n=62) eingeschlossen wurden, ausgewertet <sup>188</sup>. Die Studie zeigte eine vergleichbare Inzidenz akuter Abstoßungen zwischen den ATG und Basiliximab-Gruppen (35% vs. 32%). Die 1-

Jahrestransplantatfunktion war ebenso nicht signifikant unterschiedlich. In der Basiliximab-Gruppe sind 4 Patienten mit einem funktionierenden Transplantatorgan an Sepsis (n=1) und kardiologischen Komplikationen (n=3) verstorben, während die 1-Jahres-Patientenüberlebensrate bei ATG-Patienten bei 100% lag. In der Basiliximab-Gruppe kam es bei 6 Patienten zum Transplantatversagen, während in der ATG-Gruppe 2 Patienten ihre Transplantate verloren haben. Die Komplikationsrate post Tx war in der ATG-Gruppe höher als in der Basiliximab-Gruppe (*de novo* Diabetes: ATG n=2 vs. Basiliximab n=0 und CMV-Infektion: ATG n=7 vs. Basiliximab n=2) jedoch ohne Signifikanz.

Bisher existieren keine Arbeiten, die die Dynamik der Zytokinexpressionsmuster unter verschiedenen Induktionsschemata analysiert haben und nicht nur mit der Inzidenz akuter Abstoßungen, sondern auch mit der 1-Jahres-Transplantatfunktion in Beziehung gesetzt haben. Wir untersuchten bei ATG- vs. Basiliximab-behandelten Patienten die Zytokinexpression von T-Zellen und Monozyten nach Stimulation im Vollblut sowie Zytokinsekretion im Urin und Plasma. Anschließend wurden die Daten miteinander und mit klinisch relevanten Ereignissen wie akute Abstoßung, Infektion, Langzeitfunktion etc. verglichen.

ATG induzierte nicht überraschend einen signifikanten Abfall von Lymphozyten und Monozyten im peripheren Blut im Vergleich zum Basiliximab. Dies war bereits durch andere Arbeitsgruppen gezeigt worden. Kaden et al. beschrieben eine drastische Reduzierung der T-Zell-Zahl nach ATG-Bolus-Gabe bereits intraoperativ <sup>167</sup>. Unsere Ergebnisse weisen nun darauf hin, dass die ATG-Induktionstherapie eine signifikante Verminderung der LPS-induzierten Zytokinsekretion von Monozyten (TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  und IL-10) an den Tagen 1 bis 3 nach Transplantation im Vergleich zum Basiliximab bewirkt. Diese Verminderung der Zytokinexpression war nicht nur dadurch bedingt, dass wir eine Reduktion zytokinproduzierender Monozyten unter ATG-Induktion beobachteten, was damit nur ein quantitatives Problem wäre, sondern wir konnten zeigen, dass die Fähigkeit jedes einzelnen Monozyten zur Zytokinproduktion vermindert war. D. h., unter einer ATG-Bolus-Therapie ändert sich kurzzeitig die Funktion von Monozyten gemessen an ihrem Zytokinsekretionsprofil. Darüberhinaus konnten wir zeigen, dass eine ATG-Induktionstherapie auch die ConA-induzierte IFN- $\gamma$ - und IL-2-Freisetzung von T-Zellen im Zeitraum der ersten 3 Tage nach der Transplantation im Vergleich zum Basiliximab signifikant vermindert. Dies war aber im Gegensatz zu den Befunden an Monozyten ein Ergebnis, das rein der numerischen (quantitativen) Reduktion von T-Zellen in der Zirkulation geschuldet war. Überraschend konnten wir aber zeigen, dass die verbliebenen zirkulierenden

T-Zellen in der ATG-Bolus-Therapie-Gruppe eine signifikant erhöhte Fähigkeit zur IFN- $\gamma$ - und IL-2-Freisetzung aufwiesen bezogen pro Zellzahl als in der Basiliximab-Gruppe. Das legt die Vermutung nahe, dass die verbliebenen T-Zellen unter der ATG-Bolus-Therapie aktiviert worden sind. Dies korreliert auch mit dem Anstieg der Rejektionsinzidenz in der ATG-Gruppe zwischen dem 7. und 10. Tag nach Transplantation. Bezogen auf die Lymphozytenzahl zeigten sich geringere T-Zell-Zytokinspiegel in der Basiliximab-Gruppe, woraus entweder auf einen stärkeren T-Zell-suppressiven Effekt von Basiliximab gegenüber ATG oder einen vernachlässigbaren T-Zell-Aktivierungseffekt von ATG geschlossen werden kann.

Basiliximab wirkt durch die spezifische Bindung an die IL-2-Rezeptor- $\alpha$ -Kette, die nur an aktivierten T-Zellen z. B. durch eine Interaktion mit einem Alloantigen exprimiert wird. Die biologische Wirkung wird zum einen über die Absättigung der IL-2-Rezeptor- $\alpha$ -Kette und zum anderen durch eine relative Verminderung der Expression des CD25-Moleküls auf T-Lymphozyten erklärt. Diese Verminderung der Expression durch Beladung der T-Lymphozyten mit dem Antikörper führt zur Modulation von T-Zellfunktionen und wahrscheinlich zu einer verstärkten Sequestrierung der T-Zellen. So hemmt Basiliximab die Zahl der zirkulierenden aktivierten T-Lymphozyten. Die Arbeit von McDyer et al. zeigte, dass die Blockade der IL-2-Rezeptor- $\alpha$ -Kette die Hemmung der IFN- $\gamma$ -Produktion in CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> T-Zellen einerseits durch erhöhte Suppression der IL-12-Expression bewirkt und andererseits durch einen IL-12-unabhängigen Pathway reguliert <sup>189</sup>.

Die Th1-Zytokine IFN- $\gamma$  und IL-2 werden als Rejektions-Zytokine beschrieben und stellen Hauptmediatoren einer akuten Abstoßungsreaktion dar. In zahlreichen Arbeiten von verschiedenen Arbeitsgruppen konnte gezeigt werden, dass die Erhöhung der Produktion und Sekretion von T-Zell-Zytokinen ein prädiktiver Faktor für das Auftreten akuter Abstoßungen war <sup>28-30, 155, 158</sup>. Die Ergebnisse unserer Arbeit bestätigten diese Ergebnisse, da die T-Zell-Zytokin-Sekretion bei reduzierter T-Zellzahl in der ATG-Gruppe signifikant höher war als in der Basiliximab-Gruppe. Dies war dann auch gefolgt von einer höheren Inzidenz akuter Abstoßungsreaktionen in Frühphase nach Transplantation.

Die Basiliximab-Gruppe zeigte eine stabil verminderte HLA-DR- und CD86-Expression auf Monozyten über die ersten 2 Wochen im Vergleich zur ATG-Induktionsgruppe. In der ATG-Induktionsgruppe war die HLA-DR-Expression über die ersten 2 Tage signifikant höher. Auch die CD86-Expression auf CD14<sup>+</sup> Monozyten als Ausdruck verstärkter kostimulatorischer Kapazität war in der ATG-Gruppe innerhalb der ersten Transplantationswoche erhöht und kann als Folge verstärkter Zytokinwirkung z. B. von IFN- $\gamma$

interpretiert werden. Offensichtlich ist die ATG-Induktion über das resultierende Zytokinrelease auch mit einer Aktivierung professioneller APC's verbunden. Diese Zellen scheinen schnell im Transplantat zu akkumulieren, was sich aus der signifikant verminderten CD86-Expression auf CD14+ Monozyten in der Zirkulation innerhalb der ersten Woche post transplantationem schließen lässt.

Als Ausdruck einer Zytokinrelease-vermittelten Immunaktivierung kann auch die signifikant erhöhte Serumkonzentrationen für den sIL-2R post Tx in der ATG-Gruppe im Vergleich zur Basiliximab-Gruppe gewertet werden. In der Literatur ist vielfach berichtet worden, dass erhöhter Plasma-sIL-2R-Spiegel mit einer höheren Inzidenz von akuten Abstoßungen assoziiert ist <sup>165, 172, 190</sup>. Dazu passt auch, dass von den im Urin bestimmten Zytokinen (sIL-2R, IL-6, TNF- $\alpha$ , IL-8) ein signifikant erniedrigter sIL-2R-Spiegel am stärksten prädiktiv für das Fehlen akuter Transplantatabstoßungen ist.

In der ATG-Gruppe haben 7 Patienten (50%) akut ihre Transplantate in der frühen Phase nach Transplantation abgestoßen. Ein Vergleich von Abstoßungs (Rx)- gegenüber Patienten mit stabiler Funktion (non Rx) innerhalb der ATG-Gruppe zeigte, dass die Abstoßungspatienten eine signifikant verminderte LPS-induzierte Monozyten-Zytokinsekretion in der Vollblutkultur (absolut und relativ bezogen auf die Zellzahl) unmittelbar vor dem Auftreten der akuten Abstoßungsepisoden im Vergleich zu Patienten mit stabiler Transplantatfunktion hatten. Überraschenderweise fanden wir auch eine signifikant verminderte Th1-Antwort (absolut und relativ bezogen auf die Zellzahl) in der Rx-Gruppe gegenüber der non-Rx-Gruppe. Im Gegensatz zu Arbeiten von anderen Arbeitsgruppen <sup>26, 27</sup> und entgegen unserer Hypothese haben die Patienten mit verminderter Th1-Antwort und proinflammatorischer Antwort akut ihre Transplantate abgestoßen.

Die beobachteten Zytokinspiegel im Vollblut sowie die HLA-DR und CD86 Expression auf den Monozyten der Abstoßungspatienten der ATG-Gruppe entsprechen nicht dem erwarteten Muster und entziehen sich einer einfachen Erklärung. Es ist hierbei möglich, dass die im peripheren Blut gemessenen, oben angeführten Parameter, nur unzureichend die lokalen Prozesse von T-Zell-Aktivierung und Abstoßungsreaktion in der Transplantatniere darstellen. Andererseits kann man nicht von einer „Nierenschranke“, vergleichbar der Blut-Hirn-Schranke ausgehen, die ein „immunologisches Nierenkompartiment“ vom systemischen Kreislauf trennt. Möglicherweise ist der Abfall von Zytokinen und Leukozyten/Lymphozyten in der Abstoßungsgruppe der ATG-Patienten auf ein verstärktes Einwandern von T-Zellen und APC in die Transplantatniere zu erklären. Zur Überprüfung dieser Hypothese böte sich z.B. die Nierenbiopsie mit histologischer Untersuchung bzw. der Darstellung von

Genexpressionsmustern mittels quantitativer RT-PCR oder Genexpressions-Chip-Analysen an. Die Durchführung der Protokollbiopsien wäre eine hilfreiche zusätzliche Methode gewesen, um diese o. g. Hypothese zu bestätigen. Die Arbeitsgruppe von Rush hatte in mehreren Arbeiten gezeigt, dass die subklinischen Rejektionen durch Protokollbiopsien nachgewiesen und damit behandelt werden können<sup>191</sup>. Dadurch hatte sich das Langzeit-Transplantatüberleben deutlich gebessert.

Ferner zeigten unsere Daten, dass erhöhte IL-8- und TNF- $\alpha$ -Spiegel im Urin mit dem Ereignis „akute Abstoßung“ korrelieren, wobei der Zusammenhang nach Korrektur auf das 24h-Urin-Volumen (Urin-IL-8/24h) noch stärker war. Die Messung der Zytokine IL-8 und TNF- $\alpha$  im Urin erscheint als ein vielversprechender Indikator für die Vorhersage früher akuter Abstoßungen. Da diese beiden Parameter bereits am Tag 1 und 2 nach Transplantation erhöht und damit prädiktiv waren, liegt nahe zu vermuten, dass hier eine erhöhte Immunogenität des Transplantates z.B. im Rahmen eines stärkeren Ischämie/Reperfusionsschadens indiziert wird. Dieser Erklärungsversuch sollte in weiteren systematischen Untersuchungen verifiziert werden. Die wichtigsten Faktoren, die einen falsch-hohen Urin-IL-8-Wert hervorrufen können, sind Harnwegs- und Virusinfekte. Die retrospektive Analyse unserer Patientendaten konnte das Vorliegen dieser Faktoren weitestgehend ausschließen.

Wegen der einfachen Handhabung, dem möglichen Verzicht auf invasive Maßnahmen und der renalen Herkunft stellt der Urin ein ideales Untersuchungsmedium dar. Seine geeignete Analyse lässt möglicherweise eine bessere Widerspiegelung der immunologischen Prozesse des Nierenkompartments erwarten. Li et al. zeigten mittels nicht-invasiven Monitorings von Immunzellen in Urinproben von Nierentransplantierten unter Verwendung eines quantitativen PCR-Assays, dass eine erhöhte Expression von Perforin und Granzym B im Urin mit dem Auftreten von akuten Abstoßungen korreliert<sup>192</sup>. Unsere Arbeitsgruppe konnte kürzlich mit Hilfe quantitativer mRNA Expressionsanalysen in Urinproben zeigen, dass eine erhöhte Expression von RANTES, CD3 und besonders von Granulysin im Urin der Transplantierten der beste Marker für die Vorhersage des Auftretens von frühen und späten akuten Abstoßungen ist<sup>193, 194</sup>.

## 9 Zusammenfassung

Pharmakodynamische Tests und Methoden, die die funktionelle Wirkung von Immunsuppressiva auf die Immunantwort bestimmen, könnten für die individuelle Optimierung einer immunsuppressiven Therapie aussagekräftiger sein als pharmakokinetische Parameter. Deshalb wäre es hilfreich pharmakodynamische Tests zu haben, die sich auf die Endprodukte der spezifischen intrazellulären biochemischen Kaskaden in Lymphozyten oder Monozyten fokussieren, die Resultate von unterschiedlichen Medikamenten mit unterschiedlichen Wirkungsmechanismen und für die Hemmung der Immunantwort, die eine akute Abstoßung verursacht, verantwortlich sind. Die Beispiele von solchen Endprodukten sind Lymphozytenproliferation, Expression von Oberflächenmarkern auf T-Zellen und Produktion von Zytokinen in T-Zellen oder Monozyten. In unserer Arbeit wurden standardisierte Vollblut-Funktionsteste zur Erfassung der Lymphozyten- und Monozytenfunktion nach Mitogenstimulation *in vivo* mittels semiautomatisierter ELISA als neue Möglichkeit zur Quantifizierung der Immunsuppression in nierentransplantierten Patienten mit der Erkennung einer Unterimmunsuppression mit einem potentiellen Abstoßungsrisiko bzw. Überimmunsuppression mit einem erhöhten Infektionsrisiko entwickelt und validiert. Diese Funktionsteste werden im Rahmen des Immunmonitoringprogramms in vielen klinischen Studien zur Einführung und Überprüfung der Wirksamkeit und Sicherheit der neuen immunsuppressiven Medikamente in unserem Transplantationszentrum verwendet. Die Standardisierung dieser Teste ermöglichte ihre Verwendung auch in anderen Transplantationszentren, die den Vergleich der Ergebnisse unter den Arbeitsgruppen möglich macht.

Ein weiterer wichtiger Risikofaktor für die Entwicklung akuter Abstoßungen ist die Qualität der Transplantatorgane. Spenderfaktoren wie Alter, Hochdruck, Ischämie-/Reperfusionsschaden, Hirntod etc. bestimmen vermutlich die Immunogenität von Transplantaten. Der zunehmende Einsatz sogenannter marginaler Organe erhöht dieses Problem. Jedoch mangelt es an objektiven Tests, um die individuelle Qualität des Organs zu bestimmen. Ein präoperatives „Entzündungsmonitoring“ durch die Messung der Zytokine im Urin und Plasma könnte hier einen Beitrag leisten. Die Messung der Zytokine im Urin stellt eine einfache, nichtinvasive Methode dar, die möglicherweise besser die immunologische Situation im Transplantat widerspiegelt. In dieser Arbeit konnten wir zeigen, dass die bereits an den ersten Tagen nach Transplantation erhöhten IL-8- und TNF- $\alpha$ -Spiegel im Urin prädiktiv für eine akute Abstoßung waren. Es liegt nahe zu vermuten, dass hier eine erhöhte Immunogenität des Transplantates z.B. im Rahmen eines stärkeren

Ischämie/Reperfusionsschadens indiziert wird. In weiteren Studien sollte diese Hypothese überprüft werden.

## 10 Literaturverzeichnis

1. Hariharan S, Johnson CP, Bresnahan BA, Taranto SE, McIntosh MJ, Stablein D. Improved graft survival after renal transplantation in the United States, 1988 to 1996. *N Engl J Med* 2000; 342:605-12.
2. Almond PS, Matas A, Gillingham K, et al. Risk factors for chronic rejection in renal allograft recipients. *Transplantation* 1993; 55:752-6; discussion 756-7.
3. Cosio FG, Pelletier RP, Falkenhain ME, et al. Impact of acute rejection and early allograft function on renal allograft survival. *Transplantation* 1997; 63:1611-5.
4. Hariharan S, Alexander JW, Schroeder TJ, First MR. Impact of first acute rejection episode and severity of rejection on cadaveric renal allograft survival. *Clin Transplant* 1996; 10:538-41.
5. Humar A, Kerr S, Gillingham KJ, Matas AJ. Features of acute rejection that increase risk for chronic rejection. *Transplantation* 1999; 68:1200-3.
6. Jindal RM, Hariharan S. Chronic rejection in kidney transplants. An in-depth review. *Nephron* 1999; 83:13-24.
7. Sumrani N, Cacciarelli TV, Georgi B, et al. Contribution of acute rejection to renal allograft loss from chronic rejection. *Transplant Proc* 1993; 25:2259-60.
8. Baines LS, Joseph JT, Jindal RM. Compliance and late acute rejection after kidney transplantation: a psycho-medical perspective. *Clin Transplant* 2002; 16:69-73.
9. Joseph JT, Kingsmore DB, Junor BJ, et al. The impact of late acute rejection after cadaveric kidney transplantation. *Clin Transplant* 2001; 15:221-7.
10. Reinke P, Fietze E, Docke WD, Kern F, Ewert R, Volk HD. Late acute rejection in long-term renal allograft recipients. Diagnostic and predictive value of circulating activated T cells. *Transplantation* 1994; 58:35-41.
11. Racusen LC, Solez K, Colvin RB, et al. The Banff 97 working classification of renal allograft pathology. *Kidney Int* 1999; 55:713-23.
12. Solez K, Axelsen RA, Benediktsson H, et al. International standardization of criteria for the histologic diagnosis of renal allograft rejection: the Banff working classification of kidney transplant pathology. *Kidney Int* 1993; 44:411-22.
13. Liu Z, Sun YK, Xi YP, et al. Contribution of direct and indirect recognition pathways to T cell alloreactivity. *J Exp Med* 1993; 177:1643-50.
14. Lechler RI, Lombardi G, Batchelor JR, Reinsmoen N, Bach FH. The molecular basis of alloreactivity. *Immunol Today* 1990; 11:83-8.
15. Vella JP, Spadafora-Ferreira M, Murphy B, et al. Indirect allorecognition of major histocompatibility complex allopeptides in human renal transplant recipients with chronic graft dysfunction. *Transplantation* 1997; 64:795-800.
16. June CH, Bluestone JA, Nadler LM, Thompson CB. The B7 and CD28 receptor families. *Immunol Today* 1994; 15:321-31.
17. Linsley PS, Ledbetter JA. The role of the CD28 receptor during T cell responses to antigen. *Annu Rev Immunol* 1993; 11:191-212.
18. Sayegh MH, Turka LA. The role of T-cell costimulatory activation pathways in transplant rejection. *N Engl J Med* 1998; 338:1813-21.
19. Denton MD, Reul RM, Dharnidharka VR, Fang JC, Ganz P, Briscoe DM. Central role for CD40/CD40 ligand (CD154) interactions in transplant rejection. *Pediatr Transplant* 1998; 2:6-15.
20. Durie FH, Foy TM, Masters SR, Laman JD, Noelle RJ. The role of CD40 in the regulation of humoral and cell-mediated immunity. *Immunol Today* 1994; 15:406-11.

21. Gimmi CD, Freeman GJ, Gribben JG, Gray G, Nadler LM. Human T-cell clonal anergy is induced by antigen presentation in the absence of B7 costimulation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1993; 90:6586-90.
22. Hollander GA, Castigli E, Kulbacki R, et al. Induction of alloantigen-specific tolerance by B cells from CD40-deficient mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1996; 93:4994-8.
23. O'Garra A. Cytokines induce the development of functionally heterogeneous T helper cell subsets. *Immunity* 1998; 8:275-83.
24. Mosmann TR, Li L, Hengartner H, Kagi D, Fu W, Sad S. Differentiation and functions of T cell subsets. *Ciba Found Symp* 1997; 204:148-54; discussion 154-8.
25. Mosmann TR, Sad S. The expanding universe of T-cell subsets: Th1, Th2 and more. *Immunol Today* 1996; 17:138-46.
26. Dallman MJ. Cytokines and transplantation: Th1/Th2 regulation of the immune response to solid organ transplants in the adult. *Curr Opin Immunol* 1995; 7:632-8.
27. Nickerson P, Steurer W, Steiger J, Zheng X, Steele AW, Strom TB. Cytokines and the Th1/Th2 paradigm in transplantation. *Curr Opin Immunol* 1994; 6:757-64.
28. O'Connell PJ, Pacheco-Silva A, Nickerson PW, et al. Unmodified pancreatic islet allograft rejection results in the preferential expression of certain T cell activation transcripts. *J Immunol* 1993; 150:1093-104.
29. Sayegh MH, Akalin E, Hancock WW, et al. CD28-B7 blockade after alloantigenic challenge in vivo inhibits Th1 cytokines but spares Th2. *J Exp Med* 1995; 181:1869-74.
30. Takeuchi T, Lowry RP, Konieczny B. Heart allografts in murine systems. The differential activation of Th2-like effector cells in peripheral tolerance. *Transplantation* 1992; 53:1281-94.
31. Merville P, Lambert C, Durand I, et al. High frequency of IL-10-secreting CD4+ graft-infiltrating T lymphocytes in promptly rejected kidney allografts. *Transplantation* 1995; 59:1113-9.
32. Merville P, Pouteil-Noble C, Wijdenes J, Potaux L, Touraine JL, Banchereau J. Detection of single cells secreting IFN-gamma, IL-6, and IL-10 in irreversibly rejected human kidney allografts, and their modulation by IL-2 and IL-4. *Transplantation* 1993; 55:639-46.
33. Lakkis FG. Role of cytokines in transplantation tolerance: lessons learned from gene-knockout mice. *J Am Soc Nephrol* 1998; 9:2361-7.
34. Steiger J, Nickerson PW, Steurer W, Moscovitch-Lopatin M, Strom TB. IL-2 knockout recipient mice reject islet cell allografts. *J Immunol* 1995; 155:489-98.
35. Konieczny BT, Dai Z, Elwood ET, et al. IFN-gamma is critical for long-term allograft survival induced by blocking the CD28 and CD40 ligand T cell costimulation pathways. *J Immunol* 1998; 160:2059-64.
36. Saleem S, Konieczny BT, Lowry RP, Baddoura FK, Lakkis FG. Acute rejection of vascularized heart allografts in the absence of IFN-gamma. *Transplantation* 1996; 62:1908-11.
37. Steiger JU, Nickerson PW, Hermle M, Thiel G, Heim MH. Interferon-gamma receptor signaling is not required in the effector phase of the alloimmune response. *Transplantation* 1998; 65:1649-52.
38. Lakkis FG, Konieczny BT, Saleem S, et al. Blocking the CD28-B7 T cell costimulation pathway induces long term cardiac allograft acceptance in the absence of IL-4. *J Immunol* 1997; 158:2443-8.
39. Nickerson P, Zheng XX, Steiger J, et al. Prolonged islet allograft acceptance in the absence of expression of interleukin-4. *Adv Nephrol Necker Hosp* 1997; 26:171-80.
40. Vongwiwatana A, Tasanarong A, Hidalgo LG, Halloran PF. The role of B cells and alloantibody in the host response to human organ allografts. *Immunol Rev* 2003; 196:197-218.
41. Ho M. Epidemiology of cytomegalovirus infections. *Rev Infect Dis* 1990; 12 Suppl 7:S701-10.

42. Reinke P, Prosch S, Kern F, Volk HD. Mechanisms of human cytomegalovirus (HCMV) (re)activation and its impact on organ transplant patients. *Transpl Infect Dis* 1999; 1:157-64.
43. Pereyra F, Rubin RH. Prevention and treatment of cytomegalovirus infection in solid organ transplant recipients. *Curr Opin Infect Dis* 2004; 17:357-61.
44. Rubin RH. The indirect effects of cytomegalovirus infection on the outcome of organ transplantation. *Jama* 1989; 261:3607-9.
45. Fishman JA, Rubin RH. Infection in organ-transplant recipients. *N Engl J Med* 1998; 338:1741-51.
46. Walker RC, Marshall WF, Strickler JG, et al. Pretransplantation assessment of the risk of lymphoproliferative disorder. *Clin Infect Dis* 1995; 20:1346-53.
47. Bone RC. Sepsis syndrome. New insights into its pathogenesis and treatment. *Infect Dis Clin North Am* 1991; 5:793-805.
48. Bone RC. The pathogenesis of sepsis. *Ann Intern Med* 1991; 115:457-69.
49. Glauser MP, Zanetti G, Baumgartner JD, Cohen J. Septic shock: pathogenesis. *Lancet* 1991; 338:732-6.
50. Boraschi D, Censini S, Tagliabue A. Interferon-gamma reduces macrophage-suppressive activity by inhibiting prostaglandin E2 release and inducing interleukin 1 production. *J Immunol* 1984; 133:764-8.
51. Bundschuh DS, Barsig J, Hartung T, et al. Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor and IFN-gamma restore the systemic TNF-alpha response to endotoxin in lipopolysaccharide-desensitized mice. *J Immunol* 1997; 158:2862-71.
52. Docke WD, Randow F, Syrbe U, et al. Monocyte deactivation in septic patients: restoration by IFN-gamma treatment. *Nat Med* 1997; 3:678-81.
53. Fischer HG, Opel B, Reske K, Reske-Kunz AB. Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor-cultured bone marrow-derived macrophages reveal accessory cell function and synthesis of MHC class II determinants in the absence of external stimuli. *Eur J Immunol* 1988; 18:1151-8.
54. Randow F, Docke WD, Bundschuh DS, Hartung T, Wendel A, Volk HD. In vitro prevention and reversal of lipopolysaccharide desensitization by IFN-gamma, IL-12, and granulocyte-macrophage colony-stimulating factor. *J Immunol* 1997; 158:2911-8.
55. Smith PD, Lamerson CL, Banks SM, et al. Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor augments human monocyte fungicidal activity for *Candida albicans*. *J Infect Dis* 1990; 161:999-1005.
56. Steeg PS, Johnson HM, Oppenheim JJ. Regulation of murine macrophage Ia antigen expression by an immune interferon-like lymphokine: inhibitory effect of endotoxin. *J Immunol* 1982; 129:2402-6.
57. Czarniecki CW, Chiu HH, Wong GH, McCabe SM, Palladino MA. Transforming growth factor-beta 1 modulates the expression of class II histocompatibility antigens on human cells. *J Immunol* 1988; 140:4217-23.
58. de Waal Malefyt R, Haanen J, Spits H, et al. Interleukin 10 (IL-10) and viral IL-10 strongly reduce antigen-specific human T cell proliferation by diminishing the antigen-presenting capacity of monocytes via downregulation of class II major histocompatibility complex expression. *J Exp Med* 1991; 174:915-24.
59. Volk HD, Thieme M, Heym S, et al. Alterations in function and phenotype of monocytes from patients with septic disease--predictive value and new therapeutic strategies. *Behring Inst Mitt* 1991:208-15.
60. Reinke P, Volk HD. Diagnostic and predictive value of an immune monitoring program for complications after kidney transplantation. *Urol Int* 1992; 49:69-75.

61. Docke WD, Hoflich C, Davis KA, et al. Monitoring Temporary Immunodepression by Flow Cytometric Measurement of Monocytic HLA-DR Expression: A Multicenter Standardized Study. *Clin Chem* 2005; 51:2341-7.
62. Bierer BE, Hollander G, Fruman D, Burakoff SJ. Cyclosporin A and FK506: molecular mechanisms of immunosuppression and probes for transplantation biology. *Curr Opin Immunol* 1993; 5:763-73.
63. Liu J, Farmer JD, Jr., Lane WS, Friedman J, Weissman I, Schreiber SL. Calcineurin is a common target of cyclophilin-cyclosporin A and FKBP-FK506 complexes. *Cell* 1991; 66:807-15.
64. Schreiber SL, Crabtree GR. The mechanism of action of cyclosporin A and FK506. *Immunol Today* 1992; 13:136-42.
65. McCaffrey PG, Perrino BA, Soderling TR, Rao A. NF-ATp, a T lymphocyte DNA-binding protein that is a target for calcineurin and immunosuppressive drugs. *J Biol Chem* 1993; 268:3747-52.
66. Kershner RP, Fitzsimmons WE. Relationship of FK506 whole blood concentrations and efficacy and toxicity after liver and kidney transplantation. *Transplantation* 1996; 62:920-6.
67. Bennett WM, DeMattos A, Meyer MM, Andoh T, Barry JM. Chronic cyclosporine nephropathy in renal transplantation. *Transplant Proc* 1996; 28:2100-3.
68. Plosker GL, Foster RH. Tacrolimus: a further update of its pharmacology and therapeutic use in the management of organ transplantation. *Drugs* 2000; 59:323-89.
69. Wong W, Venetz JP, Tolkoff-Rubin N, Pascual M. 2005 immunosuppressive strategies in kidney transplantation: which role for the calcineurin inhibitors? *Transplantation* 2005; 80:289-96.
70. Jensik SC. Tacrolimus (FK 506) in kidney transplantation: three-year survival results of the US multicenter, randomized, comparative trial. FK 506 Kidney Transplant Study Group. *Transplant Proc* 1998; 30:1216-8.
71. Mayer AD. Four-year follow-up of the European Tacrolimus Multicenter Renal Study. *Transplant Proc* 1999; 31:27S-28S.
72. van Hooff JP, Christiaans MH, van Duijnhoven EM. Tacrolimus and posttransplant diabetes mellitus in renal transplantation. *Transplantation* 2005; 79:1465-9.
73. Webster AC, Woodroffe RC, Taylor RS, Chapman JR, Craig JC. Tacrolimus versus ciclosporin as primary immunosuppression for kidney transplant recipients: meta-analysis and meta-regression of randomised trial data. *Bmj* 2005; 331:810.
74. Miller LW. Cardiovascular toxicities of immunosuppressive agents. *Am J Transplant* 2002; 2:807-18.
75. Kasiske BL. Epidemiology of cardiovascular disease after renal transplantation. *Transplantation* 2001; 72:S5-8.
76. Kobashigawa JA, Kasiske BL. Hyperlipidemia in solid organ transplantation. *Transplantation* 1997; 63:331-8.
77. Singer DR, Jenkins GH. Hypertension in transplant recipients. *J Hum Hypertens* 1996; 10:395-402.
78. Allison AC, Eugui EM. Purine metabolism and immunosuppressive effects of mycophenolate mofetil (MMF). *Clin Transplant* 1996; 10:77-84.
79. Allison AC, Eugui EM. Mycophenolate mofetil and its mechanisms of action. *Immunopharmacology* 2000; 47:85-118.
80. Allison AC, Eugui EM. Mechanisms of action of mycophenolate mofetil in preventing acute and chronic allograft rejection. *Transplantation* 2005; 80:S181-90.
81. Morris RE, Hoyt EG, Murphy MP, Eugui EM, Allison AC. Mycophenolic acid morpholinoethylester (RS-61443) is a new immunosuppressant that prevents and halts heart

- allograft rejection by selective inhibition of T- and B-cell purine synthesis. *Transplant Proc* 1990; 22:1659-62.
82. Morris RE, Wang J, Blum JR, et al. Immunosuppressive effects of the morpholinoethyl ester of mycophenolic acid (RS-61443) in rat and nonhuman primate recipients of heart allografts. *Transplant Proc* 1991; 23:19-25.
83. Placebo-controlled study of mycophenolate mofetil combined with cyclosporin and corticosteroids for prevention of acute rejection. European Mycophenolate Mofetil Cooperative Study Group. *Lancet* 1995; 345:1321-5.
84. A blinded, randomized clinical trial of mycophenolate mofetil for the prevention of acute rejection in cadaveric renal transplantation. The Tricontinental Mycophenolate Mofetil Renal Transplantation Study Group. *Transplantation* 1996; 61:1029-37.
85. Mycophenolate mofetil in renal transplantation: 3-year results from the placebo-controlled trial. European Mycophenolate Mofetil Cooperative Study Group. *Transplantation* 1999; 68:391-6.
86. Mycophenolate mofetil in cadaveric renal transplantation. US Renal Transplant Mycophenolate Mofetil Study Group. *Am J Kidney Dis* 1999; 34:296-303.
87. Mathew TH. A blinded, long-term, randomized multicenter study of mycophenolate mofetil in cadaveric renal transplantation: results at three years. Tricontinental Mycophenolate Mofetil Renal Transplantation Study Group. *Transplantation* 1998; 65:1450-4.
88. Brennan DC, Daller JA, Lake KD, Cibrik D, Del Castillo D. Rabbit antithymocyte globulin versus basiliximab in renal transplantation. *N Engl J Med* 2006; 355:1967-77.
89. Hardinger KL, Bohl DL, Schnitzler MA, Lockwood M, Storch GA, Brennan DC. A randomized, prospective, pharmacoeconomic trial of tacrolimus versus cyclosporine in combination with thymoglobulin in renal transplant recipients. *Transplantation* 2005; 80:41-6.
90. Hardinger KL, Schnitzler MA, Miller B, et al. Five-year follow up of thymoglobulin versus ATGAM induction in adult renal transplantation. *Transplantation* 2004; 78:136-41.
91. Charpentier B, Rostaing L, Berthoux F, et al. A three-arm study comparing immediate tacrolimus therapy with antithymocyte globulin induction therapy followed by tacrolimus or cyclosporine A in adult renal transplant recipients. *Transplantation* 2003; 75:844-51.
92. Belitsky P, MacDonald AS, Cohen AD, et al. Comparison of antilymphocyte globulin and continuous i.v. cyclosporine A as induction immunosuppression for cadaver kidney transplants: a prospective randomized study. *Transplant Proc* 1991; 23:999-1000.
93. Shield CF, Edwards EB, Davies DB, Daily OP. Antilymphocyte induction therapy in cadaver renal transplantation: a retrospective, multicenter United Network for Organ Sharing Study. *Transplantation* 1997; 63:1257-63.
94. Gaber AO, First MR, Tesi RJ, et al. Results of the double-blind, randomized, multicenter, phase III clinical trial of Thymoglobulin versus Atgam in the treatment of acute graft rejection episodes after renal transplantation. *Transplantation* 1998; 66:29-37.
95. Szczech LA, Berlin JA, Aradhye S, Grossman RA, Feldman HI. Effect of anti-lymphocyte induction therapy on renal allograft survival: a meta-analysis. *J Am Soc Nephrol* 1997; 8:1771-7.
96. Szczech LA, Berlin JA, Feldman HI. The effect of antilymphocyte induction therapy on renal allograft survival. A meta-analysis of individual patient-level data. Antilymphocyte Antibody Induction Therapy Study Group. *Ann Intern Med* 1998; 128:817-26.
97. Szczech LA, Feldman HI. Effect of anti-lymphocyte antibody induction therapy on renal allograft survival. *Transplant Proc* 1999; 31:9S-11S.
98. Banhegyi C, Rockenschaub S, Muhlbacher F, et al. Preliminary results of a prospective randomized clinical trial comparing cyclosporine A to antithymocyte globulin immunosuppressive induction therapy in kidney transplantation. *Transplant Proc* 1991; 23:2207-8.

99. Kasiske BL, Johnson HJ, Goerd P, et al. A randomized trial comparing cyclosporine induction with sequential therapy in renal transplant recipients. *Am J Kidney Dis* 1997; 30:639-45.
100. Brennan DC, Flavin K, Lowell JA, et al. A randomized, double-blinded comparison of Thymoglobulin versus Atgam for induction immunosuppressive therapy in adult renal transplant recipients. *Transplantation* 1999; 67:1011-8.
101. Bock H, Tsinalis D, Nিকেleit V, Michatsch M, Thiel G. A randomized prospective study of polyclonal antilymphocyte induction after renal transplantation. *Abstract Book* 1999, 9th Congress ESOT 1999:32.
102. Bonnefoy-Berard N, Vincent C, Revillard JP. Antibodies against functional leukocyte surface molecules in polyclonal antilymphocyte and antithymocyte globulins. *Transplantation* 1991; 51:669-73.
103. Bourdage JS, Hamlin DM. Comparative polyclonal antithymocyte globulin and antilymphocyte/antilymphoblast globulin anti-CD antigen analysis by flow cytometry. *Transplantation* 1995; 59:1194-200.
104. Rebellato LM, Gross U, Verbanac KM, Thomas JM. A comprehensive definition of the major antibody specificities in polyclonal rabbit antithymocyte globulin. *Transplantation* 1994; 57:685-94.
105. Abouna GM, Kumar MS, al-Abdullah IH, et al. Induction immunosuppression with antithymocyte globulin in renal transplantation using a variable dose according to the absolute number of CD3+ T cells. *Transplant Proc* 1995; 27:2676-8.
106. Buchler M, Thibault G, al Najjar A, et al. Monitoring of ATG therapy by flow cytometry and lymphocyte counts in renal transplantation. *Transplant Proc* 1996; 28:2817-8.
107. Bonnefoy-Berard N, Genestier L, Flacher M, et al. Apoptosis induced by polyclonal antilymphocyte globulins in human B-cell lines. *Blood* 1994; 83:1051-9.
108. Bonnefoy-Berard N, Revillard JP. Mechanisms of immunosuppression induced by antithymocyte globulins and OKT3. *J Heart Lung Transplant* 1996; 15:435-42.
109. Bonnefoy-Berard N, Verrier B, Vincent C, Revillard JP. Inhibition of CD25 (IL-2R alpha) expression and T-cell proliferation by polyclonal anti-thymocyte globulins. *Immunology* 1992; 77:61-7.
110. Genestier L, Fournel S, Flacher M, Assossou O, Revillard JP, Bonnefoy-Berard N. Induction of Fas (Apo-1, CD95)-mediated apoptosis of activated lymphocytes by polyclonal antithymocyte globulins. *Blood* 1998; 91:2360-8.
111. Guttmann RD, Flemming C. Sequential biological immunosuppression. Induction therapy with rabbit antithymocyte globulin. *Clin Transplant* 1997; 11:185-92.
112. Bonnefoy-Berard N, Fournel S, Genestier L, Flacher M, Quemeneur L, Revillard JP. In vitro functional properties of antithymocyte globulins: clues for new therapeutic applications? *Transplant Proc* 1998; 30:4015-7.
113. Dharnidharka VR, Stevens G. Risk for post-transplant lymphoproliferative disorder after polyclonal antibody induction in kidney transplantation. *Pediatr Transplant* 2005; 9:622-6.
114. Kasiske BL, Snyder JJ, Gilbertson DT, Wang C. Cancer after kidney transplantation in the United States. *Am J Transplant* 2004; 4:905-13.
115. Waldmann TA, O'Shea J. The use of antibodies against the IL-2 receptor in transplantation. *Curr Opin Immunol* 1998; 10:507-12.
116. Breedveld FC. Therapeutic monoclonal antibodies. *Lancet* 2000; 355:735-40.
117. Maes BD, Vanrenterghem YF. Anti-interleukin-2 receptor monoclonal antibodies in renal transplantation. *Nephrol Dial Transplant* 1999; 14:2824-6.
118. Pascual J, Marcen R, Ortuno J. Anti-interleukin-2 receptor antibodies: basiliximab and daclizumab. *Nephrol Dial Transplant* 2001; 16:1756-60.

119. Souillou JP. Immunosuppression through inhibition of interleukin-2/interleukin-2 receptor interaction. *Transplant Proc* 1999; 31:49S-51S.
120. Kahan BD, Rajagopalan PR, Hall M. Reduction of the occurrence of acute cellular rejection among renal allograft recipients treated with basiliximab, a chimeric anti-interleukin-2-receptor monoclonal antibody. United States Simulect Renal Study Group. *Transplantation* 1999; 67:276-84.
121. Nashan B, Moore R, Amlot P, Schmidt AG, Abeywickrama K, Souillou JP. Randomised trial of basiliximab versus placebo for control of acute cellular rejection in renal allograft recipients. CHIB 201 International Study Group. *Lancet* 1997; 350:1193-8.
122. Lawen JG, Davies EA, Mourad G, et al. Randomized double-blind study of immunoprophylaxis with basiliximab, a chimeric anti-interleukin-2 receptor monoclonal antibody, in combination with mycophenolate mofetil-containing triple therapy in renal transplantation. *Transplantation* 2003; 75:37-43.
123. Sollinger H, Kaplan B, Pescovitz MD, et al. Basiliximab versus antithymocyte globulin for prevention of acute renal allograft rejection. *Transplantation* 2001; 72:1915-9.
124. Lebranchu Y, Bridoux F, Buchler M, et al. Immunoprophylaxis with basiliximab compared with antithymocyte globulin in renal transplant patients receiving MMF-containing triple therapy. *Am J Transplant* 2002; 2:48-56.
125. Mourad G, Rostaing L, Legendre C, Garrigue V, Thervet E, Durand D. Sequential protocols using basiliximab versus antithymocyte globulins in renal-transplant patients receiving mycophenolate mofetil and steroids. *Transplantation* 2004; 78:584-90.
126. Leonardi G, Messina M, Giraudi R, Pellu V, Fop F, Segoloni GP. Basiliximab in association with tacrolimus and steroids in caucasian cadaveric renal transplanted patients: significant decrease in early acute rejection rate and hospitalization time. *Clin Transplant* 2004; 18:113-8.
127. Zembala M, Kowalczyk D, Pryjma J, et al. The role of tumor necrosis factor in the regulation of antigen presentation by human monocytes. *Int Immunol* 1990; 2:337-42.
128. Wanidworanun C, Strober W. Predominant role of tumor necrosis factor-alpha in human monocyte IL-10 synthesis. *J Immunol* 1993; 151:6853-61.
129. Hoffmann MW, Wonigeit K, Steinhoff G, Herzbeck H, Flad HD, Pichlmayr R. Production of cytokines (TNF-alpha, IL-1-beta) and endothelial cell activation in human liver allograft rejection. *Transplantation* 1993; 55:329-35.
130. Lowry RP, Blais D. Tumor necrosis factor-alpha in rejecting rat cardiac allografts. *Transplant Proc* 1988; 20:245-7.
131. Maury CP, Teppo AM. Raised serum levels of cachectin/tumor necrosis factor alpha in renal allograft rejection. *J Exp Med* 1987; 166:1132-7.
132. McLaughlin PJ, Aikawa AA, Davies HM, Bakran A, Sells RA, Johnson PM. Tumour necrosis factor in renal transplantation. *Transplant Proc* 1991; 23:1289-90.
133. Dinarello CA. Interleukin-1 and the pathogenesis of the acute-phase response. *N Engl J Med* 1984; 311:1413-8.
134. Fenton MJ. Review: transcriptional and post-transcriptional regulation of interleukin 1 gene expression. *Int J Immunopharmacol* 1992; 14:401-11.
135. Hirano T, Akira S, Taga T, Kishimoto T. Biological and clinical aspects of interleukin 6. *Immunol Today* 1990; 11:443-9.
136. Fukatsu A, Matsuo S, Yuzawa Y, Miyai H, Futenma A, Kato K. Expression of interleukin 6 and major histocompatibility complex molecules in tubular epithelial cells of diseased human kidneys. *Lab Invest* 1993; 69:58-67.
137. Ruef C, Budde K, Lacy J, et al. Interleukin 6 is an autocrine growth factor for mesangial cells. *Kidney Int* 1990; 38:249-57.
138. Schindler R, Mancilla J, Endres S, Ghorbani R, Clark SC, Dinarello CA. Correlations and interactions in the production of interleukin-6 (IL-6), IL-1, and tumor necrosis factor

- (TNF) in human blood mononuclear cells: IL-6 suppresses IL-1 and TNF. *Blood* 1990; 75:40-7.
139. Ray A, Sehgal PB. Cytokines and their receptors: molecular mechanism of interleukin-6 gene repression by glucocorticoids. *J Am Soc Nephrol* 1992; 2:S214-21.
  140. Yoshimura N, Kahan BD, Oka T. The in vivo effect of cyclosporine on interleukin-6 gene expression in renal transplant recipients. *Transplant Proc* 1991; 23:958-60.
  141. Daniel V, Pasker S, Reiss U, et al. Plasma GM-CSF, IL-6, and IL-3 monitoring allows differentiation between infection and rejection in some renal transplant recipients: preliminary results of a retrospective study. *Transplant Proc* 1993; 25:893-6.
  142. Kaden J, Priesterjahn R. Increasing urinary IL-6 levels announce kidney graft rejection. *Transpl Int* 2000; 13 Suppl 1:S34-41.
  143. Waiser J, Budde K, Katalinic A, Kuerzdorfer M, Riess R, Neumayer HH. Interleukin-6 expression after renal transplantation. *Nephrol Dial Transplant* 1997; 12:753-9.
  144. Matsushima K, Oppenheim JJ. Interleukin 8 and MCAF: novel inflammatory cytokines inducible by IL 1 and TNF. *Cytokine* 1989; 1:2-13.
  145. Sherry B, Cerami A. Small cytokine superfamily. *Curr Opin Immunol* 1991; 3:56-60.
  146. Platzer C, Meisel C, Vogt K, Platzer M, Volk HD. Up-regulation of monocytic IL-10 by tumor necrosis factor-alpha and cAMP elevating drugs. *Int Immunol* 1995; 7:517-23.
  147. Moore KW, O'Garra A, de Waal Malefyt R, Vieira P, Mosmann TR. Interleukin-10. *Annu Rev Immunol* 1993; 11:165-90.
  148. Fiorentino DF, Zlotnik A, Mosmann TR, Howard M, O'Garra A. IL-10 inhibits cytokine production by activated macrophages. *J Immunol* 1991; 147:3815-22.
  149. Defrance T, Vanbervliet B, Briere F, Durand I, Rousset F, Banchereau J. Interleukin 10 and transforming growth factor beta cooperate to induce anti-CD40-activated naive human B cells to secrete immunoglobulin A. *J Exp Med* 1992; 175:671-82.
  150. Rousset F, Garcia E, Defrance T, et al. Interleukin 10 is a potent growth and differentiation factor for activated human B lymphocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1992; 89:1890-3.
  151. Mottram PL, Han WR, Purcell LJ, McKenzie IF, Hancock WW. Increased expression of IL-4 and IL-10 and decreased expression of IL-2 and interferon-gamma in long-surviving mouse heart allografts after brief CD4-monoclonal antibody therapy. *Transplantation* 1995; 59:559-65.
  152. Daniel V, Arzberger J, Melk A, et al. Predictive indicators of rejection or infection in renal transplant patients. *Transplant Proc* 1999; 31:1364-5.
  153. Strehlau J, Pavlakis M, Lipman M, et al. Quantitative detection of immune activation transcripts as a diagnostic tool in kidney transplantation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1997; 94:695-700.
  154. Suthanthiran M. Acute rejection of renal allografts: mechanistic insights and therapeutic options. *Kidney Int* 1997; 51:1289-304.
  155. Dallman MJ, Roake J, Hughes D, Toogood G, Morris PJ. Sequential analysis of IL-2 gene transcription in renal transplants. *Transplantation* 1992; 53:683-5.
  156. Martinez OM, Villanueva JC, Lake J, Roberts JP, Ascher NL, Krams SM. IL-2 and IL-5 gene expression in response to alloantigen in liver allograft recipients and in vitro. *Transplantation* 1993; 55:1159-66.
  157. Oliveira G, Xavier P, Murphy B, et al. Cytokine analysis of human renal allograft aspiration biopsy cultures supernatants predicts acute rejection. *Nephrol Dial Transplant* 1998; 13:417-22.
  158. Kutukculer N, Clark K, Rigg KM, et al. The value of posttransplant monitoring of interleukin (IL)-2, IL-3, IL-4, IL-6, IL-8, and soluble CD23 in the plasma of renal allograft recipients. *Transplantation* 1995; 59:333-40.

159. Billiau A. Interferon-gamma: biology and role in pathogenesis. *Adv Immunol* 1996; 62:61-130.
160. Boehm U, Klamp T, Groot M, Howard JC. Cellular responses to interferon-gamma. *Annu Rev Immunol* 1997; 15:749-95.
161. Lowry RP, Takeuchi T, Cremisi H, Konieczny B. Th2-like effectors may function as antigen-specific suppressor cells in states of transplantation tolerance. *Transplant Proc* 1993; 25:324-6.
162. Onodera K, Hancock WW, Graser E, et al. Th2-type cytokines in the "infectious" tolerance pathway. *Transplant Proc* 1997; 29:1290-1.
163. Levy AE, Alexander JW. Administration of intragraft interleukin-4 prolongs cardiac allograft survival in rats treated with donor-specific transfusion/cyclosporine. *Transplantation* 1995; 60:405-6.
164. Casiraghi F, Ruggenti P, Noris M, et al. Sequential monitoring of urine-soluble interleukin 2 receptor and interleukin 6 predicts acute rejection of human renal allografts before clinical or laboratory signs of renal dysfunction. *Transplantation* 1997; 63:1508-14.
165. Pickeral JJ, Marcus RJ, Hsia S, Miller LL, Nghiem DD. Elevated soluble interleukin 2 receptor levels found among kidney transplant recipients. *Transplantation* 1997; 64:1202-5.
166. Kaden J, May G, Muller P, et al. Intraoperative high-dose anti-T-lymphocyte globulin bolus in addition to triple-drug therapy improves kidney graft survival. *Transplant Proc* 1995; 27:1060-1.
167. Kaden J, May G, Strobelt V, Groth J, Muller P. Intraoperative T-cell depletion prior to completion of anastomoses by high-dose single ATG bolus as a new approach to improve long-term results after kidney transplantation. *Transplant Proc* 1997; 29:344-7.
168. Djamali A, Turc-Baron C, Portales P, et al. Low dose antithymocyte globulins in renal transplantation: daily versus intermittent administration based on T-cell monitoring. *Transplantation* 2000; 69:799-805.
169. Peddi VR, Bryant M, Roy-Chaudhury P, Woodle ES, First MR. Safety, efficacy, and cost analysis of thymoglobulin induction therapy with intermittent dosing based on CD3+ lymphocyte counts in kidney and kidney-pancreas transplant recipients. *Transplantation* 2002; 73:1514-8.
170. Wong W, Agrawal N, Pascual M, et al. Comparison of two dosages of thymoglobulin used as a short-course for induction in kidney transplantation. *Transpl Int* 2006; 19:629-35.
171. Kutukculer N, Shenton BK, Clark K, et al. Renal allograft rejection: the temporal relationship and predictive value of plasma TNF (alpha and beta), IFN-gamma and soluble ICAM-1. *Transpl Int* 1995; 8:45-50.
172. Cho WH, Kim HT, Sohn CY, Park CH, Park SB, Kim HC. Significance of IL-2, IL-2R, IL-6, and TNF-alpha as a diagnostic test of acute rejection after renal transplantation. *Transplant Proc* 1998; 30:2967-9.
173. Budde K, Waiser J, Ceska M, Katalinic A, Kurzdorfer M, Neumayer HH. Interleukin-8 expression in patients after renal transplantation. *Am J Kidney Dis* 1997; 29:871-80.
174. Boratynska M. [Monitoring of interleukin-8 in urine and in serum of patients after kidney transplantation]. *Przegl Lek* 1998; 55:576-80.
175. Smith SD, Wheeler MA, Lorber MI, Weiss RM. Temporal changes of cytokines and nitric oxide products in urine from renal transplant patients. *Kidney Int* 2000; 58:829-37.
176. Kwon O, Molitoris BA, Pescovitz M, Kelly KJ. Urinary actin, interleukin-6, and interleukin-8 may predict sustained ARF after ischemic injury in renal allografts. *Am J Kidney Dis* 2003; 41:1074-87.
177. Yoshimura N, Oka T, Kahan BD. Sequential determinations of serum interleukin 6 levels as an immunodiagnostic tool to differentiate rejection from nephrotoxicity in renal allograft recipients. *Transplantation* 1991; 51:172-6.

178. Klupp J, Dambrin C, Regieli J, van Gelder T, Shorthouse R, Morris RE. New approach in drug development: whole blood pharmacodynamic assays reflect biological activities of tacrolimus. *Transplant Proc* 2001; 33:2172.
179. Magee CC, Denton MD, Womer KL, Khoury SJ, Sayegh MH. Assessment by flow cytometry of intracellular cytokine production in the peripheral blood cells of renal transplant recipients. *Clin Transplant* 2004; 18:395-401.
180. Stalder M, Birsan T, Holm B, Haririfar M, Scandling J, Morris RE. Quantification of immunosuppression by flow cytometry in stable renal transplant recipients. *Ther Drug Monit* 2003; 25:22-7.
181. van den Berg AP, Twilhaar WN, Mesander G, et al. Quantitation of immunosuppression by flow cytometric measurement of the capacity of T cells for interleukin-2 production. *Transplantation* 1998; 65:1066-71.
182. Buchwald S, Friemel H, Plantikow A, Hudemann B, Bast R, Templin R. [Clinical value of interleukin 1- and interleukin 2-determinations in patients after kidney transplantation]. *Allerg Immunol (Leipzig)* 1990; 36:137-45.
183. Dugre FJ, Gaudreau S, Belles-Isles M, Houde I, Roy R. Cytokine and cytotoxic molecule gene expression determined in peripheral blood mononuclear cells in the diagnosis of acute renal rejection. *Transplantation* 2000; 70:1074-80.
184. Acott PD, Crocker JF, Lee S. Simulect and HHV-6 in pediatric renal transplantation. *Transplant Proc* 2004; 36:483S-486S.
185. Acott PD, Lawen J, Lee S, Crocker JF. Basiliximab versus ATG/ALG induction in pediatric renal transplants: comparison of herpes virus profile and rejection rates. *Transplant Proc* 2001; 33:3180-3.
186. Clark G, Walsh G, Deshpande P, Koffman G. Improved efficacy of basiliximab over antilymphocyte globulin induction therapy in paediatric renal transplantation. *Nephrol Dial Transplant* 2002; 17:1304-9.
187. Nampoory MR, Abdulhalim M, Johny KV, et al. Bolus anti-thymocyte globulin induction in renal transplant recipients: a comparison with conventional ATG or anti-interleukin-2 receptor antibody induction. *Transplant Proc* 2002; 34:2916-9.
188. Tullius SG, Pratschke J, Strobelt V, et al. ATG versus basiliximab induction therapy in renal allograft recipients receiving a dual immunosuppressive regimen: one-year results. *Transplant Proc* 2003; 35:2100-1.
189. McDyer JF, Li Z, John S, Yu X, Wu CY, Ragheb JA. IL-2 receptor blockade inhibits late, but not early, IFN-gamma and CD40 ligand expression in human T cells: disruption of both IL-12-dependent and -independent pathways of IFN-gamma production. *J Immunol* 2002; 169:2736-46.
190. Kaden J, Schutze B, May G. A critical analysis of soluble interleukin-2 receptor levels in kidney allograft recipients. *Transpl Int* 1996; 9 Suppl 1:S63-7.
191. Nickerson P, Jeffery J, Rush D. Long-term allograft surveillance: the role of protocol biopsies. *Curr Opin Urol* 2001; 11:133-7.
192. Li B, Hartono C, Ding R, et al. Noninvasive diagnosis of renal-allograft rejection by measurement of messenger RNA for perforin and granzyme B in urine. *N Engl J Med* 2001; 344:947-54.
193. Kotsch K, Mashreghi MF, Bold G, et al. Enhanced granulysin mRNA expression in urinary sediment in early and delayed acute renal allograft rejection. *Transplantation* 2004; 77:1866-75.
194. Matz M, Beyer J, Wunsch D, et al. Early post-transplant urinary IP-10 expression after kidney transplantation is predictive of short- and long-term graft function. *Kidney Int* 2006; 69:1683-90.

## 11 Anhang

### Veröffentlichungen

1: Nather BJ, Nickel P, Bold G, Presber F, Schonemann C, Pratschke J, Volk HD, Reinke P. Modified ELISPOT technique--highly significant inverse correlation of post-Tx donor-reactive IFN $\gamma$ -producing cell frequencies with 6 and 12 months graft function in kidney transplant recipients. *Transpl Immunol.* 2006 Nov;16(3-4):232-7.

2: Nickel P, Kreutzer S, Bold G, Friebe A, Schmolke K, Meisel C, Jurgensen JS, Thiel A, Wernecke KD, Reinke P, Volk HD. CD31+ naive Th cells are stable during six months following kidney transplantation: implications for post-transplant thymic function. *Am J Transplant.* 2005 Jul;5(7):1764-71.

3: Nickel P, Presber F, Bold G, Biti D, Schonemann C, Tullius SG, Volk HD, Reinke P. Enzyme-linked immunosorbent spot assay for donor-reactive interferon- $\gamma$ -producing cells identifies T-cell presensitization and correlates with graft function at 6 and 12 months in renal-transplant recipients. *Transplantation.* 2004 Dec 15;78(11):1640-6.

4: Kotsch K, Mashreghi MF, Bold G, Tretow P, Beyer J, Matz M, Hoerstrup J, Pratschke J, Ding R, Suthanthiran M, Volk HD, Reinke P. Enhanced granulysin mRNA expression in urinary sediment in early and delayed acute renal allograft rejection. *Transplantation.* 2004 Jun 27;77(12):1866-75.

### Vorträge/Posterpräsentationen

Posterpräsentation auf dem Kongress der American Society of Transplantation, Chicago/USA, Mai 2001: „Standardized immune monitoring in the early phase after kidney transplantation“

Vortrag auf dem American Transplant Congress, Washington/USA, April 2002: „FTY720 induces lymphopenia but does not influence T-lymphocyte and monocyte function in renal transplant patients“

Posterpräsentation auf dem American Transplant Congress, Boston/USA, Mai 2004: „Elderly graft recipients do not show signs of relative immunodeficiency“

Vortrag auf dem American Transplant Congress, Seattle/USA, Mai 2005: “Effects of parathyroidectomy on immune responsiveness of kidney transplant patients requiring parathyroidectomy” und Posterpräsentation “Deterioration of renal graft function in kidney transplant patients requiring parathyroidectomy”

Posterpräsentation auf dem 7th International Conference on New Trends in Immunosuppression and Immunotherapy, Berlin, Februar 2006: “FTY 720 spares effector/memory T cells – clinical consequences for safety and efficacy”

Posterpräsentation auf dem World Transplant Congress, Boston/USA, Juli 2006: “Re-programming of T-cell subset distribution in Campath-1H mAb treated kidney transplant patients“

## **Danksagung**

Zuerst möchte ich mich bei meiner Doktormutter Frau Prof. Petra Reinke und meinem Doktorvater Herrn Prof. Hans-Dieter Volk bedanken für die Überlassung des Themas, für ihre jahrelange Unterstützung, für ihr Vertrauen und für Ihre Geduld bis zur Fertigstellung dieser Arbeit insbesondere für die interessanten Diskussionen und hilfreichen Anregungen bei der Durchführung der Arbeit.

Ganz besonders möchte ich mich auch bei Frau Christa Liebenthal für ihre Unterstützung bei der praktischen Umsetzung der Arbeit bedanken.

Ohne die Hilfe der Mitarbeiter des Institutes für Medizinische Immunologie insbesondere Kristin Neuhaus, Ingrid Jäkel und Ulrike Mönnich wäre diese Arbeit nicht möglich gewesen.

Mein Dank gilt auch Conny Höflich, die jederzeit mit Rat und Tat zur Seite stand.

Herrn Dr. Wolf Döcke möchte ich mich für die Hilfe bei der statistischen Datenverarbeitung danken.

Allen meinen Mitdoktoranden danke ich für die schöne Zeit im Labor.

Ganz herzlichen Dank an alle Patienten, die ihr Blut regelmäßig zur Verfügung gestellt haben, sowie an die Schwestern und Ärzte der Station 13 und Nierentransplantationsambulanz CVK.

Schließlich möchte ich meinen Eltern und meiner Familie für ihre Unterstützung danken.

## **Lebenslauf**

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

Gantuja Bold

Berlin, den 29.01.2008

## **Erklärung an Eides Statt**

Ich, Gantuja Bold, erkläre, dass ich die vorgelegte Dissertationsschrift mit dem Thema „Standardisiertes Immunmonitoring in der Frühphase nach Nierentransplantation zur pharmakodynamischen Erkennung einer Über- oder Untersuppression“ selbst verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt, ohne die (unzulässige) Hilfe Dritter verfasst und auch in Teilen keine Kopien anderer Arbeiten dargestellt habe.

Gantuja Bold

Berlin, den 29.01.2008