

Aus der Klinik für Innere Medizin m. S. Nephrologie
der Medizinischen Fakultät Charité – Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

Einfluss von immunsuppressiven Substanzen auf die
Funktionen humaner B-Lymphozyten

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

vorgelegt der Medizinischen Fakultät
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Martin Lehnert

aus Stendal

Gutachter/in: 1. Prof. Dr. med. K. Budde
 2. Prof. Dr. med. M. Giessing
 3. Prof. Dr. med. M Zeier

Datum der Promotion: 23.06.2013

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	1
1.1 Die Funktionen der menschlichen Niere	1
1.2 Die terminale Niereninsuffizienz	2
1.3 Nierentransplantation als Therapie der terminalen Niereninsuffizienz.....	3
1.4 Rejektion des transplantierten Organs.....	4
1.4.1 Zeitliche Einteilung	4
1.4.2 Einteilung nach dem Verlauf.....	5
1.5 B-Lymphozyten in der Transplantationsmedizin	7
1.5.1 Reifung von B-Lymphozyten	7
1.5.2 Aktivierung von B-Lymphozyten	8
1.5.3 Immunglobuline	9
1.5.4 Antikörper-vermittelte Gewebeschädigung	10
1.5.5 Klinische Manifestation und Nachweis einer Antikörper-vermittelten Rejektion..	10
1.6 Immunsuppressive Therapie nach einer Nierentransplantation	11
1.6.1 Standard-Immunsuppressiva	12
1.6.2 Neue Immunsuppressiva	14
2. Zielstellung	17
3. Methoden und Material	18
3.1 Probandenkollektiv	18
3.2 Isolierung von mononukleären Zellen des peripheren Blutes	18
3.2.1 Zellen zählen	19
3.2.2 Magnetische Zellseparation von CD19-positiven Zellen.....	19
3.3 Stimulation und Inkubation der Zellen.....	20
3.4 Immunsuppressivazugabe	20
3.5 Durchflusszytometrische Messung	21
3.6 ELISA.....	22
3.6.1 Proliferationsverhalten	22
3.6.2 Oberflächenmarker CD80	23
3.6.3 Immunglobuline G und M.....	24
3.6.4 Apoptose.....	25
3.7 Materialien.....	27

4. Ergebnisse	30
4.1 Beeinflussung des Zellteilungsverhaltens von B-Lymphozyten durch immunsuppressive Substanzen.....	30
4.2 Einfluss von immunsuppressiven Substanzen auf die CD80-Exprimierung humaner B-Lymphozyten.....	35
4.3 Auswirkungen von immunsuppressiven Substanzen auf die Produktion von IgG und IgM durch humane B-Lymphozyten	38
4.3.1 Einfluss auf die IgG-Produktion	38
4.3.2 Einfluss auf die IgM-Produktion.....	41
4.4 Einfluss von immunsuppressiven Substanzen auf das Apoptoseverhalten von B-Lymphozyten.....	44
5. Diskussion	50
5.1 Immunsuppressiva-Wirkung auf die Proliferation humaner B-Lymphozyten <i>in vitro</i> ..	50
5.2 Beeinflussung der CD80-Exprimierung humaner B-Lymphozyten durch immunsuppressive Substanzen <i>in vitro</i>	53
5.3 Produktion von IgG und IgM durch humane B-Lymphozyten unter Immunsuppressiva-Einfluss <i>in vitro</i>	56
5.4 Beeinflussung der Apoptose humaner B-Lymphozyten durch immunsuppressive Substanzen <i>in vitro</i>	60
5.5 Untersuchungen von humanen B-Lymphozyten mit Sotrastaurin, MPA und Everolimus <i>in vitro</i>	63
5.6 Ausblick auf eine Calcineurininhibitor-freie immunsuppressive Therapie	64
5.7 Ausblick auf zukünftige Studien	66
5.8 Limitationen der Studie	67
6. Zusammenfassung.....	69
7. Schriftenverzeichnis	70
Lebenslauf.....	78
Danksagung.....	79
Erklärung.....	80
Teilpublikationen	81

Abkürzungsverzeichnis

AK	Antikörper
AMR	Antibody-mediated Rejection
APC	Antigen-presenting cell
APRIL	A proliferation-inducing ligand
BAFF	B cell activating factor of the TNF family
CD	Cluster of Differentiation
CFSE	Carboxyfluorescein succinimidylester
CKD	Chronic kidney disease
CNI	Calcineurin-Inhibitor
CTLA-4	Cytotoxic T-Lymphocyte Antigen 4
DNA	Deoxyribonucleic acid
DZ	Dendritische Zellen
ELISA	Enzyme Linked Immunosorbent Assay
EPO	Erythropoetin
FCS	Fetal Calf Serum
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
FACS	Fluorescence Activated Cell Sorting
FL	Fluoreszenzkanal
FSC	Forward light scatter
GFR	Glomeruläre Filtrationsrate
HIV	Humanes Immundefizienz-Virus
HLA	Human Leucocyte Antigen
HRP	Horseradish peroxidase
IFN α	Interferon α
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
IMPDH	Inosinmonophosphat-Dehydrogenase
IS	Immunsuppressivum/-a
JAK-3	Janus-Kinase 3
MACS	Magnetic Activated Cell Sorting
MARCKS	Myristoylated alanine-rich C-kinase substrate
MHC	Major Histocompatibility Complex
MPA	Mycophenolsäure
mTOR	Mammalian Target of Rapamycin
Nf κ B	Nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells
NK	Natürliche Killerzellen
NTX	Nierentransplantation
PBMC	Peripheral Blood Mononuclear Cells
PBS	Phosphat buffered saline
PE	Phycoerythrin
PI	Propidium Iodid
PKC	Proteinkinase C
PS	Phosphatidylserin
PTLD	Post-transplant lymphoproliferative disorder
rpm	Rotations per Minute
SLE	Systemischer Lupus erythematodes
SSC	sideward light scatter
TNF α	Tumornekrosefaktor α

1. Einleitung

1.1 Die Funktionen der menschlichen Niere

Die paarig angelegten Nieren haben eine wichtige Entgiftungs- und Stoffwechselfunktion (1). Ihre Aufgaben sind die Entgiftung, die Regulation des Flüssigkeits- und Salzhaushaltes sowie die Regulation des Säure-Base-Gleichgewichtes. Giftstoffe und harnpflichtige Substanzen wie Kreatinin, Harnstoff und Harnsäure werden aus dem Blut gefiltert und anschließend mit dem Urin ausgeschieden. Die Niere ist weiterhin an der komplexen Regulation des Blutdrucks maßgeblich beteiligt. Ist der Blutdruck zu niedrig, werden Organe eventuell nicht ausreichend mit Sauerstoff und Nährstoffen versorgt. Ist der Blutdruck zu hoch, werden auf Dauer die Blutgefäße und die Organe geschädigt. Ursachen der arteriellen Hypertonie sind unter anderem die Störung des Renin-Angiotensin-Aldosteron-Systems und die Störung des sympathischen Nervensystems (2). Diese Pathomechanismen bedingen eine Volumenretention, eine gesteigerte Inotropie und eine erhöhte Vasokonstriktion. Des Weiteren kommt es durch epitheliale Dysfunktion zur Ausbildung von Gefäßwandplaques, die Gefäßverengungen hervorrufen können. Mögliche entstehende Komplikationen sind Atherosklerose, Myokardinfarkt, Myokardinsuffizienz, Apoplex und Niereninsuffizienz (3). Die Niere ist auch am Knochenstoffwechsel beteiligt. In der Niere gebildetes aktives 1,25-Dihydroxycholecalciferol ermöglicht dem Körper, Kalzium und Phosphat über den Darm zu resorbieren und unter anderem in die Knochen einzulagern. Eine verminderte intestinale Phosphat- und Kalziumresorption bei Mangel an aktivem Vitamin D hat eine gesteigerte Sekretion von Parathormon zur Folge. Klinisch zeigt sich folglich ein sekundärer Hyperparathyreoidismus sowie eine möglicherweise renale Osteopathie (4). Zudem produziert die Niere das Hormon Erythropoetin (EPO), welches die Bildung der Erythrozyten anregt. Unterbleibt der Stimulus zur Produktion von EPO, treten Störungen in der Erythropoese auf. Dies kann zu einer renalen Anämie führen (5-6).

Die Filtrationsleistung der Nieren kann durch die glomeruläre Filtrationsrate (GFR) quantifiziert werden. Eine Abnahme der Nierenfunktion spiegelt sich in einer erniedrigten GFR wider und wird als Niereninsuffizienz bezeichnet. Als Folge kann es zu den oben genannten Krankheitsbildern kommen. Das irreversible Endstadium der chronischen

Niereninsuffizienz wird als terminale Niereninsuffizienz bezeichnet. Diese ist durch das dauerhafte Versagen der Nierenfunktionen gekennzeichnet (6-7).

1.2 Die terminale Niereninsuffizienz

Ein Nierenschaden ist gekennzeichnet durch den Verlust von Nephronen auf Grund der Zerstörung von Glomeruli und Tubuli, die Fibrose von Nierengewebe und atherosklerotische Veränderungen der großen und kleinen Nierengefäße. Die Niereninsuffizienz kann in eine akute und eine chronische Verlaufsform eingeteilt werden.

Eine akute Niereninsuffizienz kann innerhalb von Stunden bis Tagen auftreten. Die Ursachen einer akuten Niereninsuffizienz sind vielfältig (8). Wir unterscheiden eine prä-, intra- und postrenale akute Niereninsuffizienz. Eine Ursache der prärenalen Niereninsuffizienz ist beispielsweise die Minderperfusion der Niere mit Blut. Diese kann in einer Ischämie als Folge einer Obstruktion der zuführenden Gefäße, einer Hypotonie oder Hypovolämie oder in einer Zirkulationsstörung des Blutes bei Herzinsuffizienz begründet sein. Mögliche Ursache einer akuten intrarenalen Niereninsuffizienz sind eine rasch progrediente Glomerulonephritis (RPGN) oder systemische Erkrankungen, die mit einer RPGN einhergehen, beispielsweise der systemische Lupus erythematodes (SLE). Weiterhin können toxisch oder ischämisch bedingte Tubulusnekrosen und tubuläre Verstopfung mit Uraten oder Hämolyseprodukten die Funktion einschränken (9). Die häufigste Ursache einer postrenalen Niereninsuffizienz ist eine Obstruktion der ableitenden Harnwege durch Nierensteine oder Tumoren, beispielsweise der Prostata. Seltener mindert die Verlegung der Harnblase die Nierenfunktion.

Die chronische Niereninsuffizienz (Chronic Kidney Disease, CKD) ist ein langsam voranschreitender Verlust der Nierenfunktionen. Arterieller Hypertonus ist eine prominente Begleiterkrankungen und zugleich neben dem Diabetes mellitus häufigste Ursache des chronischen Nierenversagens (10-11). Beiden gemein ist eine Minderdurchblutung im Endstromgebiet. Diese Erkrankungen treten häufig in Kombination mit abdomineller Adipositas und laborchemisch nachgewiesener Dyslipidämie auf. Dieses Krankheitsbild wird als metabolisches Syndrom bezeichnet (12). Patienten mit einem metabolischen Syndrom oder mit vorangegangener schwerer akuter Niereninsuffizienz weisen ein erhöhtes Risiko für eine CKD auf. Nikotinabusus hat einen negativen Einfluss auf den Krankheitsverlauf. Autoimmunerkrankungen wie beispielsweise der SLE oder toxische Nebenwirkungen von Medikamenten oder Schwermetallen gelten ebenso als mögliche Krankheitsursachen (6). Sie

werden jedoch seltener diagnostiziert. Die oben beschriebenen Krankheiten können allein einen progressiven Funktionsverlust der renalen Filtration hervorrufen, wobei ein Auftreten in Kombination die Prognose erheblich verschlechtert (6). Definitionsgemäß spricht man bei einer persistierenden GFR unter 15 ml/min von einem irreversiblen dauerhaften Ausfall der Nieren, der einer chronischen Nierenersatztherapie bedarf. Der Patient kann über den langwierigen Krankheitsverlauf einer chronischen Niereninsuffizienz diesen Wert erreichen oder akut in dieses Stadium eintreten.

1.3 Nierentransplantation als Therapie der terminalen Niereninsuffizienz

Bei einer glomerulären Filtrationsrate unter 15 ml/min wird eine Nierenersatztherapie eingeleitet. Zu den etablierten Methoden der Nierenersatztherapie zählen die Hämo- oder Peritonealdialyse oder die Nierentransplantation (NTX). Das Blutreinigungsverfahren Dialyse nutzt das Prinzip der Osmose. Durch einen Konzentrationsausgleich kleinmolekularer Substanzen mit dem Dialysat werden im Blut angereicherte Giftstoffe herausgefiltert. Eine Dialysebehandlung beeinträchtigt die körperliche Leistungsfähigkeit, soziale Integration sowie zeitliche und örtliche Flexibilität der Patienten. Zudem ist sie kostenaufwendig (6, 13). Durch eine NTX kann die Lebensqualität der Patienten verbessert und die Sterblichkeitsrate deutlich reduziert werden (6-7). Ferner liegen die Gesamtkosten einer NTX und deren Anschlusstherapie im Vergleich deutlich niedriger als die einer Dialysetherapie. Aus den genannten Gründen ist die NTX die Therapie der Wahl (13-15). In den sieben Ländern, welche mit der Vermittlungsstelle für Organspenden „Eurotransplant“ kooperieren, besteht ein Mangel an Spenderorganen. Die durchschnittliche Wartezeit für eine Spenderniere betrug im Jahr 2010 54 Monate bis zum Zeitpunkt der Transplantation. Ende des Jahres 2010 warteten noch 10768 Patienten auf eine Spenderniere (16). Die Durchführung einer Lebendspende ist gesetzlich geregelt und ermöglicht in circa 20% der Transplantationen in Deutschland die Organspende. Organe von Hirntoten werden nach Blutgruppe, Wartezeit und Übereinstimmung des Humanen-Leukozyten-Antigens (HLA) an den passenden Empfänger vermittelt (6, 17-18). Der Anteil der postmortalen Organspenden an der Gesamtzahl aller Organspenden in den Eurotransplant-Staaten betrug im Jahr 2010 75% (16). Dies verdeutlicht, dass man nicht auf Spenderorgane von Hirntoten verzichten kann. Auf Grund der langen Wartezeiten und des hohen Bedarfs ist man dazu übergegangen, Organe mit erweiterten Spenderkriterien zu akzeptieren (19). Das Alter des Spenders spielt neben dem Zustand des Organs eine wichtige Rolle für den Erfolg der NTX. Ausschlusskriterien für eine

Organspende sind beispielsweise das Vorliegen von bestimmten Infektionskrankheiten (z.B. HIV) und das Vorliegen eines metastasierenden Krebsleidens des Spenders (6).

1.4 Rejektion des transplantierten Organs

Als Rejektion bezeichnet man primär die immunologische Reaktion auf das Transplantat und sekundär dessen Funktionsverlust. Pathophysiologisch erfolgt eine Immunantwort des Empfängers auf die Antigene des Spenderorgans. Daraus resultieren pathologische Umbauvorgänge im Transplantatgewebe und möglicherweise der Untergang von Nephronen. Eine Einteilung der Rejektion kann im Bezug auf den Zeitpunkt ihres postoperativen Eintretens oder der Art des Verlaufs erfolgen.

1.4.1 Zeitliche Einteilung

Die hyperakute Rejektion tritt unmittelbar nach der Transplantation auf, nach Minuten oder Stunden. Das Komplementsystem wird durch blutgruppenspezifische Antikörper und HLA-Antigene des Spenders aktiviert. Infolge dessen kommt es zu einer Fibrinablagerung in den Gefäßen des Transplantats und schließlich zur Thrombose. Die Thrombose führt letztendlich dazu, dass das Gewebe abstirbt und eine Transplantatektomie erfolgen muss (20-21). Heute wird diese Art der Rejektion nur noch äußerst selten beschrieben, da sie durch einen vor der Transplantation durchgeführten „crossmatch“-Test so gut wie ausgeschlossen werden kann (22).

Die akzelerierte Rejektion tritt wenige Tage nach der Transplantation auf. Ähnlich der hyperakuten Rejektion kommt es hier zu einer Minderdurchblutung des Transplantats. Klinische Anzeichen dieses Rejektionstyps sind primäre Non-funktion bzw. eine Nierenfunktionsverschlechterung. Frühere Transplantationen, Bluttransfusionen oder Schwangerschaften sind Ursache für die Bildung der Spender-spezifischen Antikörper (6). Besonders bei Zweittransplantatempfängern, die aus immunologischen Gründen bereits eine Niere verloren haben, zirkulieren präformierte Antikörper im Blut. Diese Antikörper sind gegen HLA-Antigene des Spenders gerichtet und können die akzelerierte Rejektion verursachen (21, 23). Eine Spenderspezifität kann schon im Vorfeld über „crossmatch“-Tests nachgewiesen werden und ist ein Grund, eine Transplantation nicht durchzuführen (22). Prozesse, die zur Ausbildung dieses Krankheitsbildes führen, schädigen das Spenderorgan

letztendlich soweit, dass dessen Funktion langfristig beeinträchtigt und das Langzeitüberleben reduziert ist (24).

Akute Rejektionen treten meist ein bis vier Wochen nach Transplantation ein. Sie zeigen ein vielfältiges pathohistologisches Bild, das nach den Banff-Kriterien klassifiziert wird (25). Kriterien für eine Rejektion sind Infiltration mit mononukleären Zellen, das Vorliegen einer Tubulitis, einer Arteriitis und einer vaskulären Abstoßungsreaktion. Je nach Ausmaß des Befundes wird die akute Rejektion in verschiedene Schweregrade Typ I-III eingeteilt (25). Die Ursachen sind oft auf eine unzureichende Immunsuppression oder Non-Compliance des Patienten zurückzuführen. Gezielte Reinstruierung des Patienten und rechtzeitige Neudosierung der Immunsuppressiva sind Versuche, den drohenden Transplantatverlust zu verhindern (20). Bei histologischem Nachweis einer akuten Abstoßung ist die Steroid-Bolus-Therapie zurzeit die Maßnahme, über eine intensivierete Immunsuppression die Reaktion des Körpers zu verhindern (26). Im Anschluss an diese kurzzeitige Medikation sollte die bisherige Immunsuppressiva-Kombination umgestellt werden, um eine erneute darin begründete Abstoßungsreaktion zu vermeiden.

Eine chronische Rejektion tritt Monate bis Jahre nach der Transplantation auf. Die genauen Ursachen sind bis heute nicht eindeutig geklärt. HLA-Antikörper, sowie spezifische und unspezifische Entzündungsmechanismen und –mediatoren sind an der Immunreaktion beteiligt. Im Fall einer durchgeführten Transplantation und der Bildung von Spender-spezifischen Antikörpern im Empfänger kann eine Transplantatglomerulopathie die Folge sein. Glomeruli, Interstitium, Tubuli sowie zu- und abführende Gefäße sind von den pathologischen Veränderungen betroffen und führen dann zum Nephronenverlust und zur interstitiellen Fibrose. Die interstitielle Fibrose stellt neben der Intimafibrose der Gefäße und seltener der Transplantatglomerulopathie histologisch das Kardinalsymptom der chronischen Abstoßung dar (20-21).

1.4.2 Einteilung nach dem Verlauf

Es wird zwischen der zellulären und der humoralen Rejektion unterschieden. Es kommt aber immer häufiger zu Überschneidungen dieser beider Typen, auf Grund dessen eine klare Abgrenzung zwischen den Abstoßungsformen nicht immer möglich ist (27). In vielen Fällen ist die therapeutische Konsequenz dadurch erschwert.

Das zelluläre Abwehrsystem besteht aus Makrophagen, Lymphozyten und Granulozyten (20-21). Ursache der zellulären und humoralen Rejektion ist die Unverträglichkeit zwischen Spender- und Empfängergewebe auf Grund von Gewebeunterschieden (Miss-matching) und deren Erkennen durch Lymphozyten. Diese Unterschiede werden über die Klasse -I- und -II-Moleküle des Major Histocompatibility Complex (MHC I und II) definiert. Die MHC-Gene sind auf dem kurzen Arm des sechsten Körperchromosoms lokalisiert. MHC-Moleküle bestehen aus polymorphen Glykoproteinen, die auf der Zelloberfläche der Gewebe exprimiert sind. Zu MHC I zählen HLA-A, -B und -C. Zu MHC II zählen HLA-DP, DQ und DR. Dabei definiert die Bezeichnung A, B, C oder DP-R die genaue Lokalisation auf dem Chromosomenarm. MHC I und II sichern das Erkennen der Antigene durch die T-Lymphozyten. MHC I werden von den meisten Gewebe und Zellen exprimiert. Hingegen werden MHC II von einer geringeren Anzahl an Zelltypen exprimiert (6, 28). Zu MHC-II-exprimierenden Zellen zählen B-Lymphozyten, Makrophagen, Monozyten und folliculäre dendritische Zellen (DZ). Jedoch können MHC II bei Bedarf auf weiteren Zellen exprimiert werden, beispielsweise T-Lymphozyten, Endothelzellen, Nierentubuluszellen und Beta-Zellen des Pankreas (29). Sobald ein Transplantat in den Körper eingebracht wird, erkennen die Zellen des Immunsystems die Fremdartigen. Antigen-präsentierende Zellen (APC) des Spenders oder des Empfängers präsentieren den T-Helferzellen fremde Antigene. Die Antigen-spezifische Interaktion von T-Zell-Rezeptor, kostimulatorischen Molekülen und Alloantigenen initiiert im Folgenden die Aktivierung der T-Lymphozyten. Während dieses Prozesses werden die T-Lymphozyten komplexen intrazellulären Veränderungen unterworfen, die in einer klonalen Expansion von aktivierten zytotoxischen T-Lymphozyten und T-Helferzellen gipfeln (30). Eine Rekrutierung T-Zell-abhängiger Effektorzellen, zum Beispiel Natürlicher Killerzellen (NK) und Makrophagen, schließt sich an. Die Effektorphase ist gekennzeichnet durch den Spenderantigen-spezifischen Zelltod durch zytotoxische T-Lymphozyten. Eine Hauptrolle in den Mechanismen der Transplantatabstoßung spielen Zytokine, die von T-Helferzellen freigesetzt werden. Sie stimulieren autokrin und parakrin die Immunantwort. Dies führt zu ausgeprägten Entzündungsprozessen im Transplantat mit anschließendem Zelluntergang. T-Lymphozyten sind zentral an der Koordination der Immunantwort und damit auch an der Transplantatabstoßung beteiligt. Auf Grund dessen sind sie ein entscheidender Ansatzpunkt der immunsuppressiven Therapie (31-32).

Die zelluläre Organabstoßung kann weiterhin auf zwei verschiedene Arten klassifiziert werden, dem direkten und dem indirekten Weg. Welcher dieser Pfade beschritten wird, hängt

von der T-Zell-Aktivierungsart nach Antigenerkennung ab. Der direkte Weg bezieht den MHC-Komplex mit ein, der auf der Oberfläche der APC des Spenders liegt und mit dem T-Zell-Rezeptor der Empfänger-T-Zelle interagiert und dadurch eine T-Zell-Aktivierung auslöst. Auf Grund der angeborenen Fähigkeit der T-Zell-Rezeptoren ist es ihnen stets möglich, die intakten alloge MHC-Komplexe zu erkennen. Der indirekte Aktivierungsweg basiert auf den Spender-Antigenen, die durch Empfänger-APCs aufgenommen, in Peptidfragmente umgewandelt und den Empfänger-T-Lymphozyten präsentiert werden. Nach einer NTX wandern Spender-APCs vom Spenderorgan zu sekundären lymphatischen Organen. Auf dieser Strecke stimulieren die Spender-APCs die Empfänger-T-Lymphozyten auf dem direkten Weg. Die Empfänger-T-Lymphozyten infiltrieren das Transplantat und induzieren eine inflammatorische Reaktion. Wenn die Spender-APCs erschöpft sind, erhalten die Empfänger-APCs die Immunantwort aufrecht, indem sie die bearbeiteten Antigene, die sie aus dem Spenderorgan festgehalten haben, weiterpräsentieren (6).

Neue T-Zell-spezifische immunsuppressive Therapien haben im letzten Jahrzehnt zu einem drastischen Rückgang der zellulären Abstoßungsraten sowie zur besseren Kontrolle von zellulären Abstoßungsreaktionen geführt. Im Gegensatz dazu sprechen Antikörper-vermittelte humorale Abstoßungen meist nicht auf herkömmliche immunsuppressive Behandlungen an und führen daher zum Transplantatverlust.

1.5 B-Lymphozyten in der Transplantationsmedizin

Mit dem steigenden Interesse an der bis dahin wenig erforschten humoralen Abstoßung nach einer Nierentransplantation sind die B-Lymphozyten in den Fokus der Wissenschaft gerückt und werden im Folgenden eingehend betrachtet (6).

1.5.1 Reifung von B-Lymphozyten

Es existieren zwei Subpopulationen von B-Lymphozyten. Die B1-Zellen gehören zum angeborenen Immunsystem und entwickeln sich im pränatalen und fetalen Stadium. Sie sind selbsterneuernd und bilden einen Teil des immunologischen Gedächtnisses („natural memory“), das in der Phase des Übergangs von primär angeborener zu primär erworbener Immunität bedeutsam ist. Hingegen gehören die B2-Zellen zum erworbenen Immunsystem und reifen erst während der postnatalen Phase im Knochenmark. Die Entwicklungsfolge beginnt mit den pluripotenten hämatopoetischen Stammzellen und der Differenzierung zu

pro-myeloischen lymphoiden Zellen. Anschließend vollziehen sie eine Reifung über die Pro-B-Lymphozyten hin zu Prä-B-Lymphozyten. In diesem Stadium werden durch die Expression von Immunglobulin M (IgM) B-Zell-Rezeptoren gebildet, welche für das Erkennen fremder Antigene notwendig sind. Die unreifen B-Lymphozyten verbleiben ein bis drei Tage im Knochenmark, ehe sie in die Milz wandern. Dort differenzieren sie zu follikulären- oder Marginalzonen-B-Lymphozyten und verbleiben in der Milz (20). Für die Proliferation der B-Lymphozyten ist das von T-Helfer-Lymphozyten ausgeschüttete Interleukin 4 von großer Bedeutung. Es sorgt im Zuge der Differenzierung für einen Klassenwechsel der Antikörper hin zu IgA, IgG und IgE.

Da die humorale Immunantwort des Transplantatempfängers zum großen Teil auf proliferativen Prozessen der B-Lymphozyten basiert, kann eine medikamentöse Hemmung zentraler intrazellulärer Prozesse wie der Signaltransduktion, Nukleotid-Synthese und Proteintranslation deutliche Auswirkungen auf die B-Zell-Proliferation haben (33-34).

Die Gabe immunsuppressiver Substanzen kann jedoch bei Fehldosierung intrinsische oder extrinsische Prozesse auslösen, die zur Induzierung der Apoptose führen. Abhängig vom geforderten Wirkungsprofil des jeweiligen Medikamentes, muss man die Folgen der immunsuppressiven Behandlung einzuschätzen wissen.

1.5.2 Aktivierung von B-Lymphozyten

Über den B-Zell-Rezeptor aufgenommene Antigene werden in die Zelle transportiert, in Peptidfragmente gespalten und auf MHC II geladen. Diese Komplexe werden auf der Oberfläche der B-Lymphozyten präsentiert, welche nun in lymphatischen Geweben mit T-Helferzellen interagieren können, um eine suffiziente humorale Immunantwort auf T-Zell-abhängige Antigene zu etablieren. Auf Grund der hohen Dichte von B- und T-Lymphozyten in den sekundären lymphatischen Organen ist hier die Wahrscheinlichkeit eines Aufeinandertreffens von spezifischen T-Helfer- und B-Lymphozyten am größten. Zur Aktivierung werden zwei Signale benötigt. Signal 1 erhalten die B-Lymphozyten durch die Bindung des MHC II- Peptid-Komplexes an den T-Zell-Rezeptor. Signal 2 erhalten sie über die Bindung des CD40-Liganden auf den T-Helferzellen an das konstitutiv exprimierte kostimulatorische Molekül CD40. Die Aktivierung der B-Lymphozyten führt zur klonalen Expansion. Weiterhin wird auf dem Antigen-präsentierenden B-Lymphozyten eine verstärkte Expression des für T-Lymphozyten kostimulatorischen Moleküls B7 ausgelöst. Dieses

Molekül wird in zwei Untereinheiten unterteilt. B7.1 (CD80) und B7.2 (CD86) wirken zusammen und dienen als Ligand für CD28 und das zytotoxische T-Lymphozyten Antigen 4 (CTLA-4) (35-37). Eine Beeinflussung der Expression von CD80 hätte einen fehlenden Stimulus und somit eine Unterbrechung des Aktivierungsprozesses der Abwehrkaskade zur Folge. Als zusätzliche Folge der CD40L-CD40-Interaktion produzieren die T-Helferzellen verstärkt Zytokine, wie z.B. IL-4 als Wachstumsfaktor für B-Lymphozyten. Auf jenen wird durch die Aktivierung eine Expression von Interleukin-Rezeptoren wie beispielsweise IL-4R induziert. All diese Vorgänge führen letztlich zur Entstehung von Antigen-präsentierenden Zellen, Antikörper-sezernierenden Plasmazellen sowie B-Gedächtnis-Zellen (20).

1.5.3 Immunglobuline

Der terminale Differenzierungsgrad der B-Lymphozyten ist die Antikörper-produzierende Plasmazelle. Antikörper (= Immunglobuline, Ig) lassen sich in fünf Klassen unterteilen. Diese sind IgM, IgD, IgG, IgE und IgA. Jeder Isotyp hat seine spezifische Antigenbindungsstelle, die sich an dem N-terminalen Abschnitt zwischen Leicht- und Schwereketten befindet. Diese beiden Polypeptidkettenarten sind kovalent aneinander gebunden und allen Immunglobulinen gemein. Die C-Termini der schweren Ketten bilden die Fc-Region des Igs und sind für die Effektorfunktion des jeweiligen Isotyps verantwortlich. Das dimere IgA wird auf den Schleimhäuten der Atemwege, der Augen und des Magen-Darm-Traktes sezerniert und schützt den Menschen vor Pathogenen. IgD, IgE und IgG gleichen sich in ihrer monomeren Struktur, haben jedoch unterschiedliche Aufgaben. IgD wirkt bei der durch Antigenstimulation ausgelösten Vermehrung und Differenzierung von B-Lymphozyten als Antigenrezeptor. IgE ist unter anderem für den Schutz gegen Parasiten verantwortlich und induziert durch Quervernetzung mit sich selbst die Histaminausschüttung. Dies führt zu allergischen Reaktionen. IgG ist der Marker für eine durchgemachte Infektion oder erfolgte Impfung. Seine Verweildauer im Blut beträgt bis zu drei Wochen. Zudem aktivieren zwei über ein Antigen gebundene Antikörper dieses Typs das Komplementsystem. Gleiches wird auch durch die Anheftung von Antigenen an das IgM-Pentamer verursacht. Auf Grund der vielen Bindungsstellen an diesem Molekül erkennt es Antigene zuerst und ist daher Kennzeichen für eine akute Infektion. Im Zuge einer Transplantatabstoßung infiltrieren Plasmazellen das Spenderorgan und produzieren IgM. Im weiteren Verlauf wird durch T-Zell-Stimulation ein Klassenwechsel ausgelöst, bei dem die IgM-Sezernierung zu Gunsten der von

IgG eingestellt wird. IgG sind die hauptsächlichen Effektormoleküle der humoralen Immunabwehr (20).

1.5.4 Antikörper-vermittelte Gewebeschädigung

Die häufigste Effektorfunktion der Antikörper nach einer NTX ist die Aktivierung des Komplementsystems über den klassischen Weg (38). Dies wird durch die Interaktion zwischen der Fc-Region der IgG oder IgM und einem Antigen ausgelöst. Das Hauptziel der in das Spenderorgan eingedrungenen Antikörper sind die Zellen des Endothels. Komplementeffekte verursachen im Zuge der Antikörper-vermittelten Rejektion (Antibody-mediated Rejection, AMR) eine Endothelaktivierung. Dadurch wird die Schutzfunktion der Grenzschicht mit ihren antikoagulatorischen und antiinflammatorischen Eigenschaften gemindert. Hinzu kommt die Bildung prokoagulatorischer und proinflammatorischer Substanzen, was zur Einwanderung alloreaktiver T-Lymphozyten, NK-Zellen und Phagozyten führt (20). Diese Immunzellen tragen zur Schädigung der Spenderniere in erheblichem Maße durch eine direkte Einwirkung auf dessen Gefäße bei. Der Mechanismus der Opsonierung und anschließenden Phagozytose ist ein weiterer Bestandteil der Antikörper-vermittelten Immunantwort. Die Erkennung der Spender-spezifischen Antigene durch Antikörper erlaubt den Phagozyten die Aufnahme und Eliminierung körperfremder Zellen. Eine andere Fähigkeit der Immunglobuline ist die Zell-vermittelte Zytotoxizität. Als Effektorzellen dienen dabei die angelockten NK-Zellen oder die zytotoxischen T-Lymphozyten (39). Zusätzlich besteht die Möglichkeit einer AMR, bei der die Immunglobuline nicht gegen HLA-Antigene gerichtet sind. Auch die Interaktion mit dem Angiotensin II Typ 1 Rezeptor kann eine Antikörper-vermittelte Transplantatabstoßung verursachen (40). Die Gesamtreaktion aus Komplementaktivierung, Opsonierung/ Phagozytose und Zytotoxizität wird durch Antikörper ausgelöst, welche von Plasmazellen produziert werden. Dies demonstriert die zentrale Rolle der B-Lymphozyten in der Immunabwehr und damit auch bei Abstoßungsvorgängen nach einer NTX.

1.5.5 Klinische Manifestation und Nachweis einer Antikörper-vermittelten Rejektion

Die Ausdifferenzierung von B-Lymphozyten in Plasmazellen mit der anschließenden Antikörperproduktion ist verantwortlich für die AMR. Diese Komplikation tritt bei ca. 7% der Nierentransplantat-Empfänger auf (41). Drei Symptome werden klinisch beim Auftreten einer

AMR beschrieben: der morphologische Beweis einer akuten Abstoßung, der immunpathologische Nachweis einer Antikörper- und Komplementreaktion sowie der serologische Nachweis von Antikörpern gegen HLA-Antigene des Spenders. Eine genaue Einteilung erfolgt in eine akute oder eine chronische AMR (42). Daneben werden die Ablagerung der Komplementkomponente C4d in den peritubulären Kapillaren sowie die Anzahl der zirkulierenden Spender-spezifischen Antikörper beobachtet (8, 43). Bei Bestehen einer B-Zell-Infiltration liegen zwei bestimmte Zelltypen vor. Diese tragen die Oberflächenmoleküle CD38 und CD20, welche für Plasmazellen und B-Lymphozyten stehen. Das Vorkommen von CD38-positiven Zellen korreliert nachweisbar mit der Anwesenheit von Spender-spezifischen Antikörpern und C4d in den peritubulären Kapillaren (44). Organe, die abgestoßen wurden, weisen zudem einen hohen Grad an Infiltration mit CD20-positiven Zellen auf. Die verstreute Anreicherung der C4d-Komponente des Komplementsystems im Transplantat kann ein möglicher Beleg einer vorliegenden AMR sein, allerdings ist nur etwa ein Drittel der AMR C4d-positiv (45). In Transplantatbiopsien ist ein signifikanter Zusammenhang zwischen dem C4d-Nachweis und der Expression des B-Zell-aktivierenden Faktors der Tumornekrosefaktorenfamilie (B cell activating factor of the TNF family, BAFF) belegt worden (46). In Studien wurde eine Korrelation zum Bestehen einer Transplantatglomerulopathie nachgewiesen (47). Die Transplantatglomerulopathie kann eine immunologische oder nicht-immunologische Ätiologie aufweisen. Mit Hilfe von Biopsien werden als mögliche Folgen die interstitielle Fibrose oder die Tubulusatrophie entdeckt. Die Ursache des endgültigen Organversagens sind daraus folgende Mikrozirkulationsstörungen im Gewebe.

Um zu verhindern, dass es zu einer zellulär vermittelten oder humoralen Immunreaktion gegen das transplantierte Organ kommt, müssen die Patienten einer immunsuppressiven Therapie unterzogen werden.

1.6 Immunsuppressive Therapie nach einer Nierentransplantation

Nach einer Nierentransplantation erhalten die Patienten immunsuppressive Medikamente zur Protektion vor einer Organrejektion (17). Diese Medikamente setzen an unterschiedlichen Punkten der Immunabwehr an und blockieren zentrale Abläufe in der Zelle, beispielsweise die Zellteilung, die Zellkommunikation und die kostimulatorischen Signalwege. Die Entwicklung der heute standardisiert verwendeten Immunsuppressiva fokussierte sich auf die Verhinderung der T-Zell-vermittelten zellulären Abstoßung.

Ein einziges Immunsuppressivum allein wäre in hohen Dosen möglicherweise in der Lage, eine Transplantatrejektion zu verhindern, würde dabei aber für den Patienten unvereinbare Nebenwirkungen erzeugen. Man versucht daher, über die Kombination unterschiedlicher Wirkstoffe die Abstoßungsreaktion des Körpers zu unterdrücken (17). Der gleichzeitige Einfluss verschiedener Immunsuppressiva auf unterschiedliche Wirkmechanismen der Immunabwehr erlaubt die Reduzierung der einzelnen Wirkstoffdosen. Bisher bekannte Kombinationen erzielen derweil gute bis sehr gute Ergebnisse, weisen aber dennoch weiterhin erhebliche Nebenwirkungen auf. Daher ist man stets bemüht, die standardisierten Immunsuppressiva-Kombinationen durch neue zu ersetzen, alternative Wirkmechanismen anzusprechen oder alte Kombinationsmöglichkeiten durch neue „Mitglieder“ zu komplementieren. Ob diese neuen Therapieoptionen dieselben Ergebnisse in der Rejektionsprophylaxe erreichen oder in Wechselwirkung mit den anderen Komponenten eine deutliche Steigerung der Wirksamkeit mit sich bringen, sollen laufende und zukünftige klinische Studien zeigen (48).

Die besten klinischen Erfahrungen für eine Initialtherapie hat man mit einer Kombination aus einem Glucocorticoid, einem Calcineurin- und einem Proliferationsinhibitor gemacht (17). Zudem wird heute meist eine Induktionstherapie mit Antikörpern vor der Transplantation eingeleitet (49). Die Erhaltungstherapie beruht auf geringer dosierten IS-Kombinationen (17, 50).

1.6.1 Standard-Immunsuppressiva

Der Gebrauch von antiinflammatorischen und immunsuppressiven Glucocorticoiden, beispielsweise Prednisolon, ist nach NTX mit vielfachen Nebenwirkungen verbunden. Dazu zählen Bluthochdruck, Hyperlipidämie, Kataraktbildung, Osteoporose, Verhaltensänderungen und Wachstumsverzögerungen bei Kindern (20, 51). Diese lange Liste an bekannten Nebenwirkungen kann bei Patienten auch zu mangelnder Compliance führen.

Calcineurininhibitoren (CNI) sind beispielsweise Tacrolimus und Cyclosporin A. Diese Substanzen hemmen die Aktivität des Enzyms Calcineurin, das bei der Signalweiterleitung in der T-Zelle eine wichtige Rolle spielt (Abb. 1). Durch die Störung der Signalübertragung wird die Aktivität und Vermehrung der T-Lymphozyten und damit die Abwehrreaktion inhibiert (17). Die Verwendung dieser Wirkstoffe ist verbunden mit Nephro-, Neuro- und

Hepatotoxizität, Diabetes mellitus und Bluthochdruck [16, 42-43]. Auch eine erhöhte Rate von Tumoren ist beschrieben worden (52-53). Auf Grund dieser großen Anzahl an möglichen Komplikationen ist man daher stets bemüht, die Exposition von CNIs zu verringern oder ganz zu vermeiden (54-55). Dennoch sind die CNIs als IS nicht wegzudenken, da sie die Zahl der akuten Rejektionen erheblich reduzieren.

Der häufigste Vertreter der Proliferationsinhibitoren ist die Mycophenolsäure (MPA). Das Immunsuppressivum wird in Form eines Esters, dem Mycophenolat-Mofetil, vom Patienten oral eingenommen. Nach Aufnahme wird es im Körper zur MPA umgewandelt. Diese hemmt die Inosinmonophosphat-Dehydrogenase (IMPDH) nicht-kompetitiv und reversibel (Abb. 1). Die IMPDH synthetisiert Guanin-enthaltende Nukleotide, welche die Basis der Purinsynthese in den T- und B-Lymphozyten bilden. Sie ist somit ein Schlüsselenzym der *de novo* Purinsynthese. Unter MPA-Administration fehlen den Immunzellen diese Bausteine für die DNA-Replikation, was folglich die Hemmung der Zellteilung bedeutet (33, 56-57). Viele Studien haben die eindeutige Überlegenheit von MPA gegenüber Azathioprin in Bezug auf eine Reduktion von Rejektionen gezeigt, vor allem in Kombination mit Cyclosporin A (17, 58-61). MPA wirkt toxisch auf die Blutbildung und häufig werden gastrointestinale Symptome beobachtet.

Eine andere Möglichkeit, in die Zellteilung einzugreifen, ist die Inhibition des Proteins mammalian Target of Rapamycin (mTOR) durch Everolimus oder Sirolimus (Abb. 1). Hierbei wird die Translation von Proteinen durch eine Phosphorylierung von Cyclinen unterbrochen, die an der Mitose beteiligt sind (17, 62). Im Lymphozyten bindet Everolimus intrazellulär an das Immunophilin FKBP12 (12-kDa FK506-binding protein) und hemmt dadurch die Aktivität der mTOR-Kinase. Auf diese antiproliferative und zugleich antiangiogenetische Wirkung sprechen auch Tumorzellen an, was ein erwünschter Nebeneffekt ist (63). Obwohl die mTOR-Inhibitoren keine direkte nephrotoxische Wirkung aufweisen, machen Nebenwirkungen wie Wundheilungsstörungen, Anämie, Lymphödeme und Fertilitätsstörungen bei Männern eine dauerhafte Behandlung mit Proliferationsinhibitoren schwierig (64-66).

Die immunsuppressive Wirkung von Antikörpern beruht auf dem Prinzip der spezifischen Oberflächenrezeptorblockade auf T- und B-Lymphozyten. Tritt bei Bindung eine Zellaktivierung auf, so ist dies mit einer Zytokinfreisetzung verbunden, welche besonders nach Gabe der ersten Dosis bestimmte systemische Symptome hervorruft (51). Bei T-

Lymphozyten-depletierenden Antikörpern kommt es zu deutlich vermehrtem Auftreten von opportunistischen Infektionen und malignen Tumoren als Nebenwirkung. Zudem besteht nach jeder Transplantation das Risiko einer posttransplantären lymphoproliferativen Erkrankung (PTLD) (67).

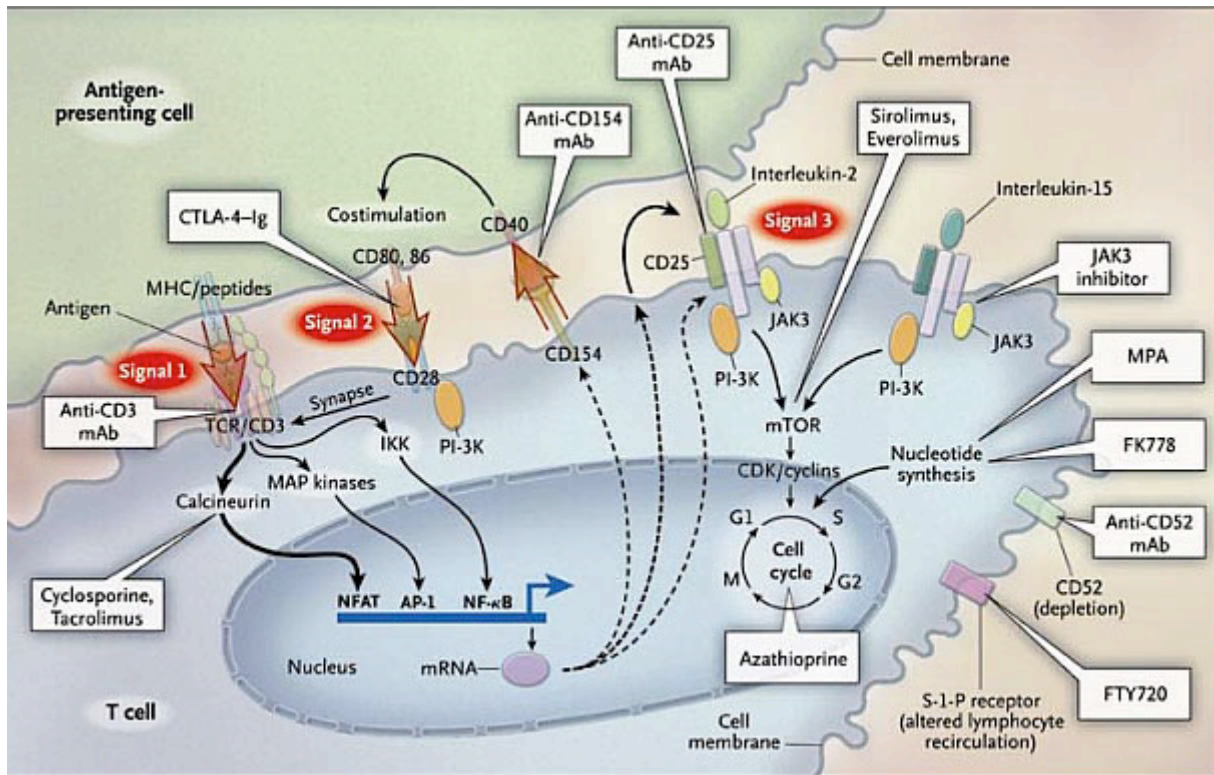


Abb. 1 Immunsuppressive Substanzen und deren Wirkung auf Aktivierungswege der zell-vermittelten Immunantwort (Halloran PF, Immunosuppressive drugs for kidney transplantation, N Eng J Med., 2004)

1.6.2 Neue Immunsuppressiva

In der Transplantationsmedizin ist man stets daran interessiert, neue IS zu entwickeln. Diese sollen mit neuen Wirkmechanismen spezifisch in die Signalwege des Immunsystems eingreifen und so eine identische oder bessere Immunsuppression als die konventionellen IS erreichen. Ziel ist die Entwicklung neuer IS, deren Nebenwirkungsprofil geringer ist als das der konventionellen IS.

Zurzeit befindet sich CP-690 550 in der Erprobung in Phase-IIa-Studien zur Anwendung bei Organtransplantationen sowie in Phase-III-Studien zur Behandlung der Rheumatoiden Arthritis (68). CP-690 550 hemmt die Signalübertragung von Zytokin-Rezeptoren, im Speziellen die Janus-Kinase 3 (JAK3) und verhindert auf diesem Weg die Transkription von

Genen. JAK3 wird nur in lympho-/ hämatopoetischen Zellen exprimiert, wodurch Nebenwirkungen auf andere Zellen unwahrscheinlich sind (69).

Belatacept ist ein Fusionsprotein, welches CD80 und CD86 auf der APC bindet und somit die Interaktion mit CD28 verhindert. Diese Substanz blockiert dadurch das kostimulierende Signal für die T-Zell-Aktivierung. Die Zulassung des Präparats erfolgte in Deutschland im Juni 2011. Belatacept soll in Kombination mit MPA und Corticosteroiden eine Cyclosporin-freie Rejektionsprophylaxe bilden (48, 70-71).

Die Antikörper-vermittelten humoralen Abstoßungsreaktionen stellen eine therapeutische Herausforderung dar, da das medikamentöse Behandlungsspektrum dieser Rejektionsart noch stark eingeschränkt ist. Nach heutigem Kenntnisstand werden Patienten dieses Abstoßungstyps einer Plasmapherese unterzogen, bekommen intravenöse Immunglobuline und Rituximab. Rituximab ist ein chimärer monoklonaler Antikörper, der sich gegen Memory-B-Lymphozyten richtet und bisher das einzige bekannte B-Zell-spezifische Immunsuppressivum ist (72). Er wird schon seit längerer Zeit in der Krebstherapie zur Behandlung von Lymphomen und zur Therapie von Autoimmunerkrankungen wie der rheumatoiden Arthritis eingesetzt (73-74). Die Ergebnisse der Plasmapherese und der intravenösen Immunglobulin-Gabe sind nicht zufriedenstellend, zudem wird die Effektivität von Rituximab zurzeit kritisch diskutiert (75-77).

Ein neues Immunsuppressivum, das sich in der klinischen Erprobung bei transplantierten Patienten befindet, ist der Proteinkinase-C-Inhibitor (PKC-Inhibitor) Sotrastaurin (78). Eine Unterscheidung der Subtypen der PKC-Familie erfolgt über die Charakteristik der Regulationsmechanismen und der Aminosäuresequenzen. Die 12 verschiedenen Isoenzyme sind unterteilt in klassische/-konventionelle (cPKC), neue (nPKC) und atypische PKC (aPKC) (79). Mitglieder der PKC-Familie sind wichtige Rezeptoren für Phorbolster, eine Klasse von Tumorpromotoren (80-81). Weiterhin sind die myristoylated alanine-rich C-kinase substrate (MARCKS)-Proteine PKC-Substrate, die in vielen Zelltypen auftreten. Sie sind involviert in entscheidende physiologische Prozesse wie Apoptose, Zytokinexpression und -sekretion, Zellzyklus, Zellmigration und -adhäsion sowie Aktivierung und Inhibition von spezifischen T-Zell-differenzierenden Genen (82-83). Zudem spielen Isoformen der PKC eine wichtige Rolle in der Aktivierung des Nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer' of

activated B-cells (NfκB) (84-85), einem Mediator von Rejektionsprozessen nach der soliden Organtransplantation (86).

Die für zelluläre Prozesse entscheidende Stellung der in einer Vielzahl an Zelltypen exprimierten PKC-Isotypen wurde in den vergangenen Jahren in *in vitro* und *in vivo* Untersuchungen mit knockout- und transgenen Mäusen ermittelt. Es wurde nachgewiesen, dass die Mitglieder der PKC-Familie wesentlichen Einfluss auf intrazelluläre Signalwege haben. Diese bilden die Basis für die Vermittlung von Entwicklung, Differenzierung, Aktivierung und Überleben von T- und B-Lymphozyten (87-89), sowie für die Aktivierung von Makrophagen und DZ (90).

Die aufgezeigte zentrale Rolle in der Zellsignalisierung stellt die PKC als ein geeignetes Ziel für immunsuppressive Medikamente heraus. Die Entwicklung von PKC-spezifischen Inhibitoren und das bessere Verständnis über den Wirkmechanismus von PKC-Isoformen in einzelnen Immunzelltypen können zur Etablierung neuer Behandlungsmethoden gegen Organrejektion führen. Sotrastaurin ist ein neues Therapeutikum, welches potente und selektiv inhibitorische Eigenschaften der cPKC und nPKC-Isoformen aufweist. Es ist der erste oral verabreichte PKC-Inhibitor (91-92). Seine Effizienz und Verträglichkeit wurde in zwei nicht verblindeten, randomisierten, multizentrischen Studien mit *de novo* nierentransplantierten Patienten analysiert (93-94). Weitere klinische Studien zu Sotrastaurin laufen derzeit.

Bisher publizierte funktionelle Untersuchungen befassten sich mit der Wirkung von Sotrastaurin auf T-Lymphozyten, DZ und NK-Zellen. Dabei zeigten sich vor allem die T-Lymphozyten als potentes Ziel für den PKC-Inhibitor (78, 93). Bis heute sind keine Daten verfügbar, welche den Effekt von Sotrastaurin auf B-Lymphozyten und die durch sie eingeleitete humorale Immunantwort belegen. Die PKC-β ist für die Aktivierung der B-Lymphozyten essentiell und daher theoretisch ein vielversprechender Ansatzpunkt für eine Immunsuppression nach Transplantation (95). Laut Mitteilung der Firma Novartis vom 27. März 2012 wird die Weiterentwicklung von Sotrastaurin auf Grund *in vivo* auftretender kardiovaskulärer Beschwerden gestoppt.

2. Zielstellung

Die humorale Organabstoßung ist ein zentrales Problem nach einer Nierentransplantation. Dies kann die Nierenfunktion und das Transplantatüberleben entscheidend beeinflussen. B-Lymphozyten sind die Vermittler der derzeit noch nicht vollständig entschlüsselten Abstoßungsmechanismen. Die Aufklärung dieser Rejektionsvorgänge sowie einer möglichen Suppression der Funktion und Aktivierung von B-Lymphozyten sind Forschungsschwerpunkte der Transplantationsmedizin.

Derzeit steht kein zufriedenstellendes Behandlungsrepertoire der humoralen Rejektion zur Verfügung. Daher besteht ein großes Interesse an der detaillierten Aufklärung der Wirkung bekannter und neuer immunsuppressiver Substanzen auf B-Lymphozyten.

Im Rahmen dieser Arbeit soll der Einfluss der immunsuppressiven Substanzen Sotrastaurin, MPA und Everolimus einzeln und kombiniert auf die Funktionen primärer humaner B-Lymphozyten untersucht werden. Im Einzelnen werden folgende Teilaspekte untersucht:

1. Welche Effekte haben Sotrastaurin, MPA und Everolimus isoliert oder in Kombination auf das Proliferationsverhalten primärer humaner B-Lymphozyten?
2. Welche Wirkung haben die Immunsuppressiva Sotrastaurin, MPA und Everolimus isoliert oder in Kombination auf die CD80-Exprimierung sowie die IgG- und IgM-Produktion primärer humaner B-Lymphozyten?
3. Wirken die Immunsuppressiva Sotrastaurin, MPA und Everolimus isoliert oder in Kombination auf das Apoptoseverhalten primärer humaner B-Lymphozyten?

3. Methoden und Material

3.1 Probandenkollektiv

Für die vorliegende Studie dienten als Probanden gesunde Spender aus dem Bekanntenkreis des Doktoranden. Im Zeitraum von Mai bis September 2010 wurden 14 erwachsene Patienten für die Studie rekrutiert. Keiner der Spender hatte ein bekanntes Leiden, das auf eine Aktivierung oder Suppression des Immunsystems hingedeutet hätte. Ausschlusskriterium in der Probandengruppe war das Bestehen einer akuten Infektion zum Zeitpunkt der Blutentnahme oder das Vorliegen einer schweren systemischen Erkrankung. Bei subjektiver Gesundheit wurden in der Nephrologischen Klinik der Charité Berlin Mitte zwischen 40-60ml Vollblut pro Spender in Citratröhrchen entnommen. Alle Probanden wurden über die geplanten Untersuchungen aufgeklärt und gaben schriftlich ihre Einwilligung zur Verwendung ihres Blutes für die Versuchsreihe. Je Versuchsreihe wurde Blut von sechs Spendern untersucht (n=6). Ein positives Votum der Ethikkommission der Charité Berlin lag vor Beginn der Studie vor (Ethikantragnummer: EA1/133/06).

3.2 Isolierung von mononukleären Zellen des peripheren Blutes

Die Isolierung von mononukleären Zellen des peripheren Blutes (Peripheral Blood Mononuclear Cells, PBMC) aus mit Citrat versetztem Vollblut der Probanden erfolgte mittels Dichtegradientenzentrifugation (78, 96). Bei dieser Art der Gradientenzentrifugation wird die zu trennende Suspension über eine geeignete Trennlösung geschichtet und anschließend bis zum Erreichen des Sedimentationsgleichgewichtes zentrifugiert, sodass sich die unterschiedlichen Zellfraktionen entsprechend ihrer Dichte auftrennen. Nach Abschluss der Zentrifugation befinden sich die mononukleären Zellen in der als weißlicher Ring erkennbaren Interphase. Hierzu wurde das Blut mit gleichem Volumen einer phosphatgepufferten Salzlösung (Phosphat buffered saline, PBS) verdünnt und in Leucosep-Röhrchen, die mit 15ml Ficoll befüllt waren, überführt. Nach 30 Minuten Zentrifugation bei RT und 300 x g ordneten sich die PBMC auf Grund des Dichtegradienten zwischen dem Plasma und dem Separationsmedium an. Dieser „weiße Zellring“ wurde mit einer Pasteurpipette abpipettiert, erneut in PBS gelöst und bei 1200 rpm bei 4°C für 10 Minuten zentrifugiert. Es erfolgte ein Waschschriff, um restliches Ficoll-Paque Plus und Thrombozyten zu entfernen. Die Pellets wurden vereinigt und in 12ml PBS aufgenommen.

3.2.1 Zellen zählen

Anschließend wurden die Zellen unter dem Lichtmikroskop auf einer Neubauer improved Zählkammer gezählt und nach der Berechnungsformel

$$\text{Zellen} / 0,1\text{mm}^3 * \text{Verdünnungsfaktor} * 10^4$$

die Zellzahl berechnet. Die Ausbeute pro 48ml citratisiertem peripherem Blut lag in der Regel bei $2-4 \times 10^7$ PBMCs. Im Anschluss wurden die Zellen erneut bei 1200rpm und 4°C für 10 Minuten mit PBS gewaschen.

3.2.2 Magnetische Zellseparation von CD19-positiven Zellen

Die Expression charakteristischer Oberflächenantigene kann zur Isolierung von einzelnen Zellpopulationen genutzt werden, wie zum Beispiel CD19 bei den B-Lymphozyten (97-98). Bei der magnetischen Zellseparation (Magnetic Activated Cell Sorting, MACS) (Miltenyi Biotec GmbH) werden spezifische Antikörper gegen Oberflächenantigene, die an magnetische Partikel gekoppelt sind, verwendet. Die Zellsuspension wird auf eine Trennsäule pipettiert, die eine Matrix aus plastikumhüllten, magnetischen Fasern enthält und im Feld eines Magneten platziert wird. Die Zellen, an die zuvor die Magnetpartikel-gekoppelten Antikörper gebunden haben, werden zurückgehalten, während unmarkierte Zellen passieren. Durch Entfernung der Säule aus dem magnetischen Feld können im Folgenden die Zellen von Interesse eluiert und für weitere Untersuchungen eingesetzt werden. Zur Anreicherung Antigen-spezifischer B-Lymphozyten wurden die PBMC bis zu diesem Schritt zweimal mit PBS gewaschen. Auf Grund der errechneten Zellzahl nach der oben angegebenen Berechnungsformel wurden zu 10^7 Zellen je 80µl MACS-Puffer und 20µl CD19 MicroBeads (Miltenyi Biotec) hinzugegeben. Daraufhin erfolgte eine gute Durchmischung und eine 15-minütige Inkubation bei 4°C im Kühlschrank. Im Anschluss an diesen Waschschrift mit MACS-Puffer (10min, 300g, 4°C) folgte das Aufbringen auf die Trennsäule. Nach dreimaligem Durchlaufen mit je 3ml MACS-Puffer wurde die Säule aus dem magnetischen Feld entfernt und die CD19-positiven-AK-gekoppelten B-Lymphozyten eluiert. Aus dem B-Zell-Konzentrat wurden 50µl entnommen, um die Reinheit der Proben mittels Durchflusszytometrie zu überprüfen.

3.3 Stimulation und Inkubation der Zellen

Damit äußere Einflüsse wie Nährstoffangebot oder Temperaturschwankungen den Ansatz nicht verfälschten, wurden die B-Lymphozyten in einem Nährmedium mit den Stimulantien folgender Konzentrationen α -CD40 (1 μ g/ml), ODN2006-CPG (2,5 μ M) und IL-4 (10ng/ml) in einem 37°C warmen Inkubationsschrank, bei 5%iger CO₂ gesättigter Atmosphäre und 98%iger Luftfeuchtigkeit inkubiert. Das Medium der Firma Biochrom AG enthält neben der VLE RPMI 1640 Medium-Basis Zusätze von Fetalem Kälberserum (FCS), Glutamin und Penicillin-Streptomycin (PEST), um optimale Bedingungen für die Zellkulturen zu schaffen. Die Zusammensetzung der Stimulantien war für alle Ansätze gleich. Die Stimulantien hatten die Aufgabe, die B-Lymphozyten in den aktivierten Zustand zu versetzen und dadurch eine verbesserte Wechselwirkung mit den Immunsuppressiva zu induzieren. ODN2006-CPG besteht aus synthetischen Oligonucleotiden, die durch Toll-like Rezeptor 9 erkannt werden und immunstimulative Effekte hervorrufen. In diesem Versuch verwendetes ODN2006-CPG Typ B aktiviert die B-Lymphozyten besonders stark, stimuliert die IFN- α -Sekretion hingegen nur schwach. Eine vergleichbare Aufgabe, die B-Lymphozyten zu aktivieren, hatte der α -CD40-AK in dem Ansatz. In Zusammenspiel mit IL-4 sollte es stimulierende Signale liefern. IL-4 wird im menschlichen Körper von Mastzellen oder T-Zellen produziert. In unserem Versuch wurde es hinzugefügt, um die Kostimulation von α -CD40 zu gewährleisten und zudem eine optimale Umgebung für die B-Lymphozyten im Medium sicherzustellen. Die Regulierung von Proliferation, Überleben und Genexpression sowie Cytokin-Produktion der B-Lymphozyten erfolgte durch das IL-4. Zur genauen Verteilung der B-Lymphozyten auf die 21 wells wurde ein Mastermix aus Medium und den oben angeführten Stimulantien hergestellt, in dem die B-Lymphozyten gelöst wurden. Im Anschluss daran wurden je 200 μ l dieser Suspension in ein well gegeben.

3.4 Immunsuppressivazugabe

Um die immunsuppressive Wirkung auf humane B-Lymphozyten zu testen, wurden Substanzen mit hemmendem Einfluss auf die Proteinkinase-C, die Zellproliferation und das mTOR-Protein auf die Zellreihen gegeben. Für diese Arbeit wurden Sotrastaurin, MPA und Everolimus untersucht. Neben einer DMSO- und Ethanol-Kontrolle wurden Verdünnungsreihen der Immunsuppressiva auf Mediumbasis angesetzt. Sotrastaurin-Konzentrationen von 5nM bis 500nM, MPA von 1ng/ml bis 10 μ g/ml und Everolimus aufsteigend von 0,01ng/ml bis 100ng/ml wurden zu den B-Lymphozyten hinzugegeben.

Unsere Forschungsgruppe wählte Konzentrationen ober- und unterhalb der Talspiegel-Werte, sowie in dem Bereich der Talspiegel. Diese liegen laut Literatur für Sotrastaurin bei 400ng-1000ng/ml, wobei die von uns verwendeten 500nM 249ng/ml entsprechen (93). Für MPA beträgt der Wert 1,0-3,5µg/ml und für Everolimus 3-8ng/ml (99-100). Zudem wurde die Wirkung der Kombinationen bestimmter Konzentrationen auf die B-Lymphozyten untersucht. Die erste Kombination bestand aus 500nM Sotrastaurin und 100ng/ml MPA. 500nM Sotrastaurin und 1ng/ml Everolimus bildeten die zweite Kombination. Die letzte Zweiermischung wurde aus 1ng/ml Everolimus und 100ng/ml MPA hergestellt. Die Kombinierung aller drei Immunsuppressiva erfolgte mit den Konzentrationen 500nM Sotrastaurin, 1ng/ml Everolimus und 100ng/ml MPA.

3.5 Durchflusszytometrische Messung

Die Durchflusszytometrie (Fluorescence Activated Cell Sorting, FACS) ermöglicht die quantitative Bestimmung von Oberflächenmolekülen und intrazellulären Proteinen durch den Einsatz fluoreszenzgekoppelter Antikörper (78). Fluorochrome sind Fluoreszenzfarbstoffe, die in der Lage sind, Licht einer bestimmten Wellenlänge zu absorbieren und daraufhin Licht einer höheren Wellenlänge mit weniger Energie zu emittieren. Durch Kopplung dieser Fluorochrome an spezifische Antikörper können Zelloberflächenantigene mit Hilfe des Prinzips der Antigen-Antikörper-Reaktion markiert und quantitativ erfasst werden. Die Zellen der zu untersuchenden Zellsuspension werden mit Überdruck und einer geeigneten Trägerflüssigkeit vereinzelt und am Laserstrahl eines 488nm Argonlasers vorbeigeleitet. Hierbei kommt es zur Anregung der Elektronen des gekoppelten Fluoreszenzfarbstoffes, die nach dem Laserpuls die zuvor absorbierte Energie in Form von Licht einer höheren Wellenlänge wieder abgeben. Neben der Anregung der Fluorochrome wird das auftreffende Licht durch die Einzelzellen gestreut. Der größte Anteil des Lichts wird in geringem Winkel vorwärts gestreut und vom forward light scatter (FSC) aufgenommen, der mit der Zellgröße korreliert. Das Maß der Zell-Granularität wird über den sideward light scatter (SSC) ermittelt, der das Seitwärtsstreulicht im 90°-Winkel aufnimmt und es im entsprechenden Verhältnis darstellt. Pro Zelle können gleichzeitig bis zu sechs Parameter erfasst werden. Diese setzen sich zusammen aus den oben beschriebenen Werten des Vorwärts- und Seitwärtsstreulichtes, die linear gemessen werden, sowie den Fluoreszenzen der vier Signalkanäle (FL), die über eine logarithmische Berechnung ermittelt werden. Jene nutzen an die Zellen gebundene Antikörper-Fluorochrom-Konjugate, die bei unterschiedlichen Wellenlängen die weitere Analyse der Zellen ermöglicht. Als Fluorochrome werden Fluoresceinisothiocyanat im ersten

Fluoreszenzkanal (FITC, FL1) und Propidium Iodid (PI, FL3) verwendet. Des Weiteren finden Phycoerythrin (PE, FL2) und Allophycocyanin (APC, FL4) Verwendung. Diese Farbstoffe sind an spezifische Antikörper gekoppelt, um den quantitativen Nachweis für das Vorliegen bestimmter Oberflächenmerkmale zu liefern. Die Proben werden mit FACS-Puffer verdünnt und im Durchflusszytometer gemessen. Vor der Messung muss die Probe auf dem Vortexer durchmischt werden. Über die Software Cell Quest Pro (Becton Dickinson) werden die B-Lymphozyten quantifiziert und können zur Auswertung in die Software Microsoft Excel (Microsoft) übertragen werden. Die statistische Analyse erfolgt mit der Software SPSS (IBM). Die Anwendung des Wilcoxon-Mann-Whitney-Tests diente der Ermittlung von signifikanten Abweichungen. Die grafische Darstellung erfolgte mit der Software KyPlot5.0 (KyensLab Incorporated).

3.6 ELISA

Die Methodik des Sandwich-ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay) zielt darauf ab, Antikörper oder Antigene in einer Probe zu erkennen und zu quantifizieren (101-102). Die Probe wird auf eine mit einem Antikörper vorbehandelte ELISA-Platte gegeben, auf der zuvor die überzähligen Bindungsstellen mit einer speziellen Lösung aus chemisch modifiziertem Casein übersättigt und folglich blockiert wurden. Dadurch können die Antigene von Interesse an den Antikörper anhaften. Anschließend wird ein spezifischer Antikörper, an den ein Enzym gekoppelt ist, über die Proben gegeben und an das Antigen gebunden. Durch zwischengeschaltete Waschschriffe mit einer milden Waschlösung werden Proteine oder nichtgebundene Antikörper von der Platte entfernt. Im letzten Schritt dieser Methode wird eine enzymatische Reaktion herbeigeführt, welche die Antikörperbindungen im Photometer quantitativ darstellt (103).

3.6.1 Proliferationsverhalten

CFSE ist dafür entwickelt worden, die Proliferation von Zellen nachzuvollziehen (78). Mit jeder Zellteilung halbiert sich die Intensität der Farbstofffluoreszenz. Bis zu acht Zellgenerationen können dadurch verfolgt werden. Nach dieser Anzahl an Zellteilungen ist die Konzentration zu gering, um nachgewiesen zu werden. Allerdings ist CFSE bei zu hohen Konzentrationen zelltoxisch, was sich bei einer Untersuchung zum Proliferationsverhalten von humanen Zellen als kontraproduktiv herausstellen könnte. Im Anschluss an das oben

beschriebene Verfahren zur Gewinnung der PBMCs folgte die Gewinnung reiner B-Lymphozyten. Nach Eluierung aus der Magnetsäule wurden die B-Lymphozyten vereinigt, gewaschen und gezählt. Anschließend wurden sie in 1600µl PBS aufgenommen und mit 400µl Carboxyfluorescein succinimidylester (CFSE) gemischt, was einer zwei mikromolare Endkonzentration CFSE entsprach. Auf Grund der kovalenten Bindung über die Succinimidyl-Gruppe zu intrazellulären Molekülen kann dieser Fluoreszenzfarbstoff für viele Zellzyklen in den Zellen verbleiben. Die Färbung wurde bei Raumtemperatur in Dunkelheit für dreieinhalb Minuten durchgeführt. Nach genau dieser Zeitspanne wurde die Reaktion mit 5ml Medium gestoppt und die Zellen gewaschen. Im Anschluss an die Zugabe von 5ml PBS wurden die Zellen gezählt und erneut gewaschen. $1,5 \times 10^5$ B-Lymphozyten wurden jeweils in ein well der Rundbodenplatte überführt und die bekannten Stimulantien hinzugefügt. Im Anschluss daran wurden die bekannten Immunsuppressivkonzentrationen auf die stimulierten Zellen gegeben. Sotrastaurin, MPA und Everolimus sowie deren Kombinationen wirkten für sechs Tage auf die B-Lymphozytenkulturen. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurden zuerst aus jedem well Überstände entnommen und in Eppendorf-Reaktionsgefäße überführt. Sie wurden bei -80°C eingefroren, um für eine spätere Analyse der Immunglobulinproduktion der B-Lymphozyten verwendet zu werden.

Anschließend wurden die Zellen in FACS-Röhrchen geerntet, indem sie mit mehrmaligen PBS-Verdünnungen aus den wells abpipettiert wurden. Nach stichpunktartiger Kontrolle des vollständigen Erntens unter dem Mikroskop erfolgte ein weiterer Waschschrift. Zur Vorbereitung der Durchflusszytometrie wurden die Proben mit dem Antikörper-gekoppelten Farbstoff a-CD19-PE vermischt und für zwanzig Minuten in den Kühlschrank gestellt. Die anschließende Messung sollte a-CD19 markierte B-Lymphozyten zeigen, die je nach Zugehörigkeit zu einer Zellgeneration stärker oder schwächer mit dem CFSE gekennzeichnet waren. CFSE wurde im ersten FL und a-CD19-PE im zweiten FL aufgetragen. Es wurden Gates über die Zellpopulationen gelegt und die Software Cell Quest Pro ermittelte die Zahlenwerte der zu unterscheidenden Phasen.

3.6.2 Oberflächenmarker CD80

Je well wurden $1,5 \times 10^5$ B-Lymphozyten in die 96 well Flachbodenplatten überführt. Zur Messung der Oberflächenmarkerexpression wurden die Zellen unter den oben beschriebenen Bedingungen im Brutschrank für die Dauer von 72 Stunden unter optimalen Voraussetzungen

inkubiert (78). Nach Ablauf der Inkubationszeit wurden die Zellen in FACS-Röhrchen geerntet, indem sie zweimal mit PBS gespült wurden. Nach Zugabe von 2ml PBS erfolgte ein weiterer Waschschrift. Zur Vorbereitung der Durchflusszytometrie wurde ein Antikörpermix in FACS-Puffer auf die Zellen gegeben. Dieser beinhaltete a-CD80-FITC und a-CD19-APC. CD19 ist ein Oberflächenmerkmal, das bereits in einer sehr frühen Phase der B-Zell-Entwicklung auf den B-Lymphozyten exprimiert wird. Nach 20 Minuten Inkubationszeit im Kühlschrank wurde in jedes der 21 FACS-Röhrchen ein Milliliter PBS gegeben und wiederum gewaschen. Abschließend wurden noch einmal 250µl FACS-Puffer hinzugegeben. Das Oberflächenmerkmal CD80 wurde mit Hilfe der Fluoreszenz-gekoppelten Antikörper über die Durchflusszytometrie quantifiziert. Durch die Zugabe von a-CD19-APC wurden nur die gesuchten B-Lymphozyten herausgefiltert und im FACS dargestellt. Bis zu 80000 markierte Zellen wurden je Probe gemessen.

3.6.3 Immunglobuline G und M

Die für diese Messung nötigen Proben erhielten wir aus den Überständen der B-Zell-Kulturen der Proliferationsansätze, die für sechs Tage im Inkubationsschrank kultiviert worden waren. Vor der Zellernte wurden Überstände aus Zellkulturen entnommen und bei -80°C eingefroren.

In unserem Versuch der ELISA Sandwichtechnik wurde ein Carbonat-Bicarbonat Puffer mit dem pH-Wert 9,6 zur Beschichtung verwendet (101-102). Dieser enthielt eine berechnete Konzentration an Antikörpern, die die IgG bzw. IgM-Antigene der Proben abfangen und fixieren sollten. Nachdem die Platte mit einer Waschlösung von Überschüssen befreit wurde, wurde in jedes well 200µl einer Blockierungslösung aufgetragen und für 30 Minuten inkubiert. Bei der ablaufenden Reaktion besetzten die Inhaltsstoffe die freien Bindungsstellen der Platte, um eine Verfälschung des Ergebnisses zu verhindern. Anschließend wurde die Platte dreimal gewaschen und so für die Auftragung mit den Proben vorbereitet. 100µl jeder 1:10 verdünnten Probe wurde in die vorbehandelten wells transferiert und hatten 60 Minuten Zeit, an die Antikörper zu binden. Nach fünfmaligem Waschen mit der entsprechenden Waschlösung wurde je well 100µl einer Antikörper-Lösung hinzugegeben. Diese Antikörper waren an das Enzym Meerrettichperoxidase (horseradish peroxidase, HRP) gekoppelt. Nach 60 Minuten Inkubation und fünfmaligem Waschen wurde der finale Arbeitsschritt, die enzymatische Reaktion, eingeleitet. Dazu wurden 100µl der Enzym-Substrat-Lösung auf die Proben pipettiert. Die Lösung beinhaltete Tetramethylbenzidin, welches mit der Peroxidase

ein blaues Endprodukt bildet. Nach circa zehn Minuten wurde die Reaktion durch die Zugabe von 100µl zwei-molarer 98%iger Schwefelsäure gestoppt. Die Reaktion war durch den deutlichen Farbumschlag in einen stabilen gelben Farbkomplex gut zu kontrollieren. Bei einer Wellenlänge von 450nm wurde die Farbintensität der Proben in den wells im ELISA-Reader gemessen. Die unterschiedlichen Absorptionswerte gaben Aufschluss über den Gehalt von Immunglobulinen.

3.6.4 Apoptose

Es wurde eine Zahl von $1,5 \times 10^5$ B-Lymphozyten in jedes well überführt. Die zu untersuchenden Immunsuppressiva wirkten für einen Zeitraum von drei Tagen auf die B-Lymphozyten in der 96 well Flachbodenplatte.

Die Apoptose ist ein normaler physiologischer Prozess, der sowohl in der Entwicklung als auch im Gewebeumbau stattfindet. Der Ablauf ist durch bestimmte morphologische Eigenschaften der Zellen gekennzeichnet (104). Dazu gehören sowohl der Verlust von Plasmamembran als auch Zellanheftung, die Kondensation des Zytoplasmas und des Zellkerns, sowie die internukleosomale Spaltung der DNA. Der Verlust der Plasmamembran ist eines der ersten Merkmale. In apoptotischen Zellen kehrt sich das Membranphospholipid Phosphatidylserin (PS) von innen nach außen und wird dadurch der extrazellulären Umgebung präsentiert (105-106). Das Annexin V ist ein Calcium-abhängiges Phospholipid-bindendes Protein, das eine hohe Affinität zu PS aufweist und daher an PS-exprimierende Zellen bindet (105, 107). Annexin V kann mit Fluorochromen, wie FITC, gekoppelt werden. Durch diese Kombination können Zellen, die sich im Apoptosestadium befinden, mit hoher Sensitivität gefunden und über die Durchflusszytometrie quantifiziert werden. Annexin V-FITC kann die frühe Phase der Apoptose durch das nach außen gekehrte PS besser und schneller anzeigen als Untersuchungen, die auf Kernveränderungen, wie beispielsweise der DNA-Teilung, basieren. Die Annexin V-FITC Färbung geht mit dem Verlust der Membranintegrität einher, welche die spät-apoptotische Phase einleitet. Ursache kann entweder ein apoptotischer oder durch Trauma ausgelöster nekrotischer Prozess sein. Deshalb wird die Annexin V-FITC Färbung immer in Kombination mit einem vital-Marker Farbstoff, wie z.B. Propidium Iodid (PI), durchgeführt, welches die Abgrenzung früh-apoptotischer Zellen erlaubt. Die Angaben über den Färbezustand der Proben geben Aufschluss über die Stadien der Apoptose, in der sich die Zellen befinden (Tab.1).

Stadium	Annexin V-FITC	Propidium Iodid
Vital	negativ	negativ
Früh-apoptotisch	positiv	negativ
Spät-apoptotisch	positiv	positiv
Tot	negativ	positiv

Tab.1 Zuordnung des Vitalitäts- bzw. Apoptosestadiums humaner B-Lymphozyten auf Grund positiver bzw. negativer Färbeergebnisse durch Annexin V-FITC und Propidium Iodid

Nach der Zellernte und den anschließenden Waschschritten wurden den Proben Annexin V-FITC und PI hinzugefügt. Der hierfür benötigte Mastermix enthielt 100µl binding buffer, 5µl Annexin V-FITC sowie 5µl PI. Nach vorsichtigem Durchmischen wurden die Proben bei Raumtemperatur für 15 Minuten inkubiert. Vor der durchflusszytometrischen Messung wurden erneut jeder Probe 200µl binding buffer hinzugefügt.

Es wurden bis zu 80000 Zellen je Probe gemessen und mit der Cell Quest Pro Software (Becton Dickinson) ausgewertet. Für die Auswertung wurden zweidimensionale Punktbilder (Dot Plots) erstellt, bei der auf der X-Achse das Signal eines Fluoreszenzkanals gegenüber dem Signal eines anderen Kanals auf der Y-Achse aufgetragen wurde und jeder dargestellte Punkt einer gemessenen Zelle entsprach. Mit der Auswertungssoftware Cell Quest Pro (Becton Dickinson) konnte eine differenzierte Auswertung separater Zellpopulationen erfolgen. Hierfür konnten durch das Auftragen der Größen FSC gegen SSC im Diagramm einzelne Leukozytenpopulationen unterschieden werden, aus denen durch Anlegen definierter Gates die B-Zell-Population herausgestellt werden konnte. Zur Auftragung der mit Annexin-V-FITC und PI gefärbten B-Lymphozyten wurden FL 1 und FL 3 verwendet.

3.7 Materialien

Reagenzien

autoMACS Running Buffer	Miltonyi Biotec, Bergisch Gladbach, Deutschland
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Serva, Heidelberg, Deutschland
Ethanol	J.T. Baker, Phillipsburg, USA
Fetales Kälberserum (FCS)	Biochrom AG, Berlin, Deutschland
Leucosep	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, Deutschland
L-Glutamin	Biochrom AG, Berlin, Deutschland
Nuclease-freies Wasser	Ambion, Austin, USA
Penicillin	Biochrom AG, Berlin, Deutschland
Phosphatgepufferte Kochsalzlösung ohne Calcium/ Magnesium (PBS)	PAA Laboratories GmbH, Pasching, Österreich
Streptomycin	Biochrom AG, Berlin, Deutschland
VLE RPMI 1640 Medium	Biochrom AG, Berlin, Deutschland

Farbstoffe

Carboxyfluorescein succinimidylester (CFSE)	Invitrogen, Darmstadt, Deutschland
---	------------------------------------

Stimulantien

Monoclonal Anti-human CD40/ TNFRSF5 Antibody	R&D Systems, Minneapolis, USA
ODN 2006 Type B CpG oligonucleotide – Human TLR9 ligand	InvivoGen, San Diego, USA
Recombinant Human IL-4	PeproTech, Rocky Hill, USA

Immunsuppressive Substanzen

Everolimus	Sigma, Saint Louis, USA
Mycophenolsäure	Sigma, Saint Louis, USA
Sotrastaurin	Novartis, Pharma GmbH, Nürnberg, Deutschland

Puffer und Medien

FACS-Puffer	2 % FCS; 0,1%(w/v) NaN ₃ in PBS
RPMI-Medium	500ml RPMI, 50ml FCS, 5ml Glu, 5ml PEST

Kommerzielle Versuchssysteme (Kits)

Annexin V-FITC Apoptosis Detection Kit I	Becton, Dickinson and Company, Heidelberg, Deutschland
ELISA Starter Accessory Package	Bethyl Laboratories INC
Human IgG ELISA Quantitation Kit	Bethyl Laboratories INC
Human IgM ELISA Quantitation Kit	Bethyl Laboratories INC

Antikörper gekoppelte Farbstoffe

Anti-human CD19 APC	Becton, Dickinson and Company, Heidelberg, Deutschland
Anti-human CD19 Mouse PE	Becton, Dickinson and Company, Heidelberg, Deutschland
Anti-human CD25 Mouse PE	Becton, Dickinson and Company, Heidelberg, Deutschland
Anti-human CD80 FITC	Becton, Dickinson and Company, Heidelberg, Deutschland

Geräte/ Software

Autoklav	Gössner, Hamburg, Deutschland
Brutschrank CellHouse 200	Heto RS Biotech, Irvine, UK
Cell Quest Pro	Becton, Dickinson and Company, Heidelberg, Deutschland
Elektrische Pipettierhilfe Accu-Jet	Sigma-Aldrich, Hamburg, Deutschland
EndNote X4	Thomson Reuters, Carlsbad, USA
FACS-Calibur mit 488nm Argonlaser	Becton, Dickinson and Company, Heidelberg, Deutschland
Gefrierschränke	Bosch, Stuttgart, Deutschland
Kühlschränke	Liebherr, Ochsenhausen, Deutschland
KyPlot 5.0	KyensLab Incorporated, Tokyo, Japan
Lichtmikroskop DMIL	Leica Mikrosysteme Vertrieb GmbH, Wetzlar, Deutschland
Microsoft Excel	Microsoft, Redmond, USA
Neubauer improved Zählkammer	Carl Roth AG, Arlesheim, Schweiz
Pipette Reference	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Quadro MACS, MACS Columns und Micro Beads	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Deutschland
Reinraumarbeitsbank Laminair 2000	Heraeus Instruments, Hanau, Deutschland
SPSS Statistics	IBM Deutschland GmbH, Ehningen, Deutschland
Vakuum-Sicherheits-Absaugsystem SUE 30	Heto RS Biotech, Irvine, UK
Vakuum-Zentrifuge Concentrator 5301	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Vortexmischer	Scientific Industries, Inc., New York, USA
Zentrifuge, Multifuge 2.0 3 S-R	Heraeus Instruments, Hanau, Deutschland

Verbrauchsmaterial

96-well Flachbodenplatten	Becton, Dickinson and Company, Heidelberg, Deutschland
96-well Rundbodenplatten	Becton, Dickinson and Company, Heidelberg, Deutschland
BD Vacutainer	Becton, Dickinson and Company, Heidelberg, Deutschland
BD Valu-Set	Becton, Dickinson and Company, Heidelberg, Deutschland
Combitip	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Einwegpipetten (5ml, 10ml, 25ml)	Greiner, Nürtingen, Deutschland
Eppendorf-Reaktionsgefäße (0.5ml, 1,5ml, 2ml)	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Falcon Conical Tubes 15ml	Becton, Dickinson and Company, Heidelberg, Deutschland
Falcon Conical Tubes 50ml	Becton, Dickinson and Company, Heidelberg, Deutschland
Pasteurpipetten	Roth, Karlsruhe, Deutschland

4. Ergebnisse

Die folgenden Ausführungen zeigen die Ergebnisse der Untersuchungen zum Einfluss der immunsuppressiven Substanzen Sotrastaurin, MPA und Everolimus auf die Funktionen stimulierter humaner B-Lymphozyten. In den gesamten *in vitro* durchgeführten Versuchen wurden die B-Lymphozyten mit α -CD40, IL-4 und ODN2006-CPG stimuliert. Die in den Abbildungen dargestellten Analysen resultieren aus sechs unabhängigen Experimenten, welche mit Probenmaterial von sechs verschiedenen gesunden Blutspendern durchgeführt wurden (n=6). Um zusätzlich mögliche Wechselwirkungen oder additive Effekte der Immunsuppressiva und die resultierende Wirkung auf die Zellprozesse zu untersuchen, wurden Sotrastaurin, MPA und Everolimus kombiniert. Die Kombination aus zwei Substanzen wurde einer einzelnen in der Kombination enthaltenen Substanz gegenübergestellt. Die Wirkung der Verknüpfung aller drei Immunsuppressiva wurde gegen jede einzelne Substanz und gegen die Zweier-Kombinationen aufgetragen. Um eine Aussage über die reine Wirksamkeit der Immunsuppressivakombination zu erhalten, wurden statistische Unterschiede zum Mittelwert der Kontrollen gesucht. Für die Untersuchungen der Kombinationen wurden stets 500nM Sotrastaurin, 1ng/ml Everolimus und 100ng/ml MPA verwendet, um potentielle additive Effekte als solche erkennen zu können.

4.1 Beeinflussung des Zellteilungsverhaltens von B-Lymphozyten durch immunsuppressive Substanzen

Der Einfluss der zu untersuchenden Immunsuppressiva auf die Proliferation der humanen B-Lymphozyten wurde nach sechs Tagen Stimulation mit Hilfe der Durchflusszytometrie untersucht. Die Quantifizierung der proliferierten B-Lymphozyten im FACS erfolgte nach Färbung mit CFSE und α -CD19-PE (Abb. 2 A-D).

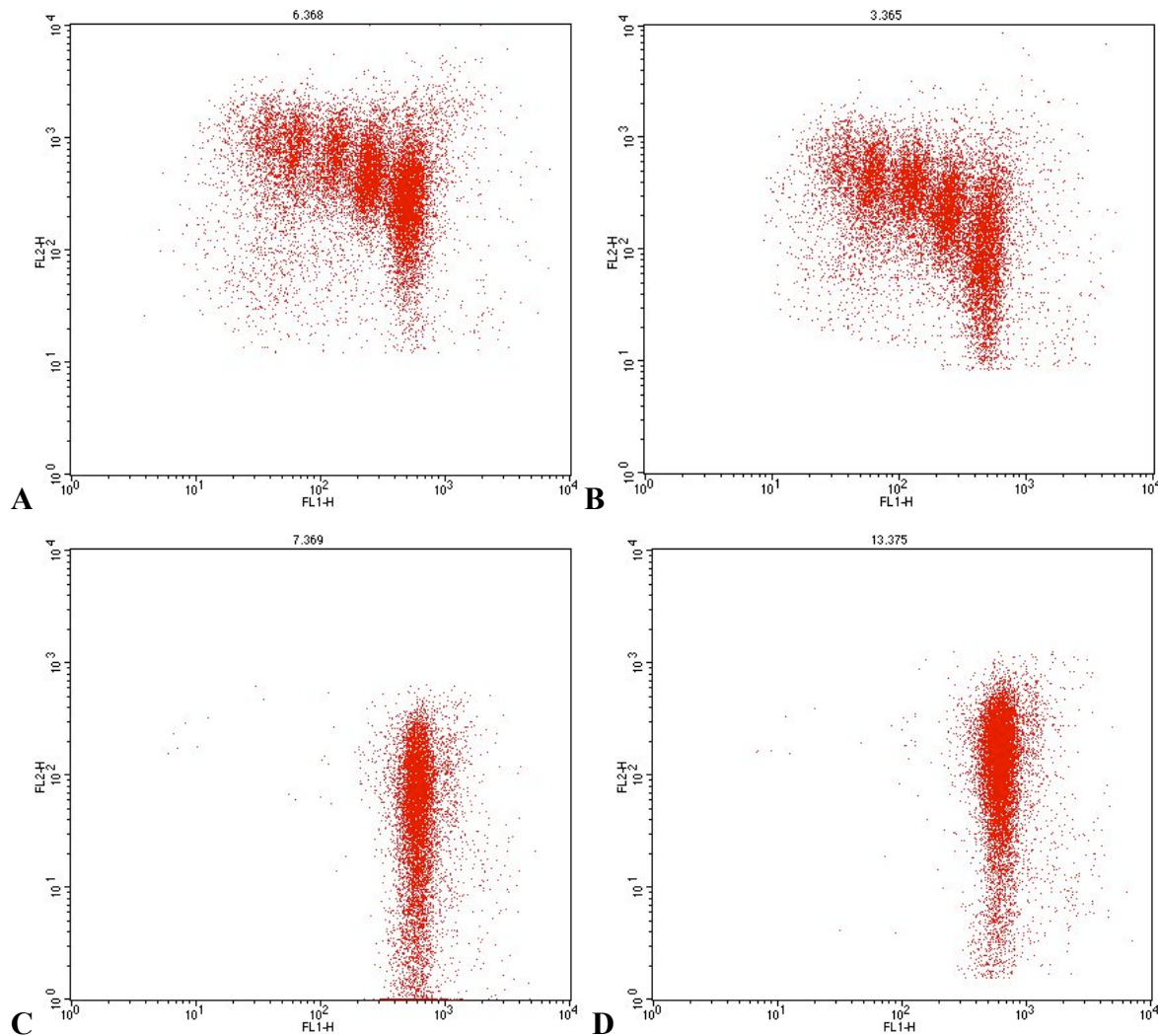


Abb. 2 Darstellung der Proliferation humaner B-Lymphozyten unter dem Einfluss der Lösemittelkontrolle und immunsuppressiver Substanzen in der FACS-Analyse nach Färbung mit CFSE (FL1) und α -CD19-PE (FL2). Die Wirkung der Kontrolllösung (A), sowie den höchsten verwendeten Konzentration Sotrastaurin (B), MPA (C) und Everolimus (D) werden gezeigt. Im rechten Bildabschnitt liegen die B-Lymphozyten der Ausgangspopulation. Im mittleren und linken Anteil des FACS-Bildes sieht man die Tochterpopulationen der proliferierten B-Lymphozyten. Die Daten eines repräsentativen Probanden werden gezeigt.

Die Auswertung der Daten aller Versuchsreihen ergab, dass mit 5nM Sotrastaurin behandelte B-Lymphozyten ein vergleichbares proliferatives Verhalten zeigten wie in der Kontrolllösung kultivierte Zellen. B-Lymphozyten, welche mit 50nM und 500nM Sotrastaurin behandelt wurden, wiesen eine signifikant gesteigerte Proliferation verglichen mit der Lösemittelkontrolle auf (Abb. 3 A). Die Untersuchung zeigte weiterhin, dass MPA und Everolimus im Vergleich zur Kontrolle eine signifikant hemmende Wirkung auf die Proliferation der B-Lymphozyten hatten. Dies galt für MPA ab 100ng/ml und für alle analysierten Everolimus-Konzentrationen (Abb. 3 B+C). Die Effekte auf die B-Zell-Proliferation waren dosisabhängig.

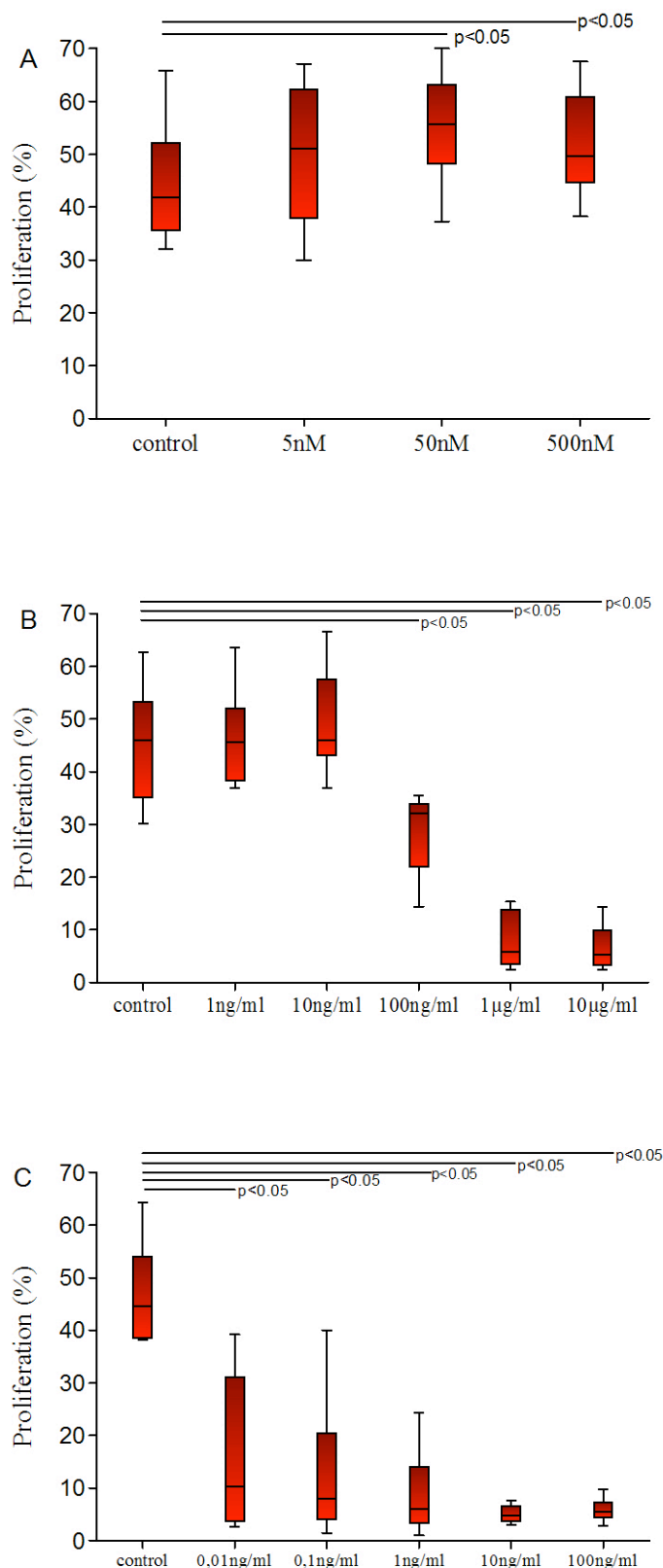
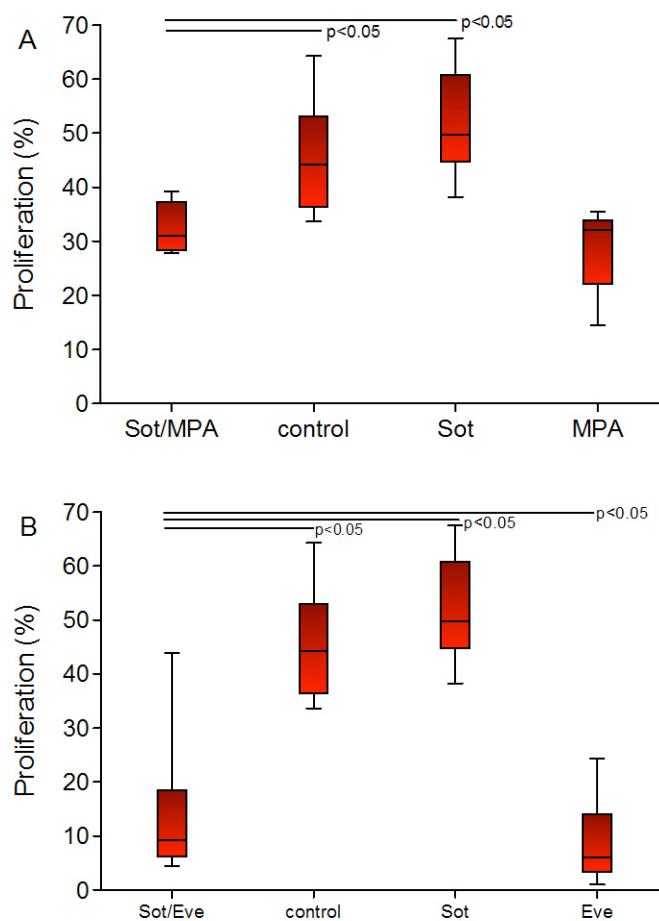


Abb. 3 Auswirkungen von immunsuppressiven Substanzen auf das Proliferationsverhalten humaner B-Lymphozyten. Nach CFSE-Färbung, 6d Stimulation und Behandlung erfolgte die FACS-Analyse. B-Lymphozyten unter Sotrastaurin-Einfluss (A) zeigen ab der mittleren Konzentration eine signifikant gesteigerte Proliferationsrate im Vergleich zur Lösemittelkontrolle. In der MPA-Versuchsreihe (B) ist ein signifikant hemmender Einfluss auf die Teilungsrate ab einer mittleren Konzentration zu verzeichnen verglichen mit der Kontrolllösung. Jede Konzentration von Everolimus (C) sorgt für eine signifikante Proliferationshemmung entgegen der Kontrolle.

Die Konzentrationen MPA und Everolimus, welche in den Kombinationsexperimenten verwendet wurden, zeigten in der isolierten B-Lymphozyten-Behandlung eine signifikant hemmende Wirkung auf die Zellteilung (Abb. 3 B+C). Eine Dosis von 500nM Sotrastaurin hingegen führte zu einer signifikant erhöhten B-Zell-Proliferationsrate im Vergleich zur Wirkung der Lösemittelkontrolle (Abb. 3 A).

Alle Zweier-Kombinationen und auch die Dreier-Kombination der Immunsuppressiva riefen im Vergleich zur Lösemittelkontrolle eine signifikant verringerte Proliferation der B-Lymphozyten hervor. Zum Teil erzielten die Zweier-Kombinationen gegenüber der isolierten Administration signifikante Unterschiede. So wurde das Proliferationsverhalten der B-Lymphozyten abhängig von Behandlung gesteigert, gehemmt oder blieb gleich (Abb.4 A-C). Die Dreier-Kombination hemmte zum großen Teil die Proliferation der B-Lymphozyten gegenüber den Einzel-Administrationen sowie den Zweier-Kombinationen (Abb. 5).



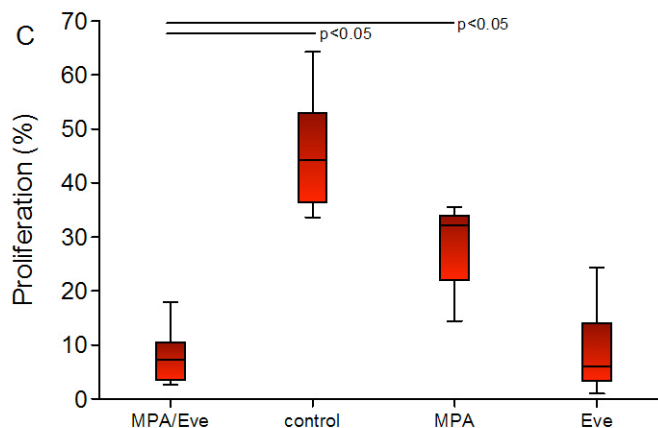


Abb. 4 Auswirkungen von zwei kombinierten immunsuppressiven Substanzen auf das Proliferationsverhalten humaner B-Lymphozyten. Nach CFSE-Färbung, 6d Stimulation und Behandlung erfolgte die FACS-Analyse. B-Lymphozyten unter Einfluss der Zweier-Kombinationen werden gegenüber der Lösemittelkontrolle signifikant gehemmt. Entgegen den einzelnen enthaltenen Substanzen ist dies nicht immer der Fall (A-C).

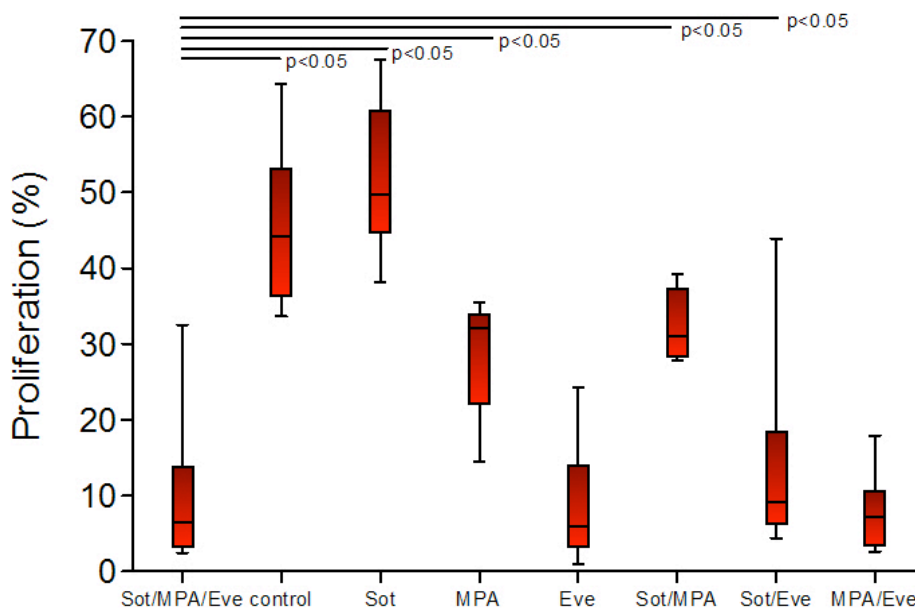
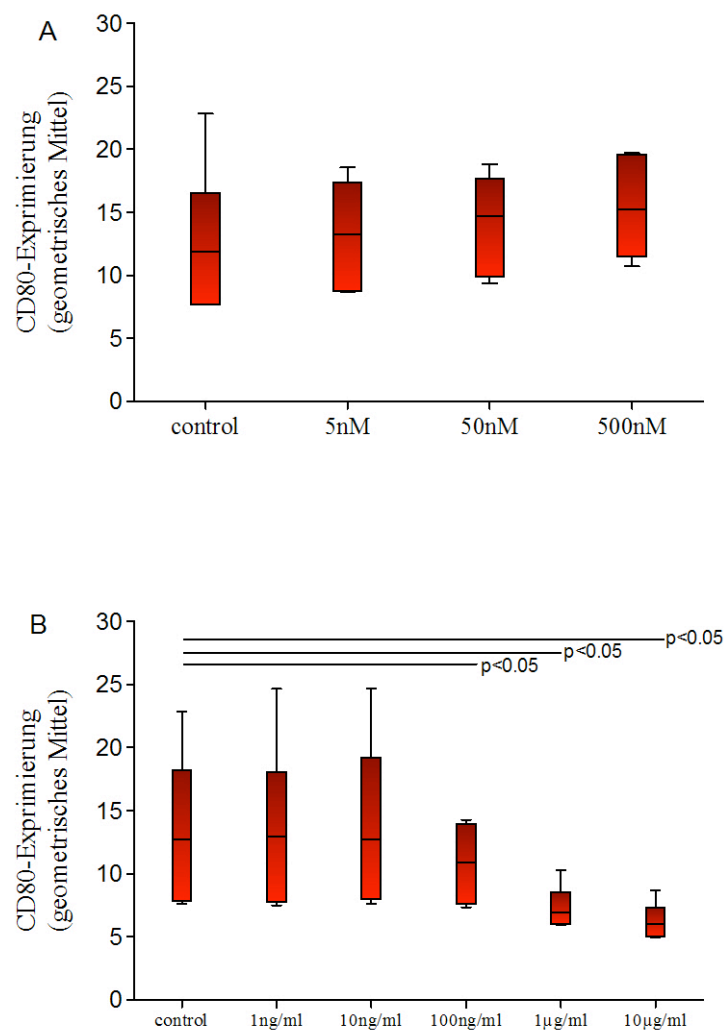


Abb. 5 Auswirkungen von drei kombinierten immunsuppressiven Substanzen auf das Proliferationsverhalten humaner B-Lymphozyten. Nach CFSE-Färbung, 6d Stimulation und Behandlung erfolgte die FACS-Analyse. Die hemmende Wirkung der Dreier-Kombination auf die B-Lymphozyten ist signifikant gegenüber den meisten zu vergleichenden Administrationen.

4.2 Einfluss von immunsuppressiven Substanzen auf die CD80-Exprimierung humaner B-Lymphozyten

Stimulierte humane B-Lymphozyten wurden nach drei Tagen Inkubation geerntet, mit a-CD80-FITC und a-CD19-APC gefärbt und mittels Durchflusszytometrie analysiert.

Die untersuchten Konzentrationen Sotrastaurin hemmten die Exprimierung des Oberflächenmarkers gegenüber den Effekten der Lösemittelkontrolle nicht (Abb. 6 A). MPA minderte die CD80-Exprimierung ab einer Konzentration von 100ng/ml im Vergleich mit der Lösemittelkontrolle signifikant (Abb. 6 B). Alle analysierten Everolimus-Konzentrationen riefen eine signifikante Hemmung verglichen mit der Behandlung in der Kontrolllösung hervor (Abb. 6 C). Die Auswirkungen auf die CD80-Exprimierung von MPA und Everolimus waren dosisabhängig.



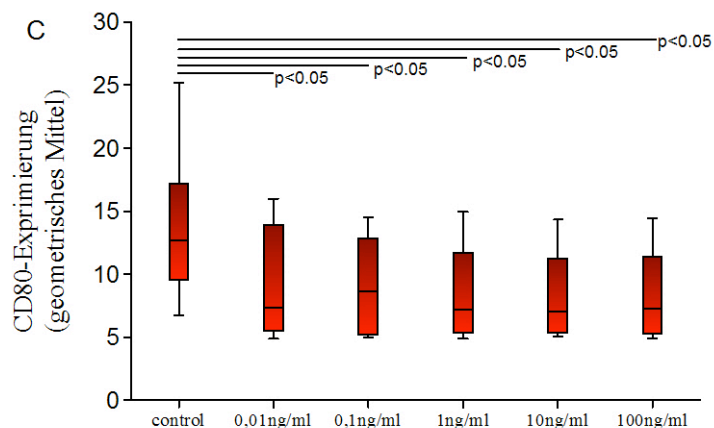


Abb. 6 Einfluss von immunsuppressiven Substanzen auf die CD80-Expression humaner B-Lymphozyten. Nach 72h Stimulation und Behandlung, Färbung mit α -CD80-FITC und α -CD19-APC erfolgte die Analyse im FACS. Sotrastaurin (A) erzeugt keine signifikante Hemmung der Oberflächenmerkmal-Expression gegenüber der Kontrolle. MPA (B) bewirkt ab einer hohen Konzentration und Everolimus (C) in allen gemessenen Konzentrationen eine signifikant verminderte Expression von CD80 verglichen mit der Lösemittelkontrolle.

Im Gegensatz zu Sotrastaurin verursachten MPA und Everolimus in den für die Kombinationsversuche verwendeten Konzentrationen eine signifikante Hemmung der CD80-Expression auf den B-Lymphozyten in Bezug auf die Lösemittelkontrolle (Abb. 6 A-C).

Die Kombinationen Sotrastaurin/ MPA und Sotrastaurin/ Everolimus führten gegenüber der Lösemittelkontrolle zu keiner signifikanten Hemmung der CD80-Expression (Abb. 7 A+B). Hingegen hemmte die Kombination MPA/ Everolimus und auch die Dreier-Kombination verglichen mit der Kontrolllösung das Oberflächenmolekül CD80 signifikant (Abb. 7 C, Abb. 8). Zum Teil bewirkten die Zweier-Kombinationen eine signifikante Hemmung der CD80-Expression entgegen den Einzel-Administrationen. Dabei zeigten sich signifikant erhöhte, im Fall von Sotrastaurin/ Everolimus gegenüber Everolimus jedoch auch verringerte Werte. Abhängig von der Behandlung änderte sich die Expression der Oberflächenmoleküle teilweise nicht signifikant (Abb. 7 A-C). Ein ähnliches Verhalten wie die Dreier-Kombination gegenüber den Einzel-Administrationen und den Zweier-Kombinationen auf (Abb. 8).

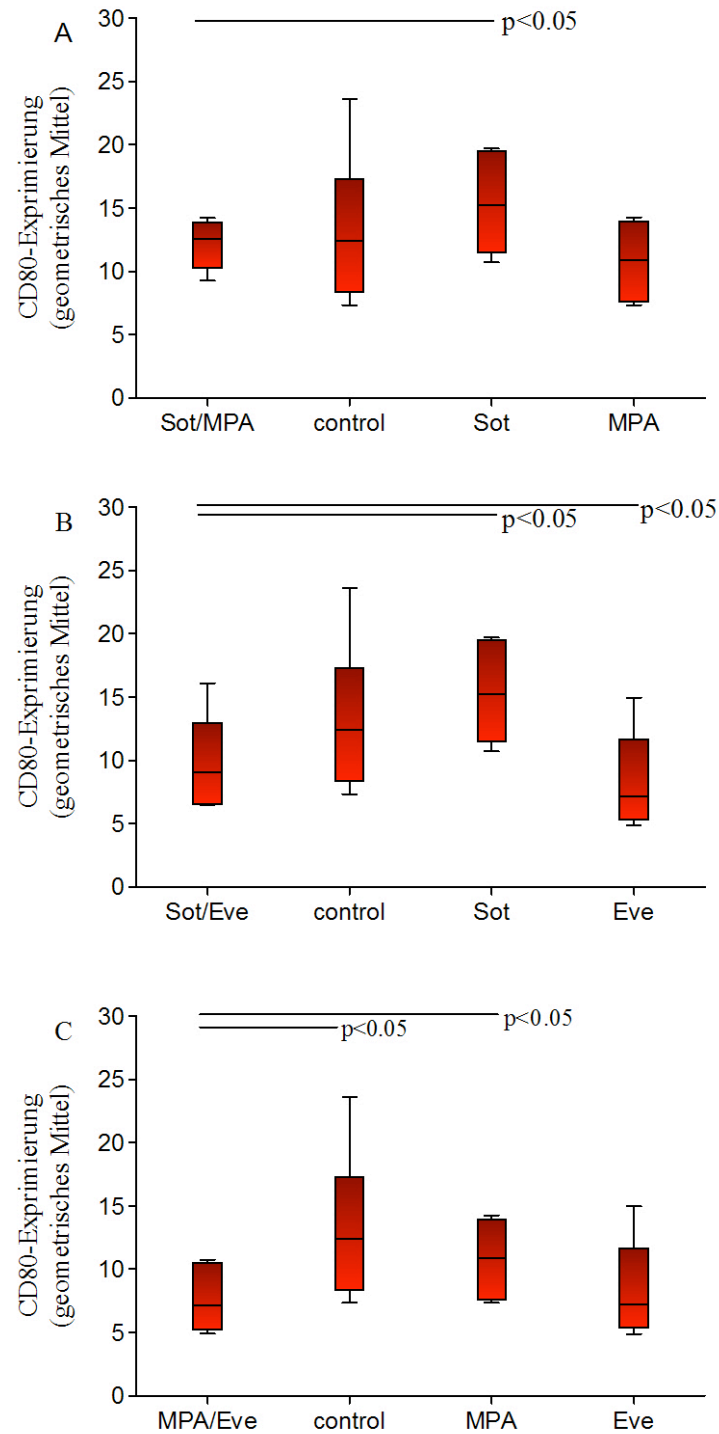


Abb. 7 Einfluss von zwei kombinierten immunsuppressiven Substanzen auf die CD80-Exprimierung humaner B-Lymphozyten. Nach 72h Stimulation und Behandlung, Färbung mit α -CD80-FITC und α -CD19-APC erfolgte die Analyse im FACS. Die Wirkung der Kombination MPA/Everolimus ist gegenüber der Lösemittelkontrolle signifikant. Entgegen der einzelnen enthaltenden Substanzen wirken die Zweier-Kombinationen größtenteils signifikant hemmend (A-C).

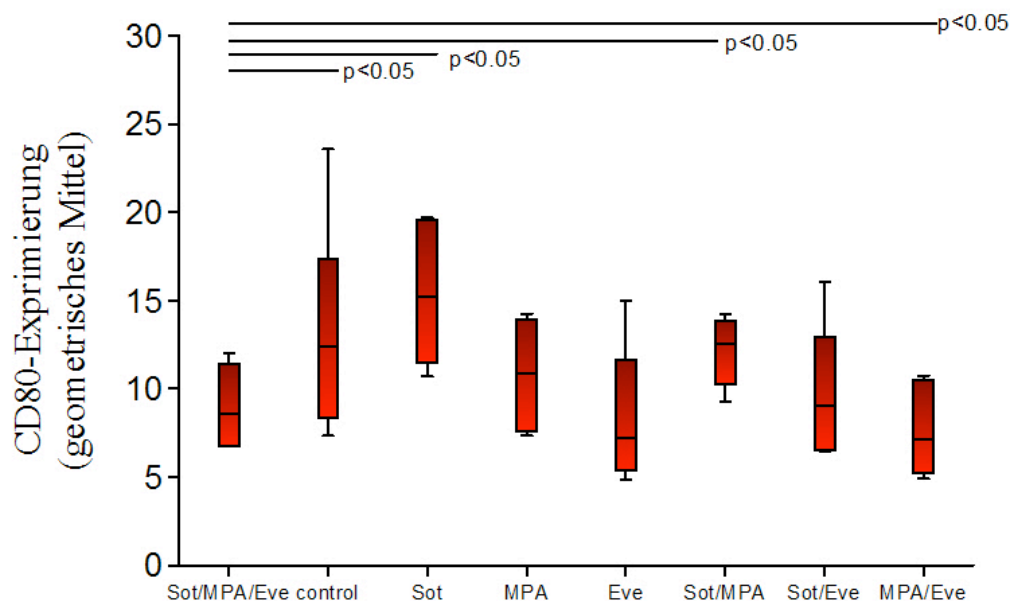


Abb. 8 Einfluss von drei kombinierten immunsuppressiven Substanzen auf die CD80-Expression humaner B-Lymphozyten. Nach 72h Stimulation und Behandlung, Färbung mit α -CD80-FITC und α -CD19-APC erfolgte die Analyse im FACS. Die Wirkung aller drei Substanzen zusammen ist gegenüber der Lösemittelkontrolle signifikant. Die Dreier-Kombination beeinflusst die Expression des Oberflächenmoleküls gegenüber den Einzel-Administrationen sowie den Zweier-Kombinationen nur selten signifikant.

4.3 Auswirkungen von immunsuppressiven Substanzen auf die Produktion von IgG und IgM durch humane B-Lymphozyten

Im Rahmen der Studie wurde der Einfluss der immunsuppressiven Substanzen Sotrastaurin, MPA und Everolimus auf die Produktion der Immunglobuline G und M analysiert. Aus Kulturen stimulierter und behandelter humaner B-Lymphozyten wurden nach sechs Tagen Überstände entnommen und im ELISA quantifiziert.

4.3.1 Einfluss auf die IgG-Produktion

Die B-Lymphozyten wurden, im Vergleich zur Wirkung der Lösemittelkontrolle, durch keine der untersuchten Konzentrationen Sotrastaurin an der Produktion von IgG gehemmt (Abb. 9 A). MPA hemmte ab einer Dosis von $1\mu\text{g/ml}$ und Everolimus ab $0,1\text{ng/ml}$ die IgG-Produktion signifikant entgegen der Kontrolle (Abb. 9 B+C). Der Einfluss von MPA und Everolimus auf die Immunglobulinproduktion war dosisabhängig.

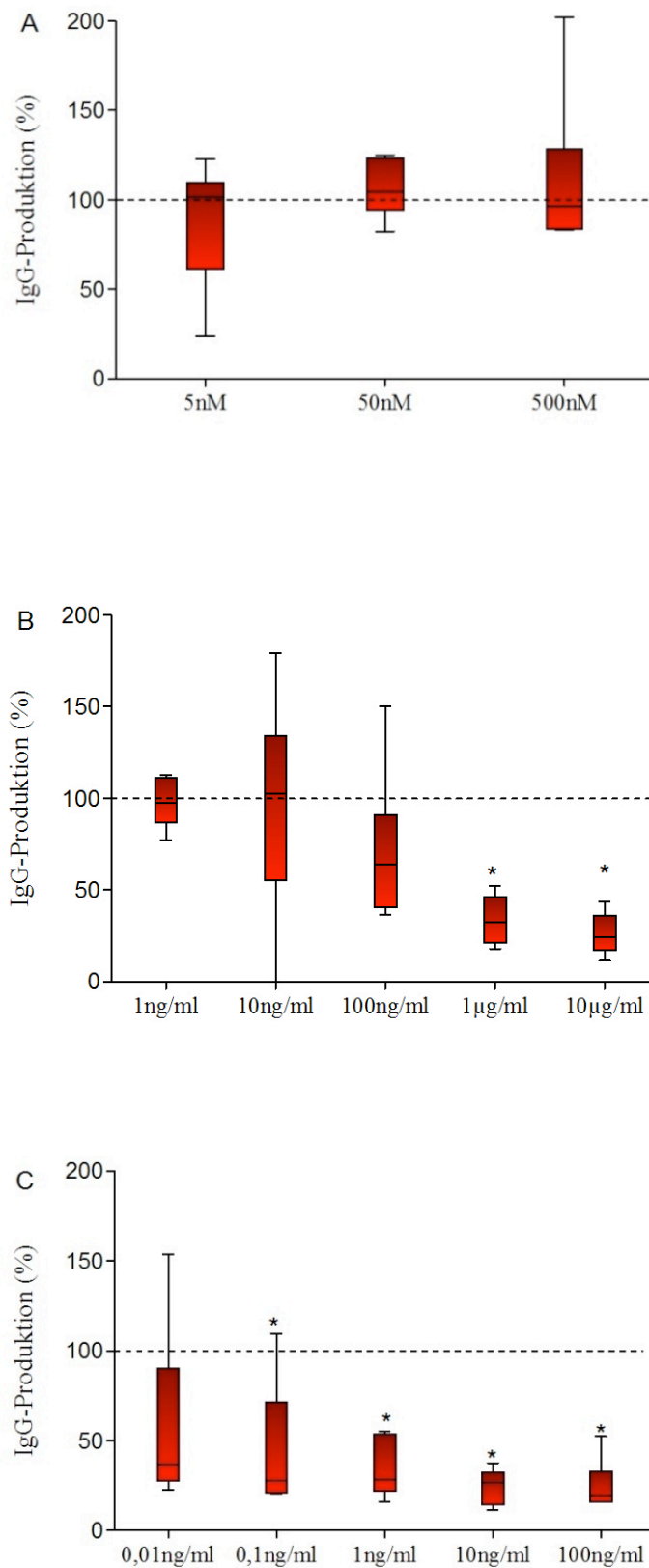
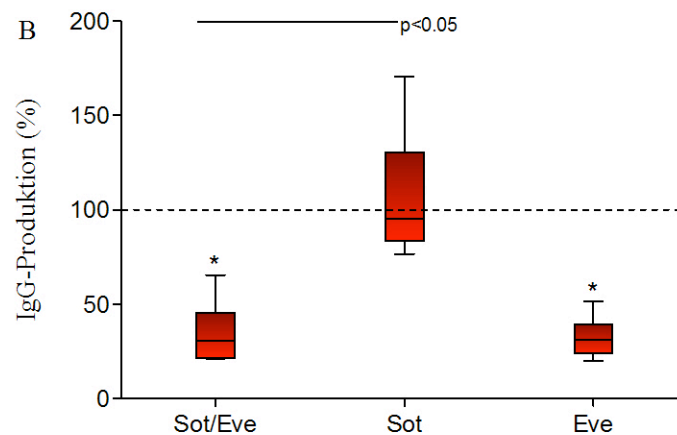
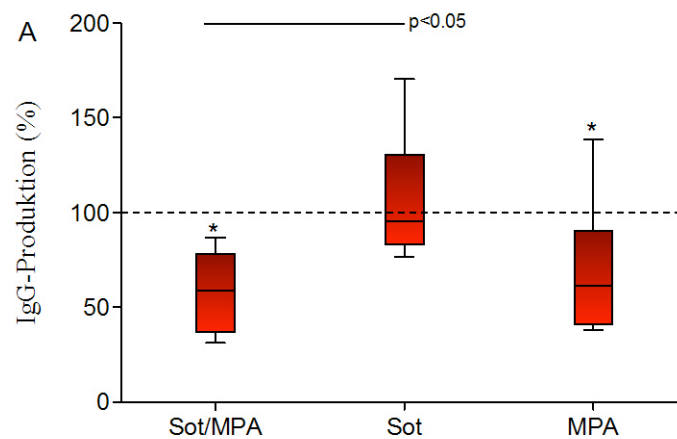


Abb. 9 Auswirkungen von immunsuppressiven Substanzen auf die IgG-Produktion humaner B-Lymphozyten. Die Auftragung erfolgt gegen die Kontrolle, dargestellt als 100%-Linie. Im Bezug auf die Lösemittelkontrolle zeigt Sotrastaurin (A) keine signifikante Hemmung der Produktion von IgG. MPA (B) und Everolimus (C) hemmen ab einer hohen bzw. mittleren Dosis die IgG-Produktion signifikant.

Die in den Kombinationen verwendeten Konzentrationen von MPA und Everolimus sorgten in der Einzelbehandlung der Proben im Gegensatz zu 500nM Sotrastaurin für eine signifikante Hemmung der IgG-Produktion im Vergleich zur Lösemittelkontrolle (Abb. 9 A-C).

Alle untersuchten Kombinationen der drei Immunsuppressiva bewirkten in Bezug auf die Lösemittelkontrolle eine signifikante Hemmung der Produktion von IgG. Die Zweier-Kombinationen bewirkten zum Teil eine signifikante Hemmung der IgG-Produktion. So wurden abhängig von der Administration die B-Lymphozyten an der Produktion des Immunglobulins signifikant gehemmt bzw. die Aktivität blieb unverändert (Abb. 10 A-C). Die Dreier-Kombination verursachte gegenüber den Einzel-Administrationen und den Zweier-Kombinationen zum großen Teil signifikante Unterschiede (Abb. 11).



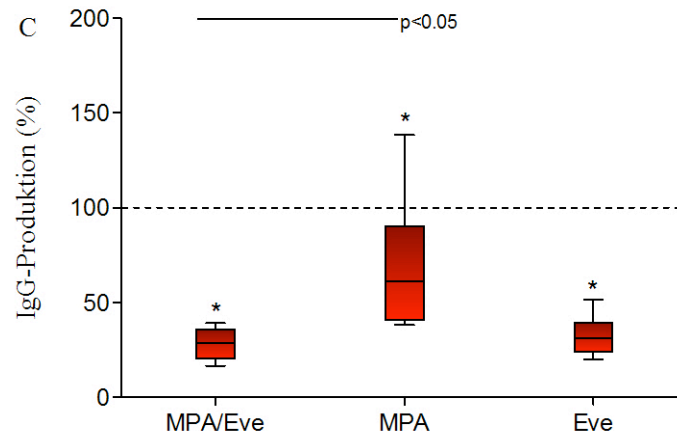


Abb. 10 Auswirkungen von zwei kombinierten immunsuppressiven Substanzen auf die IgG-Produktion humaner B-Lymphozyten. Die Auftragung erfolgt gegen die Kontrolle, dargestellt als 100%-Linie. Ein signifikanter Unterschied im Bezug auf die Lösemittelkontrolle ist mit einem * gekennzeichnet. Die Wirkung der Zweier-Kombinationen hemmt nur vereinzelt die Produktion von IgG gegenüber den einzelnen enthaltenen Substanzen signifikant.

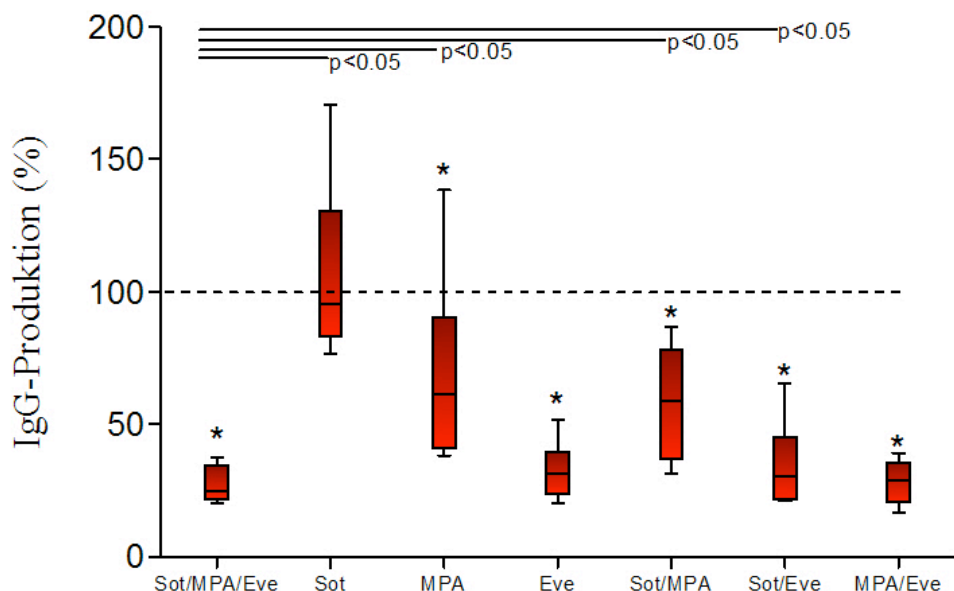


Abb. 11 Auswirkungen von immunsuppressiven Substanzen auf die IgG-Produktion humaner B-Lymphozyten. Die Auftragung erfolgt gegen die Kontrolle, dargestellt als 100%-Linie. Ein signifikanter Unterschied im Bezug auf die Lösemittelkontrolle ist mit einem * gekennzeichnet. Die Dreier-Kombination zeigt teilweise eine signifikante Hemmung entgegen den Einzel-Administrationen und den Zweier-Kombinationen. Nur gegenüber Everolimus und MPA/Everolimus war kein signifikanter Unterschied zu erkennen.

4.3.2 Einfluss auf die IgM-Produktion

Die IgM-Produktion verringerte sich unter Einfluss von 500nM Sotrastaurin verglichen mit der Kontrolllösung signifikant, wohingegen die 5nM und 50nM-Konzentrationen keinen Effekt verursachten (Abb. 12 A). Weiterhin produzierten B-Lymphozyten gegenüber der Kontrolllösung signifikant weniger IgM ab Dosen von 100ng/ml MPA oder ab der niedrigsten

Konzentration von 0,01ng/ml Everolimus (Abb. 12 B+C). Der Einfluss von MPA und Everolimus auf die Immunglobulinproduktion war dosisabhängig.

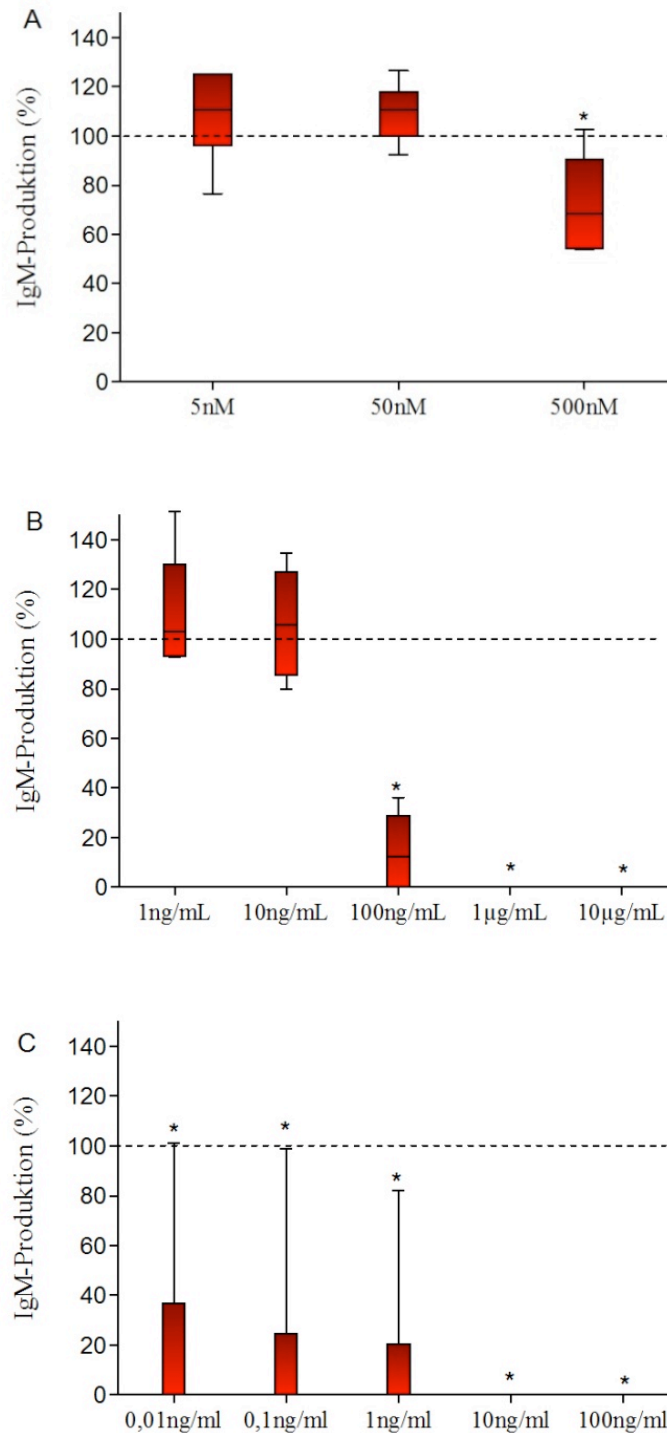
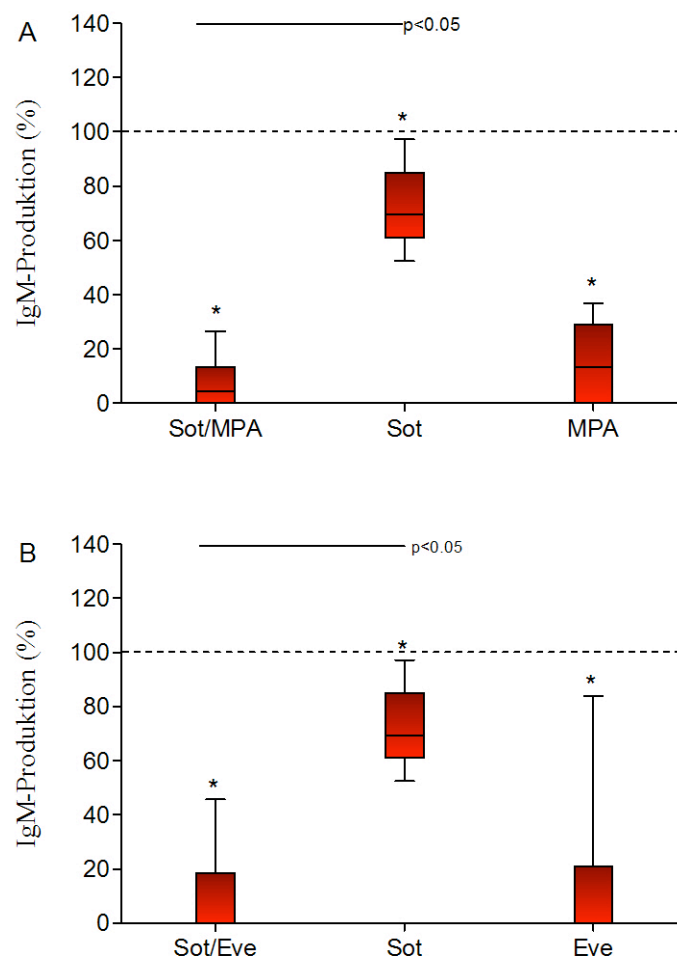


Abb. 12 Auswirkungen von immunsuppressiven Substanzen auf die IgM-Produktion humaner B-Lymphozyten. Die Auftragung erfolgt gegen die Kontrolle, dargestellt als 100%-Linie. Ein signifikanter Unterschied im Bezug auf die Lösemittelkontrolle ist mit einem * gekennzeichnet. Eine sehr hohe Dosis Sotrastaurin (A) verursacht eine signifikante Hemmung der IgM-Produktion. MPA (B) hemmt ab einer Konzentration von 100ng/ml und Everolimus (C) ab der niedrigsten untersuchten Konzentration die Produktion von IgM signifikant.

Die in den Kombinationsexperimenten eingesetzten Konzentrationen Sotrastaurin, MPA und Everolimus bewirkten in der Einzelbehandlung gegenüber der Kontrolllösung eine signifikante Hemmung der IgM-Produktion (Abb. 12 A-C).

Eine Auftragung aller Kombinationen der immunsuppressiven Substanzen gegen die Lösemittelkontrolle ergab ausnahmslos eine signifikante Hemmung der IgM-Produktion durch B-Lymphozyten. Die Produktion des Immunglobulins M wurde durch die Behandlung mit den Zweier-Kombinationen nur zum Teil gegenüber den Einzel-Administrationen signifikant gehemmt. Dabei änderte sich in Abhängigkeit von der Behandlung die IgM-Produktion oder blieb unverändert (Abb. 13 A-C). Die Dreier-Kombination erwirkte so gut wie keinen signifikanten Unterschied entgegen der Administration von einem oder zwei kombinierten immunsuppressiven Substanzen (Abb. 14).



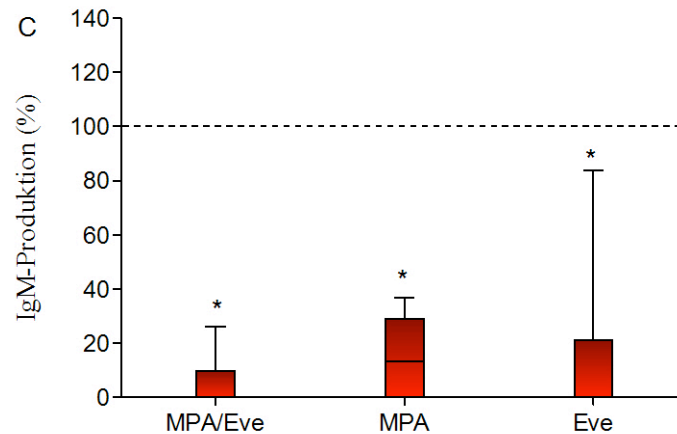


Abb. 13 Auswirkungen von immunsuppressiven Substanzen auf die IgM-Produktion humaner B-Lymphozyten. Die Auftragung erfolgt gegen die Kontrolle, dargestellt als 100%-Linie. Ein signifikanter Unterschied im Bezug auf die Lösemittelkontrolle ist mit einem * gekennzeichnet. Die Wirkung der Zweier-Kombinationen hemmt nur vereinzelt die Produktion von IgM gegenüber den einzelnen enthaltenen Substanzen signifikant.

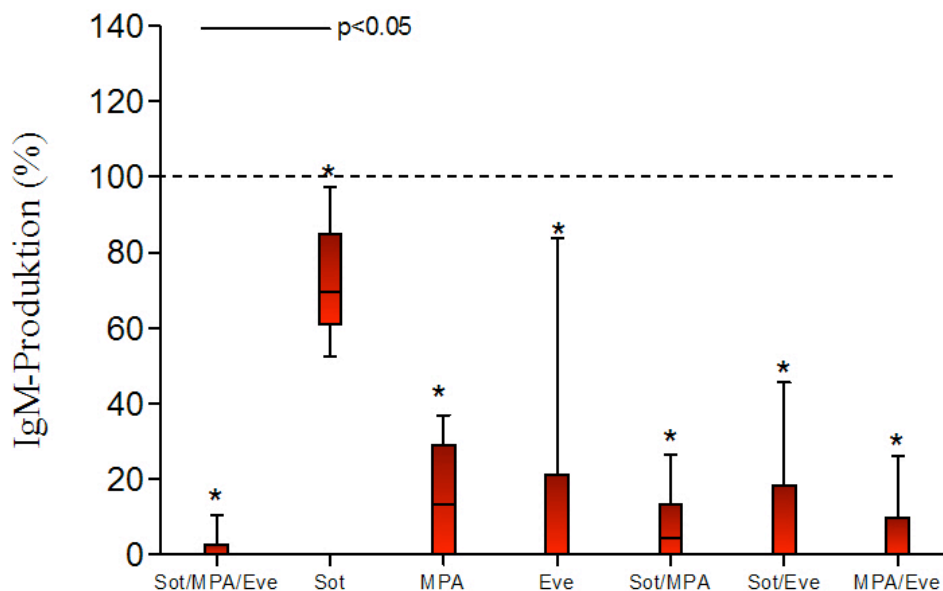


Abb. 14 Auswirkungen von immunsuppressiven Substanzen auf die IgM-Produktion humaner B-Lymphozyten. Die Auftragung erfolgt gegen die Kontrolle, dargestellt als 100%-Linie. Ein signifikanter Unterschied im Bezug auf die Lösemittelkontrolle ist mit einem * gekennzeichnet. Die Dreier-Kombination zeigt nur gegenüber Sotrastaurin eine signifikante Hemmung bei Betrachtung der Einzel-Administrationen und der Zweier-Kombinationen.

4.4 Einfluss von immunsuppressiven Substanzen auf das Apoptoseverhalten von B-Lymphozyten

Um einen Einblick zu erhalten, wie die verwendeten Immunsuppressiva auf die stimulierten humanen B-Lymphozyten wirkten, wurde eine Versuchsreihe zur Apoptose durchgeführt. Nach einer Inkubationszeit von drei Tagen wurden die B-Lymphozyten mit Annexin-V-FITC/PI gefärbt. In der anschließenden durchflusszytometrischen Analyse wurden die

verschiedenen Apoptosestadien quantifiziert. Vitale B-Lymphozyten konnten von früh-apoptotischen, spät-apoptotischen und toten Zellen unterschieden werden (Abb. 15).

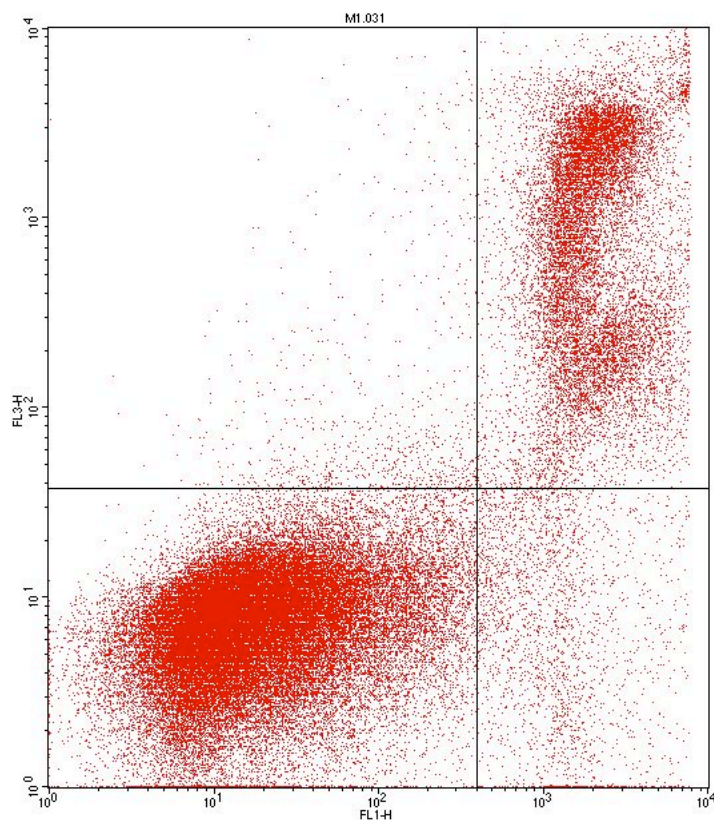


Abb. 15 Darstellung humaner stimulierter B-Lymphozyten in der FACS-Analyse nach Färbung mit Annexin-V-FITC/ PI. Der untere linke Quadrant enthält vitale B-Lymphozyten, der untere rechte Quadrant zeigt früh-apoptotische B-Lymphozyten, der obere rechte Quadrant enthält spät-apoptotische B-Lymphozyten und im oberen linken Quadranten sind tote B-Lymphozyten zu sehen. Die Daten eines repräsentativen Probanden werden gezeigt.

Früh-apoptotische, spät-apoptotische und tote B-Lymphozyten wurden bei der Analyse aller Experimente den vitalen B-Lymphozyten gegenübergestellt. Die Untersuchungen zeigten, dass Sotrastaurin teilweise einen signifikanten Einfluss auf das Apoptoseverhalten der B-Lymphozyten hatte. Der Anteil an vitalen B-Lymphozyten änderte sich nur bei einer Konzentration von 50nM signifikant gegenüber der Lösemittelkontrolle (Abb. 16 A). Bei dieser Konzentration, wie auch bei den weiteren, zeigten sich keine signifikanten Einflüsse auf den Anteil der früh- und spät-apoptotischen Zellen im Vergleich zur Kontrolllösung (Abb. 16 B+C). Der sehr geringe Anteil von toten B-Lymphozyten änderte sich bei jeder untersuchten Konzentration rechnerisch signifikant (Abb. 16 D). Eine Administration der höchsten Dosis Sotrastaurin von 500nM zeigte keinen signifikanten Einfluss auf die Vitalität der B-Lymphozyten und bewirkte keine signifikante Änderung des früh- und spät-apoptotischen Anteils. Allerdings war eine Tendenz zu erkennen, die auf einen ähnlichen Effekt hindeutete, wie ihn die 50nM-Dosis verursacht hatte (Abb. 16 A-C).

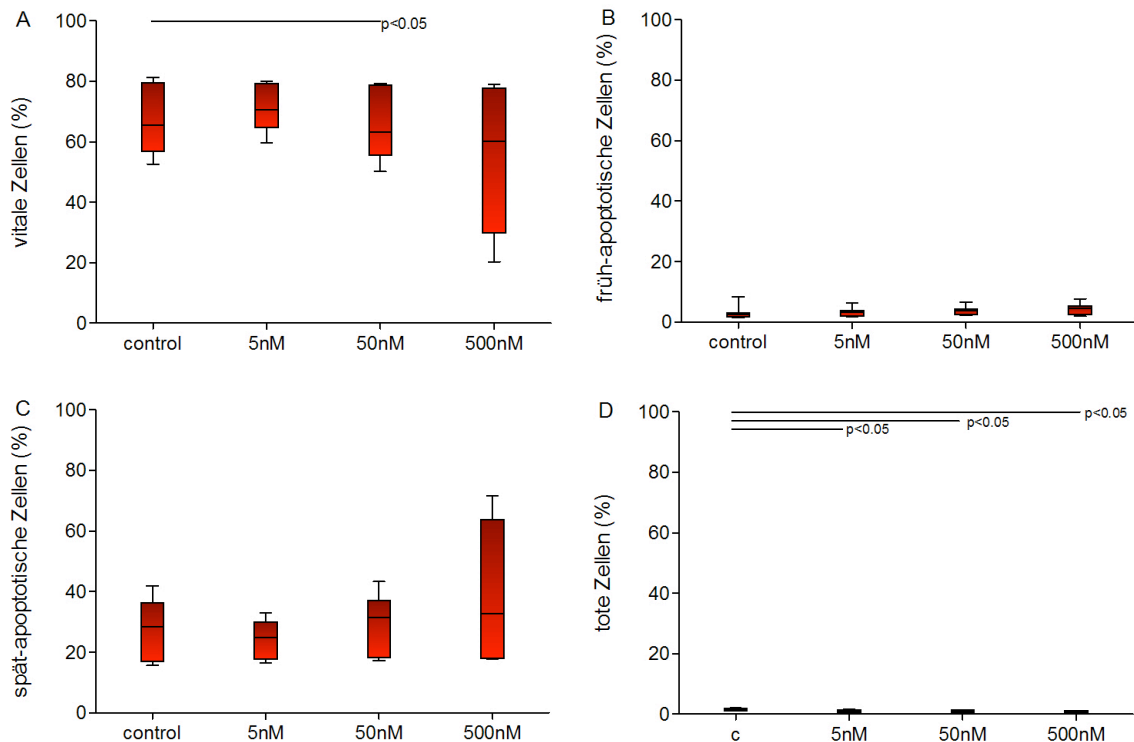


Abb. 16 Einfluss verschiedener Konzentrationen Sotrastaurin auf den Anteil vitaler, früh- und spät-apoptotischer sowie toter humaner B-Lymphozyten gegenüber der Lösemittelkontrolle. Nur die mittlere Konzentration Sotrastaurin mindert den Anteil vitaler B-Lymphozyten signifikant (A). Der Anteil früh- oder spät-apoptotischer B-Lymphozyten zeigt unter Sotrastaurin-Administration keine signifikante Veränderung (B+C). Jede Behandlung mit Sotrastaurin führt zur signifikanten Änderung des Anteils toter B-Lymphozyten, bei sehr geringer Zellzahl (D).

Aus der Behandlung mit MPA resultierte kaum ein signifikanter Einfluss auf das Apoptoseverhalten der B-Lymphozyten im Vergleich mit der Lösemittelkontrolle. Ab der niedrigsten Konzentration von 1ng/ml bis zur höchsten Konzentration von 10µg/ml MPA blieb eine Wirkung auf den Anteil vitaler B-Lymphozyten aus (Abb. 17 A). In der Gegenkontrolle der früh- und spät-apoptotischen B-Lymphozyten war kein nennenswerter Effekt zu beobachten. Die beiden höchsten Konzentrationen MPA bewirkten einen rechnerisch signifikanten Unterschied im Anteil früh-apoptotischer B-Lymphozyten (Abb. 17 B+C). Ebenso wies der Anteil toter B-Lymphozyten eine rechnerisch signifikante Abweichung von der Lösemittelkontrolle bei 100ng/ml auf (Abb. 17 D).

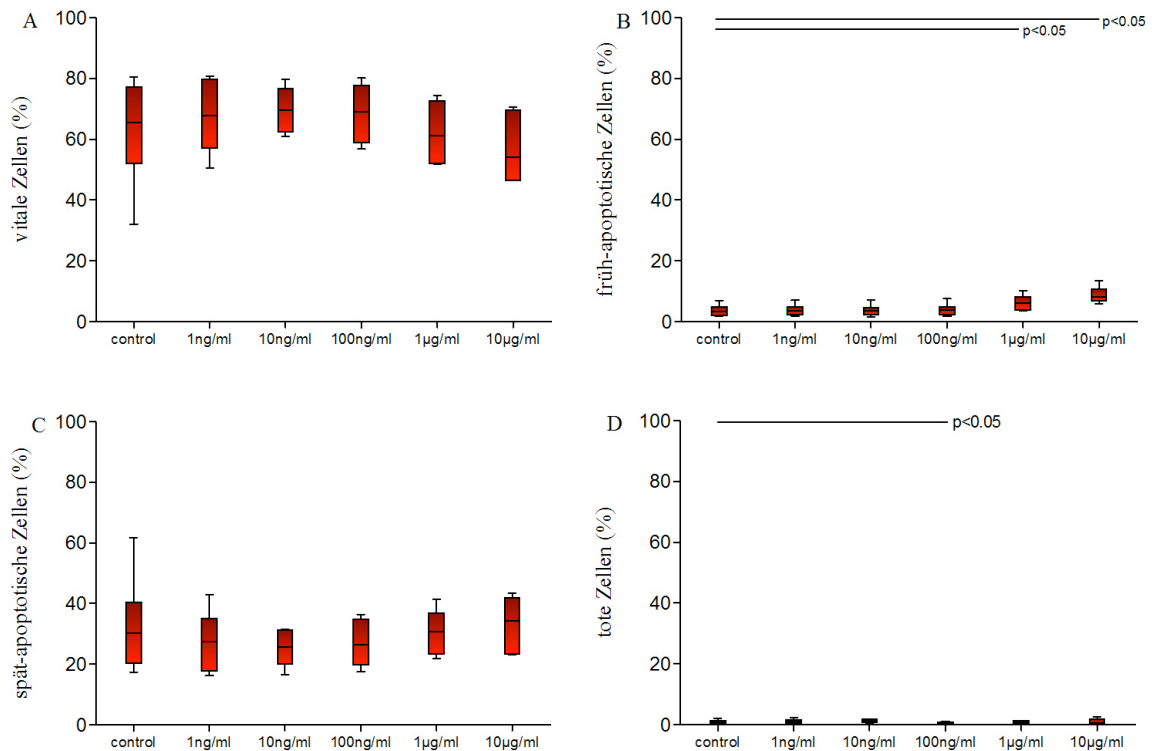
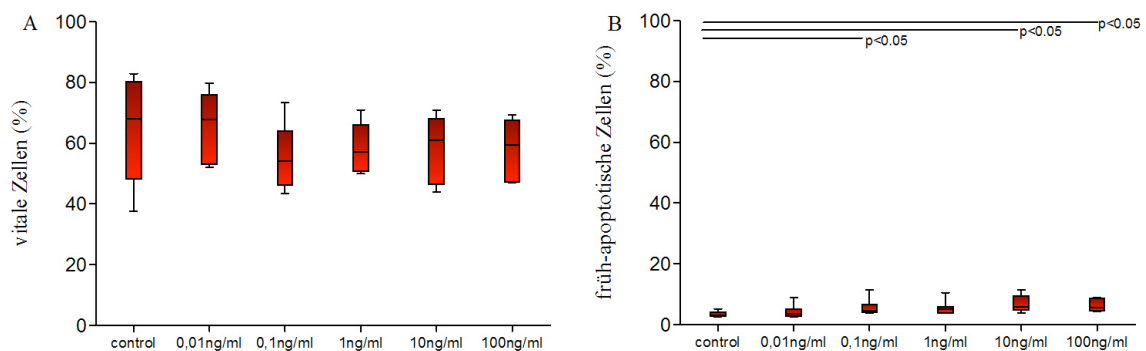


Abb. 17 Einfluss verschiedener Konzentrationen MPA auf den Anteil vitaler, früh- und spät-apoptotischer sowie toter humaner B-Lymphozyten gegenüber der Lösemittelkontrolle. Keine untersuchte Konzentration MPA verringert den Anteil vitaler oder spät-apoptotischer B-Lymphozyten signifikant (A+C). Vereinzelt zeigen sich rechnerisch signifikante Abweichungen des Anteils früh-apoptotischer und toter B-Lymphozyten durch hohe Konzentrationen MPA (B+D).

Ein ähnliches Verhalten zeigten die B-Lymphozyten unter dem Einfluss von Everolimus. Der Anteil vitaler und spät-apoptotischer B-Lymphozyten wurde durch Konzentrationen zwischen 0,01ng/ml und 100ng/ml Everolimus nicht beeinflusst (Abb. 18 A+C). Vereinzelt Konzentrationen Everolimus bewirken rechnerisch signifikante Abweichungen im Anteil früh-apoptotischer und toter B-Lymphozyten (Abb. 18 B+D).



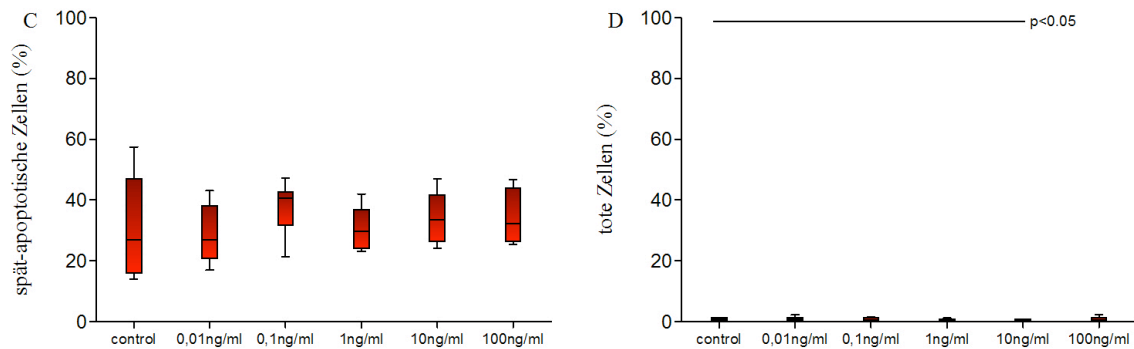


Abb. 18 Einfluss verschiedener Konzentrationen Everolimus auf den Anteil vitaler, früh- und spät-apoptotischer sowie toter humaner B-Lymphozyten gegenüber der Lösemittelkontrolle. Keine untersuchte Konzentration Everolimus verringert den Anteil vitaler oder spät-apoptotischer B-Lymphozyten signifikant (A+C). Die Analyse ergibt vereinzelt rechnerisch signifikante Abweichungen des Anteils früh-apoptotischer und toter B-Lymphozyten durch hohe Konzentrationen Everolimus (B+D).

Die immunsuppressiven Substanzen zeigten in den für die Kombinationsversuche ausgewählten Konzentrationen allein keinen Einfluss auf den Anteil vitaler B-Lymphozyten (Abb.16 A, 17 A, 18 A). Auch in der Gegenkontrolle wurde keine Zunahme des Anteils spät-apoptotischer B-Lymphozyten im Vergleich zur Lösemittelkontrolle verzeichnet (Abb. 16 C, 17 C, 18 C). Die Behandlung mit den immunsuppressiven Substanzen bewirkte im Anteil früh-apoptotischer und toter B-Lymphozyten rechnerisch signifikante Änderungen gegenüber der Kontrolllösung (Abb. 16 B+D, 17 B+D, 18 B+D). Daher wurden die früh- und spät-apoptotischen sowie toten B-Lymphozyten in der Analyse der Kombinationen zusammengefasst und dem Anteil vitaler B-Lymphozyten gegenübergestellt.

Eine Zweier-Kombination verursachte im Vergleich zur Lösemittelkontrolle einen signifikant verringerten Anteil vitaler B-Lymphozyten (Abb. 19 A). Die Gegenkontrolle zeigte einen signifikanten Anstieg des zusammengefassten Anteils früh-, spät-apoptotischer und toter B-Lymphozyten bei der gleichen Kombination (Abb. 19 B). Zum Teil erzielten die Zweier-Kombinationen gegenüber der isolierten Administration signifikante Unterschiede. Diese spiegelten sich in der Gegenkontrolle in einer Zu- bzw. Abnahme der komplementären Anteile wider. In Abhängigkeit von der Behandlung stieg der Anteil vitaler B-Lymphozyten oder blieb unverändert. Die Dreier-Kombination bewirkte hingegen keine signifikanten Abweichungen des Anteils vitaler B-Lymphozyten entgegen den Einzel-Administrationen oder den Zweier-Kombinationen. Die Betrachtung des zusammengefassten Anteils früh-, spät-apoptotischer und toter B-Lymphozyten bestätigte die fehlende Auswirkung auf das Apoptoseverhalten humaner B-Lymphozyten (Abb.19 A+B).

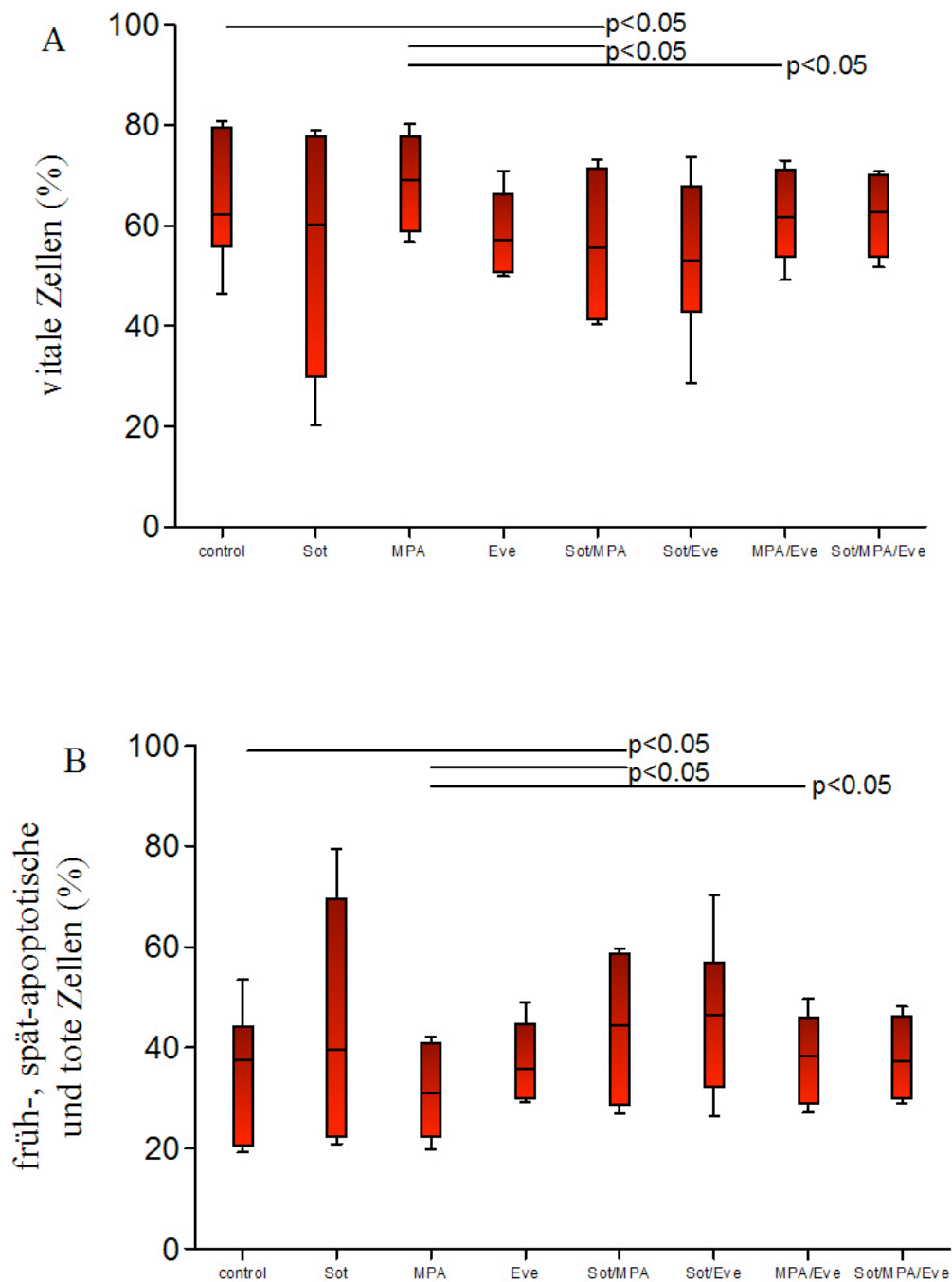


Abb. 19 Darstellung des Anteils vitaler (A) und früh-, spät-apoptischer sowie toter (B) B-Lymphozyten nach Behandlung mit Immunsuppressiva und deren Kombinationen. Die Behandlung mit der Kombination MPA/ Sotrastaurin oder MPA/ Everolimus hat einen signifikant geringeren Anteil vitaler B-Lymphozyten gegenüber der isolierten Behandlung mit MPA zur Folge. Die Kombination Sotrastaurin/ MPA verringert den Anteil vitaler B-Lymphozyten verglichen mit der Lösemittelkontrolle signifikant (A). Die Gegenkontrolle zeigt eine signifikante Zunahme der Anteile früh-, spät-apoptischer und toter B-Lymphozyten bei Betrachtung genau dieser Behandlungen (B). Alle weiteren Vergleiche blieben ohne signifikante Unterschiede.

5. Diskussion

Ziel dieser Arbeit war die Untersuchung des Einflusses von Sotrastaurin, MPA und Everolimus auf stimulierte humane B-Lymphozyten, isoliert und in Kombination *in vitro*. Die Proliferation, die Exprimierung des Kostimulationsmoleküls CD80, die Produktion von IgG und IgM, sowie das Apoptoseverhalten sind Teil der Aktivierungsprozesse, die zur Transplantatabstoßung führen können und wurden daher von uns analysiert. Die Ergebnisse unserer Untersuchungen zeigen, dass Sotrastaurin keine signifikante Hemmung der B-Lymphozyten-Funktionen *in vitro* verursacht. MPA und Everolimus verursachten dagegen in unseren Untersuchungen eine signifikante und dosisabhängige Hemmung der humanen B-Lymphozyten-Funktionen *in vitro*. Ein signifikanter Einfluss auf das Apoptoseverhalten war nicht zu verzeichnen. Die Kombination der Immunsuppressiva rief unterschiedliche Ergebnisse hervor, welche im Folgenden detaillierter diskutiert werden.

5.1 Immunsuppressiva-Wirkung auf die Proliferation humaner B-Lymphozyten *in vitro*

Die Proteinkinase C ist ein essentieller Bestandteil der intrazellulären Signalwege, welche für die B-Zell-Signalisierung und das B-Zell-Überleben eine große Bedeutung haben (89, 108). Ein Immunsuppressivum, welches auf dieses Enzym einwirkt und dessen Funktion einschränkt, beeinflusst gleichzeitig die Proliferation der betroffenen Zelltypen, da Aktivierungsabläufe unterbrochen werden. Es gibt eine Anzahl von Studien, die einen direkten Einfluss von Sotrastaurin auf die T-Zell-Proliferation beschreiben (78, 109-111). Hingegen sind noch keine Studien veröffentlicht, die sich mit der Auswirkung von Sotrastaurin auf die Proliferation humaner B-Lymphozyten befassen. Wir stellten die Hypothese auf, dass Sotrastaurin die Proliferation humaner B-Lymphozyten hemmen könnte, da PKC-Isoformen auch in humanen B-Lymphozyten zu finden sind (89, 112). In vielen Studien haben MPA und Everolimus ihre Wirksamkeit in der Zellteilungshemmung unter Beweis gestellt. MPA hemmt im Körper selektiv die IMPDH. Sie ist ein wichtiges Enzym der DNA-Replikation, die an die Zellteilung von T- und B-Lymphozyten gekoppelt ist (33, 57). Das Protein mTOR steuert die Translation von Proteinen und ist verantwortlich für das Zellwachstum und den Zellzyklus. Diese zentrale Rolle macht es zu einem potenten Ziel für den mTOR-Hemmer Everolimus (113-114).

Da die Proliferation ein sehr wichtiger Parameter für die Immunantwort ist, untersuchten wir in unserer Studie den Einfluss immunsuppressiver Substanzen auf das Zellteilungsverhalten humaner B-Lymphozyten. Wir stimulierten humane B-Lymphozyten mit aCD-40, CPG-ODN2006 und IL-4. Anschließend ließ sich die Auswirkung auf die proliferierten Zellkulturen mit Hilfe der durchflusszytometrischen Messung quantifizieren. Wir beobachteten, dass sich die B-Lymphozyten in Kultur unter Sotrastaurin-Administration gegensätzlich zu unserer Hypothese verhielten. Die Konzentrationen von 50nM und 500nM verursachte keine Proliferationshemmung (Abb. 3 A). Die Untersuchung ergab hingegen, dass nach der Inkubation mit dem Immunsuppressivum mehr B-Lymphozyten proliferiert waren als in der Lösemittelkontrolle. Dieser Effekt stellt ein überraschendes Ergebnis für den PKC-Hemmer dar.

Wie die klinische Anwendung beweist, kann die Behandlung mit MPA oder Everolimus eine Transplantatabstoßung verhindern. Wir untersuchten jeweils fünf aufsteigende Konzentrationen MPA und Everolimus und die Ergebnisse bestätigten eine signifikant hemmende Beeinflussung der B-Zell-Proliferation (Abb. 3 B+C). Ferner konnten wir für beide Immunsuppressiva eine Dosisabhängigkeit ableiten. Heidt et al. befassten sich in ihrer Studie mit einer ähnlichen Hypothese (115). In ihrer Untersuchung mit MPA und Sirolimus kamen sie zu dem Ergebnis, dass beide immunsuppressiven Substanzen die B-Zell-Proliferation hemmen. Trotz Abweichungen im Versuchsaufbau kann man sagen, dass die Ergebnisse beider Studien eine annähernd gleiche Wirkung beschreiben.

Végso et al. untersuchten die antiproliferative Wirkung von MPA auf Lymphomzellen und Myelomzellen *in vitro*. Sie zeigten eine dosisabhängige Arretierung in der G1 und G2-Phase des Zellzyklus und somit verbunden eine Hemmung der Proliferation dieser Zellen gegenüber der Kontrolle (116). Majewski et al. betrachteten in ihrer Studie den antiproliferativen Effekt von Everolimus auf B-Zell-Linien *in vitro*. Sie beobachteten, dass eine Inkubation für 48h mit Konzentrationen dieses Immunsuppressivums zwischen 0 und 10µM den Zellzyklus in der G0 und G1-Phase blockiert. Die Wirkung der immunsuppressiven Substanz war dosisabhängig (117). Die Ergebnisse dieser Studien gehen mit unseren konform und zeigen den antiproliferativen Effekt von MPA und Everolimus auf humane Zellen *in vitro*.

Die Betrachtung der Kombinationsmöglichkeiten sollte Aufschluss über die Wirkung der Immunsuppressiva geben, welche durch gegenseitige Wechselwirkungen erzeugt wird. Alle

Kombinationsvarianten erreichten laut unserer Untersuchung gegenüber der Lösemittelkontrolle Werte, die eine signifikante Hemmung belegen. Sotrastaurin in Kombination mit MPA oder Everolimus verursachte eine hemmende Wirkung, die gegenüber der isolierten Sotrastaurin-Administration signifikant gesteigert war (Abb. 4 A+B). Die Betrachtung der B-Lymphozyten unter Everolimus-Einfluss zeigte hingegen einen geringeren Proliferationsgrad im Vergleich zur Kombination Sotrastaurin/ Everolimus (Abb. 4 B). Daraus kann man schließen, dass die alleinige Everolimus-Gabe einen stärkeren Effekt auf die Proliferation ausübt als besagte Kombination. In die gleiche Richtung deuten auch die Werte der Sotrastaurin/ MPA-Administration bezogen auf die isolierte MPA-Behandlung (Abb. 4 A). Die Kombination und die einzelne Substanz unterscheiden sich nicht signifikant in ihrer antiproliferativen Wirkung. Diese zwei Tendenzen geben Anlass dazu, Sotrastaurin als Bestandteil einer Kombination in Frage zu stellen, denn man erhofft sich von Wechselwirkungen zwischen den Substanzen eine Steigerung der antiproliferativen Wirkung. B-Lymphozyten, die mit MPA/ Everolimus behandelt wurden, wurden in ihrer Proliferation im gleichen Maße gehemmt, wie durch die Einzelbehandlung mit Everolimus (Abb. 4 C). Es zeichnete sich kein signifikanter Unterschied in der antiproliferativen Wirkung ab. Die Gegenüberstellung jener Kombination und MPA wies hingegen eine signifikant gesteigerte Hemmung der B-Lymphozyten-Proliferation durch MPA/ Everolimus auf. Diese Vergleiche deuten an, dass Everolimus die potenteste antiproliferative Wirkung auf die humoralen B-Lymphozyten *in vitro* entfaltet.

Die Kombination aus allen drei Substanzen offenbarte eine deutlichere Hemmung der Proliferation gegenüber den einzelnen Substanzen und den Zweier-Kombinationen (Abb. 5). Ausnahmen waren die Vergleiche mit der Einzelgabe Everolimus und der Kombination MPA/ Everolimus. Wir vermuten, dass die Wechselwirkung mit Sotrastaurin in der Dreier-Kombination dazu führt, dass keine signifikanten Einflüsse auf die B-Lymphozyten gemessen werden können. Die Beteiligung von Sotrastaurin an der Immunsuppressiva-Kombination hat demnach keinen messbaren Vorteil für die Anwendung. Die Behandlung mit Everolimus oder der Kombination MPA/ Everolimus erwirkt eine mindestens genauso gute Hemmung der Zellteilung, wie die Kombination aller drei Substanzen *in vitro*.

Zusammenfassend kann man sagen, dass die verwendete Konzentration Everolimus die stärksten hemmenden Effekte in der Kombination verursachte. Wir konnten in jeder untersuchten Everolimus-haltigen Kombination eine gesteigerte antiproliferative Wirkung

gegenüber einer Everolimus-freien Administration feststellen. Wir vermuten, dass die Wirkung des mTOR-Hemmers Everolimus die Effekte in der Kombination mit den anderen Substanzen überdeckt.

5.2 Beeinflussung der CD80-Exprimierung humaner B-Lymphozyten durch immunsuppressive Substanzen *in vitro*

CD80 wird auf aktivierten B-Lymphozyten und Monozyten exprimiert und dient als kostimulatorisches Signal für die T-Zell-Aktivierung. Es ist der Ligand für CD28 und das zytotoxische T-Lymphozyten Antigen 4 (Cytotoxic T-Lymphocyte Antigen 4, CTLA4), welche auf den T-Lymphozyten liegen (35-37). Die gegenseitige Stimulation von B- und T-Lymphozyten ist ein wichtiger Bestandteil der Immunantwort. Daher sollte die Exprimierung dieses Oberflächenmoleküls unterbunden werden, um die Aktivierungsvorgänge bei Rejektionsprozessen zu stören. Wir untersuchten als Teilaspekt dieser Arbeit den Einfluss der immunsuppressiven Substanzen Sotrastaurin, MPA und Everolimus isoliert und in Kombination auf die CD80-Exprimierung humaner B-Lymphozyten. Nach Stimulation und Behandlung erfolgte die Quantifizierung der exprimierten Oberflächenmoleküle unter Immunsuppression mit Hilfe der Durchflusszytometrie.

Sotrastaurin hemmte in keiner verwendeten Dosis die CD80-Exprimierung im Vergleich zur Lösemittelkontrolle (Abb. 6 A). Stattdessen war eine Tendenz zu erkennen, dass mit aufsteigender Konzentration auch die CD80-Exprimierung auf den B-Lymphozyten im Vergleich zur Kontrolllösung zunahm. Dieses Ergebnis widerspricht der Hypothese, welche eine hemmende Wirkung von Sotrastaurin auf die B-Zell-Funktionen beschreibt. Möglicherweise wirkt das Immunsuppressivum gegen andere PKC-abhängige, intrazelluläre Vorgänge hemmend. Dieser Sachverhalt könnte Inhalt zukünftiger Studien sein. Im Gegensatz zu dieser Substanz minderten MPA und Everolimus die CD80-Exprimierung auf der B-Zell-Oberfläche verglichen mit der Kontrolllösung signifikant und dosisabhängig (Abb. 6 B+C).

Wadia et al. untersuchten die Wirkung von MPA auf primäre B-Lymphozyten *in vitro*. Die Zellkulturen wurden mit IL-4, GM-CSF und TNF α stimuliert, nach sieben Tagen Inkubation geerntet und mit Hilfe der Durchflusszytometrie quantifiziert. Durch die Zugabe von 50 μ g/ml MPA wurde gegenüber eine unbehandelten Probe die Exprimierung von CD80 deutlich

vermindert (118). Geng et al. untersuchten den Einfluss von MPA auf die B7-Familie, zu der auch der kostimulatorische Ligand CD80 gehört, *in vitro*. In Zellkulturen, stimuliert mit GM-CSF und IL-4 wurden dendritische Zellen für sieben Tage inkubiert, mit 0,01 bzw. 0,1 μ M MPA behandelt und mittels der Durchflusszytometrie gemessen. Die Expression von CD80 auf der Oberfläche der Zellen wurde gegenüber der unbehandelten Kontrolle in beiden Konzentrationen signifikant reduziert (119). Beide Studien gehen mit unseren Untersuchungen konform, dass MPA die CD80-Exprimierung auf Zellen hemmt.

Die Kombinationen der drei Substanzen sorgten für unterschiedliche Wirkungen verglichen mit der isolierten Immunsuppressiva-Administration. Die Sotrastaurin-Kombinationen Sotrastaurin/ MPA und Sotrastaurin/ Everolimus hemmten die B-Zell-Funktion im Vergleich zur Kontrolllösung nicht signifikant (Abb. 7 A+B). Dieses Ergebnis unterstützt das erste Experiment, welches zeigte, dass die Kombinationspartner MPA und Everolimus selbst in ihrer Einzelbehandlung signifikant weniger Exprimierung von CD80 auf den B-Lymphozyten zugelassen hatten. In Kombination mit Sotrastaurin wurde kein signifikanter Einfluss beobachtet. Wir vermuten, dass die Wechselwirkung mit Sotrastaurin die beiden anderen Substanzen in ihrer Wirkungsweise beeinträchtigte. Zu diesem Sachverhalt liegt derzeit keine vergleichbare Literatur vor.

MPA/ Everolimus verringerte, wie auch die Dreier-Kombination, entgegen der Kontrolllösung die Exprimierung der Oberflächenmoleküle auf den B-Lymphozyten signifikant (Abb. 7 C). Ein additiver Effekt zwischen MPA und Everolimus steigerte möglicherweise die Wirkung der kombinierten Behandlung. Sotrastaurin/ MPA und Sotrastaurin/ Everolimus hemmten die CD80-Exprimierung gegenüber der Einzelbehandlung mit Sotrastaurin signifikant (Abb. 7 A+B). MPA und Everolimus erreichten in der Einzel-Administration bereits eine ausgeprägte Hemmung der Oberflächenmolekülexprimierung. Wir stellen die Hypothese auf, dass es zu keinem additiven Effekt mit Sotrastaurin in diesen Kombinationen kam und dass stattdessen die Wirkung von MPA und Everolimus allein für die geringere Menge an exprimierten CD80-Molekülen auf den B-Lymphozyten verantwortlich war. Wir beobachteten, dass die Kombination MPA/ Everolimus verglichen mit der isolierten MPA-Administration die Expression von CD80 signifikant hemmte (Abb. 7 C). Hier vermuten wir einen additiven Effekt zwischen den Substanzen, der für den signifikanten Unterschied sorgte. Dieser additive Effekt reichte jedoch nicht aus, um gegenüber der Wirkung der isolierten Everolimus-Administration eine signifikante

Abweichung in der CD80-Exprimierung hervorzurufen. Mit Sotrastaurin/ Everolimus behandelte B-Lymphozyten exprimierten signifikant mehr Oberflächenmoleküle als unter dem Einfluss von Everolimus (Abb. 7 B). Dieser Vergleich belegt, dass Sotrastaurin kombiniert mit Everolimus keinen additiven Effekt auslöst und stattdessen die CD80-Exprimierung steigert. Diese unerwartete Wirkung sahen wir bereits als Tendenz in der Auftragung Sotrastaurin gegen die Lösemittelkontrolle.

Die Behandlung der Kulturen mit allen drei Substanzen zeigte eine signifikante Hemmung von CD80 auf der Oberfläche im Vergleich mit der Sotrastaurin-Gabe. Hingegen erreichten die Immunsuppressiva MPA oder Everolimus verglichen mit der Dreier-Kombination eine vergleichbare Wirkung (Abb. 8). In unserer vorangegangenen Untersuchung erwies sich die Einzel-Administration mit MPA oder Everolimus jedoch als sehr wirksam (Abb. 6 B+C). Daher vermuten wir, dass der Proliferationshemmer und der mTOR-Hemmer allein im gleichen Maße auf die humanen B-Lymphozyten wirken, wie die Dreier-Kombination. An dieser Stelle ließ sich nicht nachweisen, ob Sotrastaurin einen Einfluss auf die Wechselwirkung der Dreier-Kombination ausübte. Weitere Studien können diesen Sachverhalt klären, da zurzeit keine Literatur vorliegt, welche die Wirkung von Sotrastaurin auf B-Lymphozyten beschreibt.

Die B-Lymphozyten, die mit allen drei Substanzen gemeinsam behandelten wurden, exprimierten signifikant weniger CD80 auf ihrer Oberfläche als unter dem Einfluss von Sotrastaurin/ MPA (Abb. 8). Wir vermuten, dass der Unterschied der immunsuppressiven Wirkung von der Wechselwirkung zwischen MPA und Everolimus ausgeht. Hier spiegelt sich zum einen die ausgeprägte Wirkung von Everolimus als potenter Kombinationspartner wider und zum anderen der Nutzen eines auftretenden additiven Effektes. Die Dreier-Kombination und die Behandlung mit Sotrastaurin/ Everolimus unterschieden sich in ihrer Wirkung auf die CD80-Exprimierung nicht. Die wahrscheinliche Ursache ist, dass Everolimus allein die gleiche Wirkung wie die kombinierte Therapie erreicht, da die beteiligten Substanzen den Effekt des mTOR-Hemmers nicht messbar steigern können.

Für kommende Studien können wir empfehlen, geringere Konzentrationen Everolimus zu untersuchen, um mögliche Effekte quantifizieren zu können. B-Lymphozyten, die mit allen drei Substanzen behandelt wurden, exprimierten signifikant mehr CD80 auf ihrer Oberfläche als unter dem Einfluss von MPA/ Everolimus (Abb. 8). Wir vermuten, dass Sotrastaurin auf

eine bestimmte Weise mit den Kombinationspartnern wechselwirkt, was entweder deren Wirkung hemmte oder die die Expressierung von CD80 auf der Zelloberfläche steigerte. Beide Theorien bedeuteten eine höhere CD80-Expressierung *in vitro*. Diese Eigenschaft zeigte sich bereits tendenziell in der Betrachtung der einzelnen Sotrastaurin-Administration. Zukünftige Studien sind notwendig, um unter Berücksichtigung unserer Erkenntnisse diese Sachverhalte untersuchen.

5.3 Produktion von IgG und IgM durch humane B-Lymphozyten unter Immunsuppressiva-Einfluss *in vitro*

Immunglobuline haben die Aufgabe, körperfremde Antigene zu erkennen und zu binden. Sie werden von Plasmazellen sezerniert, leiten die Antikörper-vermittelte Immunantwort ein und unterstützen dadurch die Gesamtreaktion des Organismus auf einen Fremdstoff. Eine Unterdrückung der Immunglobulinproduktion verhindert klinisch unter anderem die Aktivierung des Komplement-Systems, welches ein wichtiger Faktor der humoralen Immunantwort ist (38). Da Antikörper für die Steuerung der humoralen Immunantwort hauptverantwortlich sind und massiv zur Transplantatabstoßung beitragen, untersuchten wir in unserer Studie eine mögliche Hemmung der Immunglobulinproduktion durch Administration immunsuppressiver Substanzen. Aus der im ELISA gemessenen Menge an IgG und IgM in Überständen von B-Zell-Kulturen konnten wir Rückschluss auf die Wirkung der Immunsuppressiva auf die Antikörperproduktion humaner B-Lymphozyten ziehen. Die Administration von Sotrastaurin, MPA oder Everolimus beeinflusste die Immunglobulinproduktion auf unterschiedliche Weise.

In unserem Versuch erwirkte der PKC-Hemmer Sotrastaurin keine signifikante Hemmung der Plasmazellen und folglich der IgG-Produktion gegenüber der Lösemittelkontrolle (Abb. 9 A). Einen vergleichbaren Einfluss mit ähnlichen Ergebnissen zeigte der PKC-Hemmer in Bezug auf die Produktion von IgM. Die Konzentrationen von 5nM und 50nM bewirkten keine signifikante Hemmung. Hingegen minderte die Dosis von 500nM die IgM-Produktion im Vergleich zur Lösemittelkontrolle signifikant (Abb. 12 A). Ab einer Konzentration von 1µg/ml hemmte MPA die Produktion von IgG entgegen der Lösemittelkontrolle signifikant (Abb. 9 B). Auch zu diesem Sachverhalt liegt keine vergleichbare Literatur vor. Aufsteigend von der Konzentration 100ng/ml MPA trat eine signifikante Hemmung der IgM-Produktion ein (Abb. 12 B). In unseren Versuchen zeigte Everolimus eine signifikante Hemmung der

IgG-Produktion aufsteigend ab einer Konzentration von 0,1ng/ml, verglichen mit der Lösemittelkontrolle (Abb. 9 C). Ab der niedrigsten Dosis von 0,01ng/ml Everolimus bis zur Höchstdosis offenbarte sich eine signifikante Hemmung der Produktion von IgM in Bezug auf die Kontrolle (Abb. 12 C).

Die Folge von Apoptose und Proliferationshemmung ist eine Verminderung der Zellzahl. Wenn weniger Plasmazellen existieren, resultiert daraus eine verringerte Produktion von Immunglobulinen. Da Sotrastaurin in unseren Experimenten weder die Proliferation der humanen B-Lymphozyten hemmte noch eine Apoptoseinduktion hervorrief, kann dies beides nicht der Grund für den fehlenden Einfluss auf die Immunglobulinproduktion sein (Abb. 3 A, Abb. 16).

Heidt et al. postulieren, MPA und Sirolimus würden die Menge an produziertem IgG und IgM durch die Hemmung der B-Zell-Proliferation und die Induktion der Apoptose in der Zellkultur verringern (115). Wir überprüften diese These in Bezug auf MPA und Everolimus und konnten ihr auf Grund der Analyse unserer Versuche teilweise zustimmen. Ein Einfluss von MPA und Everolimus auf das Apoptoseverhalten der humanen B-Lymphozyten war nicht nachzuweisen (Abb. 17, Abb. 18). Dafür wirkte MPA ab 100ng/ml antiproliferativ auf die B-Lymphozyten (Abb. 3 B). Die Auswertung ergab in diesem Konzentrationsbereich eine deutliche Minderung von IgG und IgM in den B-Zell-Kulturen (Abb. 9 B, Abb. 12 B). Gleiches galt auch für Everolimus (Abb. 3 C). Durch die wirkungsvolle Hemmung der B-Lymphozyten-Proliferation zeigte sich in unserer Untersuchung auch eine signifikante Abnahme der Menge an Immunglobulin G und M (Abb. 9 C, Abb. 12 C). In weiteren Studien muss geklärt werden, ob die ermittelten signifikanten Einflüsse aus der Hemmung der Synthese an sich oder der verminderten Zellzahl resultierten.

Heidt et al. verweisen auf die Stimulation als ein wichtiges Kriterium der Immunglobulinproduktion (115). Der Studienaufbau von Heidt et al. sah eine Stimulation der B-Lymphozyten mit α -CD40 und CpG-ODN2006 vor (115). In unseren Experimenten stimulierten wir die B-Lymphozyten mit α -CD40, CpG-ODN2006 und darüber hinaus IL-4 zur Schaffung optimaler Lebensbedingungen für die B-Lymphozyten. Laut Auswertung war der Anteil an toten Zellen in der Studie von Heidt et al. höher als in unseren Untersuchungen. Wie unsere Experimente zum Apoptoseverhalten humaner B-Lymphozyten zeigen, sterben wenige Zellen unter unserer Stimulationsart (Abb. 16-18). Diese Ergebnisse sind Hinweis für

die Stimulation als einen wichtigen Faktor des Zellüberlebens und somit der Zellfunktionen. Zusammenfassend betrachtet gehen unsere Ergebnisse und die Aussagen von Heidt et al. konform (115). Everolimus und MPA sind Substanzen, die effektiv und dosisabhängig die Immunglobulinproduktion humaner B-Lymphozyten hemmen, wie in der klinischen Anwendung bereits bestätigt wurde (33, 113).

Wadia et al. untersuchten die Wirkung von MPA auf primäre B-Lymphozyten und deren Differenzierung zu Memory-B-Lymphozyten oder Plasmazellen *in vitro*. Die Zellkulturen wurden mit CpG-DNA, CD40, IL-2 und IL-10 stimuliert. Nach fünf Tagen Inkubation wurden die Zellkulturüberstände und mit Hilfe der ELISA-Methode gemessen. Durch die Zugabe von MPA an Tag 0 oder 2 wurde gegenüber einer unbehandelten Probe die IgG-Produktion signifikant vermindert (118). Diese Ergebnisse unterstützen unsere Aussagen zur Wirkung von MPA auf die Immunglobulinproduktion.

Weiterhin untersuchten wir die Wirkung der Immunsuppressiva-Kombinationen auf die Immunglobulinproduktion. Im Vergleich mit der Lösemittelkontrolle verursachten alle möglichen Zweier-Kombinationen und die Kombination aus allen drei Substanzen eine signifikante Hemmung der Produktion von IgG und IgM (Abb. 10+11, Abb. 13+14). Im Folgenden werden die Immunglobulin G und M getrennt voneinander diskutiert.

Alle Sotrastaurin-haltigen Kombinationen erzielten in der Gegenüberstellung mit der reinen Sotrastaurin-Behandlung eine signifikant gesteigerte Hemmung (Abb. 10 A+B, Abb. 11). Entsprechende Literatur, die zum Vergleich herangezogen werden könnte, findet sich derzeit nicht. 500nM Sotrastaurin allein rief keine signifikante Hemmung der IgG-Produktion verglichen mit der Kontrolllösung hervor (Abb. 9 A). Indessen war die Wirksamkeit der anderen Substanzen auf die B-Lymphozyten deutlich. Wie vorangegangene Ausführungen belegen, setzten diese Substanzen allein die IgG-Produktion fast vollständig herab (Abb. 9 B+C). Wir vermuten, dass MPA und Everolimus als Teil der Kombination für die Wirkung verantwortlich waren, anstatt möglicher Wechselwirkungen. Die Betrachtung der Kombinationen Sotrastaurin/ MPA gegen MPA, Sotrastaurin/ Everolimus gegen Everolimus und die Dreier-Kombination gegen MPA/ Everolimus bestätigten diesen Eindruck (Abb. 10 A+B, Abb. 11). Wir konnten in unseren Untersuchungen keinen Nachweis darüber führen, ob eine Administration mit oder ohne Sotrastaurin eine Änderung in der Immunglobulinproduktion hervorgerufen hätte. Die additiven Effekte zwischen MPA und

Everolimus bewirkten eine deutliche Überlegenheit gegenüber allen weiteren Behandlungen. So ergaben sich für die Dreier-Kombination mit Ausnahme der Einzel-Administration Everolimus und der Kombination MPA/Everolimus signifikante Unterschiede (Abb. 11).

Auf Grund der extremen Reduzierung der IgG-Produktion durch Everolimus sollten in zukünftigen Studien geringere Konzentrationen des mTOR-Hemmers in Kombinationen verwendet werden, um mögliche Wechselwirkungen zwischen den Substanzen besser erkennen zu können.

Unsere Analyse ergab, dass 500nM Sotrastaurin allein eine signifikante Hemmung der IgM-Produktion verursachte (Abb. 12 A). Weiterhin wies die Produktion von IgM bereits in der Einzel-Administration MPA ab einer Konzentration von 100ng/ml einen Wert von annähernd Null auf (Abb. 12 B). Da unter der isolierten Administration von 1ng/ml Everolimus fünf von sechs Proben einen Immunglobulin M-Wert von Null aufzeigten, liegt die Vermutung nahe, dass diese eine Substanz auch in der Kombination die IgM-Produktion komplett unterdrücken könnte (Abb. 12 C).

Sotrastaurin/ MPA, Sotrastaurin/ Everolimus und die Dreier-Kombination hemmten die Immunglobulinproduktion verglichen mit der reinen Sotrastaurin-Administration signifikant (Abb. 13 A+B, Abb. 14). Unsere Ergebnisse deuten an, dass die hinzugefügten Substanzen MPA und Everolimus die Effekte auslösten und die Sotrastaurin-Wirkung überdeckten. Ein additiver Effekt zwischen MPA und Everolimus war letztlich nicht nachweisbar, da beide immunsuppressive Substanzen für sich allein bereits die IgM-Produktion gegen einen Wert von Null drückten (Abb. 12 B+C). Der Einfluss von MPA und Everolimus auf die Immunglobulinproduktion war so ausgeprägt, dass eine Beurteilung von Wechselwirkungen in diesen Experimenten nicht möglich war. In keiner B-Zell-Kultur, in der die kombinierten Administrationen mit Beteiligung von MPA, Everolimus oder beiden verglichen wurden, war ein signifikanter Unterschied nachweisbar (Abb. 13 A-C, Abb. 14).

Jedoch ist zu beachten, dass die verwendeten Konzentrationen und Kombinationen nicht zwingend eine Auswirkung auf die Immunglobulinproduktion haben müssen. Der antiproliferative Effekt der IS und die damit verbundene reduzierte Zellzahl kann die Ursache für die geringe Menge an gemessenem Immunglobulin sein. Welchen Anteil dieser Effekt an der Gesamtwirkung auf die Immunglobulinproduktion hat, müssen weitere Studien zeigen.

Zusammenfassend betrachtet ist die Wirkung der Immunsuppressiva-Administration auf die IgM-Produktion etwas ausgeprägter als auf die IgG-Produktion. Eine Beteiligung von MPA und Everolimus in der kombinierten Administration beeinflusste die B-Lymphozyten in dem Maße, dass eine Wirkung der Kombinationen an sich auf die Immunglobulinproduktion schwer festzustellen war. Daher müssen zukünftige Studien diesen Sachverhalt unter einer geringen Konzentration aufarbeiten.

5.4 Beeinflussung der Apoptose humaner B-Lymphozyten durch immunsuppressive Substanzen *in vitro*

In der klinischen Anwendung ist man darauf bedacht, dass eine immunsuppressive Therapie zur Unterdrückung der Immunantwort führt, die jedoch nicht mit dem Tod der Immunzellen einhergeht. Daher ist es wichtig, Immunsuppressiva zu entwickeln, die diesen Anforderungen entsprechen.

Die dritte Fragestellung dieser Arbeit bezog sich auf den Einfluss der standardisierten und der neuen Immunsuppressiva auf das Apoptoseverhalten humaner B-Lymphozyten. Da die Induktion von apoptotischen Vorgängen durchaus eine Erklärung für die Inhibierung der Proliferation sein kann, liegt ein großes Interesse auf diesem Zusammenhang. In unserer vorliegenden Studie wurden die B-Lymphozyten mit aCD-40, CPG-ODN2006 und IL-4 stimuliert und mit dem PKC-Hemmer Sotrastaurin, dem Proliferationshemmer MPA und dem mTOR-Hemmer Everolimus behandelt. Durch Färbung mit Annexin V-FITC/ PI stellten wir mittels Durchflusszytometrie früh- und spät-apoptotische sowie tote B-Lymphozyten vitalen B-Lymphozyten gegenüber. Die Verteilung in den vier Stadien des Apoptoseprozesses blieb im Vergleich zur Lösemittelkontrolle nahezu unverändert (Abb. 16-18).

Wir beobachteten in einem einzigen Fall bei 50nM Sotrastaurin, dass die Behandlung der Zellen eine leichte aber signifikante Verminderung der Anteile vitaler B-Lymphozyten bewirkte. Eine Tendenz in die gleiche Richtung zeigte eine Betrachtung der Daten von 500nM Sotrastaurin (Abb. 16 A). Durch Steigerung der Probandenzahl in dieser Studie hätte möglicherweise die Tendenz zu einer Signifikanz werden können. In der Gegenkontrolle ergab die Analyse der Anteile früh- und spät-apoptotischer B-Lymphozyten keine signifikante Änderung (Abb. 16 B+C). Wir vermuteten zudem auf Grund der sehr geringen Zellzahlen in der Analyse der toten B-Lymphozyten, dass die signifikanten Abweichungen in allen

untersuchten Konzentrationen Sotrastaurin rein rechnerisch bedingt waren (Abb. 16 D). In allen untersuchten Konzentrationen MPA und Everolimus blieb ein signifikanter Einfluss auf den Anteil vitaler und spät-apoptotischer B-Lymphozyten aus (Abb. 17 A+C, Abb. 18 A+C). Weiterhin zeigten sich im früh-apoptotischen und toten Stadium erneut rechnerisch signifikante Abweichungen (Abb. 17 B+D, Abb. 18 B+D). Diese stuften wir angesichts des geringen Anteils an Zellen als vernachlässigbar ein.

Eine ähnliche Studie von Heidt et al. befasste sich mit der Untersuchung humaner B-Lymphozyten und deren Verhalten in Bezug auf Proliferation, Immunglobulinproduktion und Apoptose unter Immunsuppression (115). Der Versuchsaufbau beider Studien war ähnlich, was den Vergleich gut ermöglichte. Die Forschungsgruppe verglich die Effekte der Calcineurin-Inhibitoren Tacrolimus und Cyclosporin A, des Proliferationshemmers MPA und des mTOR-Hemmers Sirolimus. Heidt et al. zeigten in ihrem Experiment, dass die Gabe von verschiedenen Immunsuppressiva den Apoptoseprozess induziert (115). Die Administration von je zwei Konzentrationen MPA oder Sirolimus hatte nach 96h einen deutlichen Einfluss auf den Eintritt der B-Lymphozyten in die früh- und spät-apoptotische Phase *in vitro*, wodurch der Anteil an vitalen B-Lymphozyten erheblich reduziert wurde. Zudem erhöhte die höhere der beiden untersuchten Konzentrationen den Anteil an spät-apoptotischen B-Lymphozyten noch einmal.

Unsere Forschungsgruppe beobachtete nach Administration der Immunsuppressiva einen großen Anteil an vitalen und spät-apoptotischen B-Lymphozyten, ohne jedoch signifikante Änderungen auf Grund von Konzentrationssteigerungen zu verzeichnen (Abb. 17 A+C, Abb. 18 A+C).

Wir vermuten, dass die Unterschiede in den Studien-Ergebnissen auf der unterschiedlichen Auswahl der Immunsuppressiva einer Wirkstoffgruppe basieren könnten. Das Sirolimus-Derivat Everolimus weist gegenüber seiner Grundsubstanz eine geringe Modifikation in der chemischen Struktur auf. Durch die Hydroxyethyl-Gruppe an Position 40 des Sirolimus-Grundmoleküls hat Everolimus bessere hydrophile Eigenschaften (114, 120-121). Weiterhin wirkte sich wahrscheinlich die unterschiedliche Art der Stimulation auf die Verfassung der Zellpopulationen aus. Während Heidt et al. die Zellen mit α -CD40 und ODN2006-CpG stimulierten, fügten wir dem Medium darüber hinaus IL-4 zu, welches die B-Zell-Aktivierung und deren Überleben positiv beeinflusst. Verglichen mit den Ergebnissen der anderen

Forschungsgruppe kann die Ursache für die ermittelte Differenz der Anteile vitaler B-Lymphozyten das fehlende IL-4 im Medium sein. Dieses sorgt in vielen Studien für ein längeres Überleben der B-Lymphozyten (122-123).

Böhler et al. untersuchten die Wirkung des Immunmodulators FTY720 auf das Apoptoseverhalten von Lymphozyten *in vitro*. Sie fanden heraus, dass ab einer klinisch irrelevanten Dosis von 10µM FTY720 nach vier Stunden Inkubation eine Apoptoserate von ca. 20% zu verzeichnen war. Weitere Untersuchungen mit geringeren Dosen FTY720 bewirkten keine nachweisbare Apoptoseinduktion seitens der Lymphozyten (96). Végso et al. analysierten den Einfluss von MPA auf Lymphomzellen und Myelomzellen in Bezug auf ihr Apoptoseverhalten *in vitro*. Nach 72h Inkubation mit MPA in Konzentrationen zwischen 1-5µM wiesen die Kulturen eine deutlich erhöhte Zahl an apoptotischen Zellen auf. Die Effekte waren dosisabhängig (116). Majewski et al. untersuchten B-Zell-Linien hinsichtlich der Apoptoseinduktion verursacht durch Everolimus *in vitro*. Die Studie ergab eine gesteigerte Apoptoserate nach bis zu 48 Stunden Administration des Immunsuppressivums um maximal 24% (117). Diese Studien zeigen eine nicht zu vernachlässigende Wirkung von immunsuppressiven Substanzen auf das Apoptoseverhalten von humanen Zellen. Auf Grund unterschiedlicher Versuchsaufbauten sind diese nur teilweise mit unseren Experimenten vergleichbar.

Wir analysierten weiterhin die Wirkung kombinierter Immunsuppressiva und fanden im Gegensatz zur isolierten Immunsuppressiva-Administration signifikante Unterschiede im Apoptoseverhalten humaner B-Lymphozyten. In den Analysen der Kombinationsversuche gingen wir dazu über, die früh- und spät-apoptotischen sowie toten B-Lymphozyten zusammenzufassen und den vitalen B-Lymphozyten gegenüberzustellen. Hier zeigte die Kombination Sotrastaurin/ MPA gegenüber der Kontrolllösung einen signifikant geringeren Anteil an vitalen B-Lymphozyten (Abb. 19 A). Dieses Ergebnis bestätigte die Betrachtung der Gegenkontrolle. Der Anteil der zusammengefassten Gruppe früh-, spät-apoptotischer und toter B-Lymphozyten war signifikant erhöht (Abb. 19 B). Von welchem der zwei Stadien des Apoptoseprozesses oder dem Anteil der toten B-Lymphozyten die Anteilsverschiebungen ausging, konnte unsere Analyse nicht herausstellen. Da die immunsuppressiven Substanzen Sotrastaurin und MPA in den verwendeten Konzentrationen einzeln keine signifikante Wirkung erzielt hatten, vermuteten wir einen additiven Effekt zwischen diesen beiden IS, der zu einer Verringerung der Anteils vitaler B-Lymphozyten führte (Abb. 16, Abb. 17).

Eine Behandlung mit Sotrastaurin/ MPA oder mit MPA/ Everolimus bewirkte einen signifikanten Einfluss auf das Eintreten in den Apoptoseprozess, verglichen mit der isolierten MPA-Gabe (Abb. 19 A+B). Wir vermuteten, dass die Wechselwirkungen der Substanzen diese Effekte hervorriefen und für die Steigerung der Anteile früh-, spät-apoptotischer und toter B-Lymphozyten im Gegensatz zur Einzelbehandlung mit MPA verantwortlich waren.

Die vergleichende Analyse der weiteren Immunsuppressiva-Kombinationen wies auf keine Administration hin, die auf Grund potentieller additiver Effekte in den B-Lymphozyten die Apoptose auslöste. Aus den Untersuchungen zum Apoptoseverhalten lässt sich schließen, dass die adäquate Stimulation von B-Lymphozyten und das Nährmedium wichtig für deren Überleben sind und dass eine Immunsuppression ab einer bestimmten Konzentration oder in einer bestimmten Kombination zum Zelltod führen kann. Entsprechende Literatur, die sich mit diesem Sachverhalt auseinandersetzt, ist zurzeit nicht zu finden. In der klinischen Anwendung müssen solche medikamentösen Wechselwirkungen ausgeschlossen werden, um die B-Lymphozyten nicht zu schädigen. Für eine gezielte kombinierte immunsuppressive Therapie ist das Wissen über interne Wechselwirkungen essentiell.

5.5 Untersuchungen von humanen B-Lymphozyten mit Sotrastaurin, MPA und Everolimus *in vitro*

In Kombination mit den anderen Immunsuppressiva und in der Einzelbetrachtung waren die Ergebnisse für Sotrastaurin überraschend. Vor allem in der kombinierten Anwendung mit MPA und Everolimus rief Sotrastaurin einen unerwarteten Effekt hervor. Die Beeinflussung der Proliferation, der CD80-Expimierung sowie der Immunglobulinproduktion durch Sotrastaurin in Hinblick auf eine klinische Anwendung bei humoraler Transplantatabstoßung bedarf somit weiterführender Analysen (Abb. 3 A, Abb. 6 A, Abb. 9 A, Abb. 12 A). Die ausbleibende B-Lymphozyten-Hemmung durch Sotrastaurin kann pharmakodynamischen Ursprungs sein. Sotrastaurin hemmt selektiv drei Isotypen der PKC (109). Ein möglicher Erklärungsansatz für die ausbleibende Hemmung wäre die Abwicklung der B-Zell-vermittelten Immunantwort über einen weiteren Isotypen der PKC. Weiterhin können Kompensationsmechanismen, die einen alternativen Aktivierungsweg eröffnen, die Zellabläufe aufrechterhalten. In diesem Fall würde weder eine Steigerung der Konzentration, noch eine Umstellung innerhalb der Kombination einen Effekt auf die B-Lymphozyten ausüben. Diese mögliche Umgehung des blockierten PKC-abhängigen Aktivierungsweges sollte Gegenstand von Folgestudien sein.

Die Ergebnisse unserer Untersuchung belegen die Wirksamkeit von MPA und Everolimus auf die Funktion humaner B-Lymphozyten. Wir zeigten den hemmenden Einfluss dieser Substanzen auf die Proliferation sowie die IgG- und IgM-Produktion humaner B-Lymphozyten (Abb. 3 B+C, Abb. 9 B+C, Abb. 12 B+C). Weiterhin konnten wir eine Verminderung der CD80-Exprimierung auf humanen B-Lymphozyten durch MPA und Everolimus nachweisen (Abb. 6 B+C).

Unsere Ergebnisse beziehen sich auf *in vitro* Untersuchungen, die stets das Problem aufwerfen, dass vorliegende Daten auf artifiziellen Kulturbedingungen beruhen. Daher gäbe eine Studie mit Tiermodellen die Möglichkeit, *in vivo* Ergebnisse zur Wirkung von Sotrastaurin bei einer humoralen Transplantatabstoßung zu erhalten. Darauf basierend könnten Aussagen zur klinischen Anwendung bei diesem Abstoßungstyp getroffen werden.

5.6 Ausblick auf eine Calcineurininhibitor-freie immunsuppressive Therapie

CNIs sind die Immunsuppressiva der Wahl, um eine T-Zell-vermittelte Transplantatabstoßung zu behandeln. Trotzdem ist es eine stete Bemühung der Forschung, CNI-freie Immunsuppressiva-Kombinationen zur Verhinderung der zellulären und humoralen Transplantatabstoßung zu finden, da eine CNI-basierte Immunsuppression zur Schädigung der Nieren, der Leber und des Gastrointestinaltraktes führt und das allgemeine Krebsrisiko deutlich erhöht (52). Die in unserer Studie untersuchten Immunsuppressiva gehören alle in Wirkklassen, die nicht Calcineurin als Ziel ihrer suppressiven Wirkung haben. Sotrastaurin hemmt die PKC, MPA wirkt auf die Purinsynthese und Everolimus blockiert das mTOR.

Friman et al. publizierten Ergebnisse einer Phase-II-Studie nach erfolgter Nierentransplantation, die eine CNI-freie Therapie aus MPA und Sotrastaurin einer CNI-basierten Therapie aus Tacrolimus und Sotrastaurin gegenüberstellte (94). Die Phase-II-Studie musste auf Grund hoher Abstoßungszahlen in der Sotrastaurin/ MPA-Gruppe frühzeitig beendet werden. Weiterhin beschrieben Budde et al. eine Studie, in der Patienten unter anfänglicher „low-tacrolimus“-Administration kombiniert mit Sotrastaurin nach drei Monaten einer CNI-freien Medikation mit MPA als Tacrolimus-Ersatz unterzogen wurden (93). Die Phase-II-Studie musste ebenfalls auf Grund zu hoher Abstoßungszahlen nach Umstellung auf CNI-freie Medikation abgebrochen werden (93). Damit war eine wirkungsvolle Immunsuppression mit Sotrastaurin nach Organtransplantation ohne CNI-Beteiligung klinisch

nicht nachweisbar. In den Phase-II-Studien wurde weiterhin die Effektivität und Verträglichkeit von Sotrastaurin getestet. So wurden in einer weiteren Phase-II-Studie verschiedene Dosen Sotrastaurin mit Tacrolimus kombiniert und der Kontrolle, bestehend aus Tacrolimus und MPA, gegenübergestellt (124). In diesen Untersuchungen sollte herausgefunden werden, ob der PKC-Hemmer wirkungsvoller Bestandteil einer immunsuppressiven Therapie sein kann. Mit Schreiben vom 27. März 2012 teilt die Firma Novartis mit, dass eine Weiterentwicklung des Immunsuppressivums Sotrastaurin auf Grund von *in vivo* aufgetretenden kardiovaskulären Beschwerden vorerst gestoppt wird. Die Ergebnisse unserer Untersuchungen und die Daten der erwähnten Phase-II-Studien wurden durch diese Entscheidung bestätigt, da sie bereits den Anspruch von Sotrastaurin, ein wirkungsvolles Immunsuppressivum zu sein, in Frage stellten.

Die Mycophenolsäure ist seit vielen Jahren ein verlässliches Immunsuppressivum. Sie hemmt selektiv, potent und reversibel die IMPDH. MPA wirkt antiproliferativ auf T- wie auch auf B-Zellen und supprimiert ebenfalls die Immunglobulinproduktion. Als Bestandteil vieler standardisierter immunsuppressiver Therapien nach Nierentransplantation haben unzählige Studien die Effektivität und Wirksamkeit unter Beweis gestellt. MPA wird heute vor allem mit Cyclosporin A und Corticosteroiden kombiniert. Sie löste den Proliferationshemmer Azathioprin ab, der bis dahin die erste Wahl in der Kombinationstherapie war (125-126). Dennoch löst auch dieses Immunsuppressivum Nebenwirkungen aus, die eine unbedenkliche Anwendung verhindern. Die Proliferationshemmung beschränkt sich nicht nur auf Zellen des Immunsystems. Anämie und Thrombozytopenie sind Folge von Zellteilungsstörungen im Knochenmark, die auch von MPA ausgelöst werden. Ebenso führt dieses Medikament zu Übelkeit, Durchfall und als Konsequenz der geschwächten Immunabwehr häufig zu Infekten (33). Vor allem die gastrointestinalen Beschwerden zehren stark an der Patientencompliance, sodass Alternativpräparate gesucht werden müssen.

Im Falle einer akut auftretenden humoralen Rejektion wird die sogenannte klinische „rescue therapy“, bestehend aus Tacrolimus und MPA, angewendet (127). Die Ergebnisse bezüglich der Organfunktion und des Transplantatüberlebens nach Behandlung waren kurzfristig zufriedenstellend. Ein langfristiger Therapieerfolg war jedoch nicht auszumachen. Die Wirkung einer CNI-Monotherapie auf die humanen B-Lymphozyten ist nicht belegt. Neue Studien an primären humanen B-Lymphozyten lassen vermuten, dass hauptsächlich MPA für den immunsuppressiven Effekt verantwortlich ist (115, 128). Die Therapie mit Tacrolimus

und MPA ist laut Studien nicht die endgültige Methode zur Verhinderung einer Antikörper-vermittelten Rejektion nach Transplantation, im Gegensatz zur Behandlung mit dem Proteasom-Inhibitor Bortezomib und dem monoklonalen Antikörper Rituximab, welche in Studien vielversprechende Ansätze zeigten (127, 129-132).

Die Wirkung von Everolimus besteht darin, die Leistung der Proteinsynthese zu mindern, den Zellzyklus in einer bestimmten Phase zu arretieren und die Angiogenese zu blockieren. Diese antiproliferative Eigenschaft führt zu dem positiven Nebeneffekt, zusätzlich auf das Krebswachstum Einfluss zu nehmen (133-135). Jedoch ist jene Funktion auch für Wundheilungsstörungen verantwortlich, weshalb Everolimus in einer initialen post-transplantären Administration kaum Verwendung findet. Nach dieser initialen Phase ist eine Immunsuppression zusammen mit einem CNI, verglichen mit der Standardtherapie CNI und MPA, möglich (114). Ob diese Kombination eine humorale Transplantatabstoßung verhindern kann, ist weiterhin unbekannt. Neben den auftretenden Wundheilungsstörungen sind Nebenwirkungen wie Stomatitis, Infektionen, Pneumonitis, Hyperlipidämie und Hyperglykämie bekannt (133). Trotz der mit einer Behandlung verbundenen Nebenwirkungen, wie Anämien, Leukopenien und Thrombozytopenien, erwartet man einen langfristigen Therapieerfolg mit Everolimus (63). Jedoch haben neuere Studien bei diesem Krankheitsbild immer noch eine Überlegenheit der Standardtherapie aus Tacrolimus und Mycophenolsäure gegenüber Everolimus gezeigt (136).

5.7 Ausblick auf zukünftige Studien

Ein weiterführender Schritt wäre die Untersuchung der T-Zell-Hilfe für die B-Zell-induzierte Immunantwort. Um diese Art der Zellinteraktionen zu erforschen, verwendet man Kokulturen von autologen T- und B-Lymphozyten. Auch die Messung und Analyse von sezernierten Zytokinen wie Interleukin-6, Interleukin-10 oder TNF α sind interessante Forschungsaspekte, die zur Abrundung der Studie in unserer Forschungsgruppe untersucht werden. Eine Organabstoßung ist Folge von Vorgängen eines komplexen Systems aus Signalkaskaden im menschlichen Körper. Wir können mit *in vitro* Studien nur versuchen, einige der Faktoren dieses Systems zu simulieren, um eine realitätsnahe Umgebung zu schaffen.

Als Kontrolle des erfolgreichen Einsatzes zur Behandlung von chronisch humoralen Transplantatabstoßungen könnten Protokollbiopsien in langfristig angelegten Studien dienen. Da Biopsien eine invasive Art der Probenentnahme darstellen, wären regelmäßige

Blutabnahmen eine weniger invasive Alternative. Denkbar wäre auch eine Kombination beider Verfahren. Für die Biopsieentnahme wären größere Intervallabstände und für die Blutuntersuchungen kleinere Intervalle geeignet. Mit Hilfe einer Verlaufsdokumentation gewänne man Aufschluss über die Wirkung der Substanzen über einen längeren Zeitraum. Zu untersuchende Marken wären die in dieser Arbeit beschriebenen B-Lymphozyten-Funktionen in Bezug auf Proliferation, Immunglobulinproduktion oder CD80-Exprimierung geeignet. Weiterhin gäbe die Betrachtung der Marker BAFF und APRIL Auskunft über die spezifische Hemmung der B-Lymphozyten. BAFF ist ein Zytokin, das in der B-Zell-Entwicklung und -Differenzierung eine entscheidende Rolle spielt. Der Nachweis des reduzierten Vorliegens in B-Zell-Kulturen, könnte ein Hinweis auf eine gestörte B-Zell-Entwicklung sein (137-138). A proliferation-inducing ligand (APRIL) ist ein Protein, das für die B-Zell-Entwicklung und das Langzeitüberleben von Plasmazellen im Knochenmark von Bedeutung ist. Zudem ist APRIL Teil einer Aktivierungskaskade, die das mTOR phosphoryliert und dadurch Einfluss auf die B-Zell-Proliferation nimmt. Ein verringertes Vorliegen von APRIL in B-Lymphozyten-Kulturen wäre Anzeichen einer vorliegenden Funktionsstörung der B-Lymphozyten (139-141).

Der stete Anlass zur weiteren Forschung ist die Reduzierung von auftretenden Nebenwirkungen unter Immunsuppression. Häufig werden nach Transplantationen Antikörper verwendet, um eine akute Abstoßungsreaktion zu unterdrücken. Die Antikörper-Therapie ist mit hohen Kosten verbunden, was ebenfalls ein Anreiz ist, Alternativen ausfindig zu machen. Bei dieser Suche wird heute mehr denn je darauf geachtet, selektive immunsuppressive Substanzen zu erzeugen, die auf ausgewählte Wirkmechanismen zielen. Von dieser Spezialisierung verspricht man sich ein reduziertes Nebenwirkungsspektrum. Ein übergeordnetes Ziel ist es, mit diesen neuen selektiven Immunsuppressiva, angewendet in einer personalisierten immunsuppressiven Therapie, die humorale Transplantatabstoßung zu unterbinden.

5.8 Limitationen der Studie

Als Limitation unserer Studie müssen folgende Punkte genannt werden:

Die Stimulation der B-Lymphozyten-Kulturen mit immunsuppressiven Substanzen unter Laborbedingungen ist artifiziell und entspricht den Bedingungen *in vivo* nur näherungsweise, dafür sind die Experimente auf Grund standardisierter Versuchsdurchführungen reproduzierbar.

Wir untersuchten in dieser Studie ein relativ homogenes Probandenkollektiv. Dieses bestand größtenteils aus jungen Menschen. Wir wissen nicht, in wie weit der subjektiv als gut eingestufte gesundheitlichen Zustand der Probanden zum Zeitpunkt der Blutentnahme und Unterschiede im Alter, die Funktionstüchtigkeit der Blutzellen beeinflussen. Daher sollten in Zukunft Studien an einem heterogeneren Probandenkollektiv durchgeführt werden. Um repräsentativere Aussagen treffen zu können, wäre eine größere Anzahl an Probanden erforderlich. Des Weiteren sollten weitere Marker der Abstoßungsreaktion sowie funktionelle Daten experimentell generiert werden, um einer Situation, die nahe der im menschlichen Organismus ist, gerecht zu werden.

6. Zusammenfassung

Die Nierentransplantation stellt eine etablierte Behandlungsmethode der terminalen Niereninsuffizienz dar. Auf Grund von Gewebeunverträglichkeiten zwischen Spender und Empfänger ist eine lebenslange Immunsuppression zur Verhinderung einer zellulären oder humoralen Abstoßung des Transplantats erforderlich. Die medikamentöse Therapie ist Ursache vieler Nebenwirkungen, die den Patienten und folglich dessen Compliance belasten können. Die zellulär vermittelte Organabstoßung kann heute meist gut behandelt werden. Hingegen ist der Aspekt der humoral vermittelten Abstoßungsreaktion bislang vernachlässigt worden und erst in den vergangenen Jahren zu einem Forschungsschwerpunkt der Transplantationsmedizin aufgestiegen. Auf Grund einer eingeschränkten Therapiemöglichkeit dieses Rejektionstyps ist die Entwicklung und Erforschung neuer immunsuppressiver Substanzen, welche die Aktivierung der B-Lymphozyten beeinflussen und beispielsweise die Bildung Spender-spezifischer Antikörper unterdrücken, ein wichtiges Ziel. Der Einfluss, der derzeit in der Nierentransplantation verwendeten Immunsuppressiva zur Behandlung zellulär vermittelter Abstoßungen auf humorale Abstoßungsprozesse ist bisher ebenfalls nicht abschließend untersucht worden.

In der vorliegenden Arbeit wurde der Einfluss der immunsuppressiven Substanzen Sotrastaurin, Mycophenolsäure (MPA) und Everolimus auf die Funktionen humaner B-Lymphozyten *in vitro* untersucht. Die einzelnen Immunsuppressiva und ihre Kombinationen wirkten sich auf die zellulären Prozesse der Proliferation, CD80-Exprimierung, Produktion der Immunglobuline G und M sowie dem Apoptoseverhalten unterschiedlich aus. Der PKC-Hemmer zeigte keinen Einfluss auf die Exprimierung von CD80 auf der Oberfläche der B-Lymphozyten und darüber hinaus keine hemmende Wirkung auf die Proliferation oder die Immunglobulinproduktion der B-Lymphozyten. Nur die höchste untersuchte Konzentration Sotrastaurin induzierte die Apoptose der B-Lymphozyten. Im Gegensatz dazu hatte die Behandlung mit den Immunsuppressiva MPA und Everolimus keine Apoptoseinduktion zur Folge. Sie verursachten beide eine Reduktion der CD80-Exprimierung auf den humanen B-Lymphozyten. Weiterhin hemmten sie die Proliferation der B-Lymphozyten und die Produktion der Immunglobuline G und M. Die Kombination der Substanzen führte teilweise zu einer Wirkungssteigerung im Vergleich zur einzelnen Gabe. MPA und Everolimus bestätigten ihre weitgehend bekannten potenten immunsuppressiven Eigenschaften, anders als Sotrastaurin, welches nur einen geringen oder kaum messbaren Einfluss zeigte.

7. Schriftenverzeichnis

1. Berg Fvd. *Angewandte Physiologie 2*: Thieme; 2005 5. Oktober 2005. 608 p.
2. Carey RM. Overview of endocrine systems in primary hypertension. *Endocrinol Metab Clin North Am.* 2011;40(2):265-77, vii. Epub 2011/05/14. doi: S0889-8529(11)00004-1 [pii]
10.1016/j.ecl.2011.01.003. PubMed PMID: 21565666.
3. Atlas SA. The renin-angiotensin aldosterone system: pathophysiological role and pharmacologic inhibition. *J Manag Care Pharm.* 2007;13(8 Suppl B):9-20. PubMed PMID: 17970613.
4. Brandi L. 1alpha(OH)D3 One-alpha-hydroxy-cholecalciferol--an active vitamin D analog. Clinical studies on prophylaxis and treatment of secondary hyperparathyroidism in uremic patients on chronic dialysis. *Dan Med Bull.* 2008;55(4):186-210. PubMed PMID: 19232159.
5. Mehdi U, Toto RD. Anemia, diabetes, and chronic kidney disease. *Diabetes Care.* 2009;32(7):1320-6. PubMed PMID: 19564475.
6. Danovitch GM. *Handbook of Kidney Transplantation*. 5. ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, Wolters Kluwer; 2009 November 2009.
7. Lopez-Novoa JM, Rodriguez-Pena AB, Ortiz A, et al. Etiopathology of chronic tubular, glomerular and renovascular nephropathies: Clinical implications. *J Transl Med.* 2011;9(13):13. PubMed PMID: 21251296.
8. Colvin RB. Antibody-mediated renal allograft rejection: diagnosis and pathogenesis. *J Am Soc Nephrol.* 2007;18(4):1046-56. PubMed PMID: 17360947.
9. Herold DG. *Innere Medizin 2007*: Gerd Herold; 2006.
10. Frei U S-HH-J. *Nierenersatztherapie in Deutschland - Bericht über Dialysebehandlung und Nierentransplantation in Deutschland*. gGmbH QN, editor. Berlin: Quasi Niere gGmbH; 2006-2007 2008.
11. Colvin RB. Pathology of chronic humoral rejection. *Contrib Nephrol.* 2009;162:75-86. PubMed PMID: 19001815.
12. Wahba IM, Mak RH. Obesity and obesity-initiated metabolic syndrome: mechanistic links to chronic kidney disease. *Clin J Am Soc Nephrol.* 2007;2(3):550-62. PubMed PMID: 17699463.
13. Niu SF, Li IC. Quality of life of patients having renal replacement therapy. *J Adv Nurs.* 2005;51(1):15-21. PubMed PMID: 15941456.
14. Stel VS, Kramer A, Zoccali C, et al. The 2007 ERA-EDTA Registry Annual Report-a Precip. *NDT Plus.* 2009;2(6):514-21. PubMed PMID: 19936072.
15. Collins AJ, Foley RN, Herzog C, et al. Excerpts from the US Renal Data System 2009 Annual Data Report. *Am J Kidney Dis.* 2010;55(1 Suppl 1):S1-420, A6-7. PubMed PMID: 20082919.
16. Arie Oosterlee AR. *Annual Report 2010*. Leiden: Eurotransplant International Foundation, 2010.
17. Halloran PF. Immunosuppressive drugs for kidney transplantation. *N Engl J Med.* 2004;351(26):2715-29. PubMed PMID: 15616206.
18. Knoll G. Trends in kidney transplantation over the past decade. *Drugs.* 2008;68 Suppl 1:3-10. PubMed PMID: 18442296.
19. Baid-Agrawal S, Frei UA. Living donor renal transplantation: recent developments and perspectives. *Nat Clin Pract Nephrol.* 2007;3(1):31-41. PubMed PMID: 17183260.
20. Janeway CA TP, Walport M, Shlomchik M. *Immunobiology - The immune system in health and disease*. New York: Garland Publishing; 2001. 1-732 p.

21. Neumayer H-HB, Klemens; Waiser, Johannes, et al. *Neue Medikamente in der Transplantationsmedizin*. 2 ed. Bremen: UNI-MED; 2008 2008. 157 p.
22. Wang-Rodriguez J, Rearden A. Effect of crossmatching on outcome in organ transplantation. *Crit Rev Clin Lab Sci*. 1995;32(4):345-76. PubMed PMID: 7576157.
23. Hill GS, Nochy D, Loupy A. Accelerated arteriosclerosis: a form of transplant arteriopathy. *Curr Opin Organ Transplant*. 2010;15(1):11-5. PubMed PMID: 19898238.
24. Gloor JM, Sethi S, Stegall MD, et al. Transplant glomerulopathy: subclinical incidence and association with alloantibody. *Am J Transplant*. 2007;7(9):2124-32. PubMed PMID: 17608832.
25. Sis B, Mengel M, Haas M, et al. Banff '09 meeting report: antibody mediated graft deterioration and implementation of Banff working groups. *Am J Transplant*. 2010;10(3):464-71. PubMed PMID: 20121738.
26. Uslu A, Nart A. Treatment of first acute rejection episode: systematic review of level I evidence. *Transplant Proc*. 2011;43(3):841-6. PubMed PMID: 21486611.
27. Solini S, Aiello S, Cassis P, et al. Prolonged cold ischemia accelerates cellular and humoral chronic rejection in a rat model of kidney allotransplantation. *Transpl Int*. 2012;25(3):347-56. PubMed PMID: 22239163.
28. Marrack P, Kappler J. The antigen-specific, major histocompatibility complex-restricted receptor on T cells. *Adv Immunol*. 1986;38:1-30. PubMed PMID: 3083653.
29. Krensky AM, Weiss A, Crabtree G, et al. T-lymphocyte-antigen interactions in transplant rejection. *N Engl J Med*. 1990;322(8):510-7. PubMed PMID: 2405272.
30. Briscoe DM, Sayegh MH. A rendezvous before rejection: where do T cells meet transplant antigens? *Nat Med*. 2002;8(3):220-2. PubMed PMID: 11875489.
31. Delves PJ, Roitt IM. The immune system. First of two parts. *N Engl J Med*. 2000;343(1):37-49. PubMed PMID: 10882768.
32. Delves PJ, Roitt IM. The immune system. Second of two parts. *N Engl J Med*. 2000;343(2):108-17. PubMed PMID: 10891520.
33. Villarreal MC, Hidalgo M, Jimeno A. Mycophenolate mofetil: An update. *Drugs Today (Barc)*. 2009;45(7):521-32. PubMed PMID: 19834629.
34. Rostaing L, Kamar N. mTOR inhibitor/proliferation signal inhibitors: entering or leaving the field? *J Nephrol*. 2010;23(2):133-42. PubMed PMID: 20155724.
35. Slavik JM, Hutchcroft JE, Bierer BE. CD28/CTLA-4 and CD80/CD86 families: signaling and function. *Immunol Res*. 1999;19(1):1-24. PubMed PMID: 10374692.
36. Carreno BM, Collins M. The B7 family of ligands and its receptors: new pathways for costimulation and inhibition of immune responses. *Annu Rev Immunol*. 2002;20:29-53. PubMed PMID: 11861596.
37. Greenwald RJ, Freeman GJ, Sharpe AH. The B7 family revisited. *Annu Rev Immunol*. 2005;23:515-48. PubMed PMID: 15771580.
38. Mollnes TE, Kirschfink M. Complement analysis in clinic and research. *Adv Exp Med Biol*. 2006;586:361-80. PubMed PMID: 16893084.
39. Zwirner NW, Domaica CI. Cytokine regulation of natural killer cell effector functions. *Biofactors*. 2010;36(4):274-88. PubMed PMID: 20623510.
40. Dragun D, Muller DN, Brasen JH, et al. Angiotensin II type 1-receptor activating antibodies in renal-allograft rejection. *N Engl J Med*. 2005;352(6):558-69. PubMed PMID: 15703421.
41. Truong LD, Barrios R, Adroge HE, et al. Acute antibody-mediated rejection of renal transplant: pathogenetic and diagnostic considerations. *Arch Pathol Lab Med*. 2007;131(8):1200-8. PubMed PMID: 17683182.
42. Solez K, Colvin RB, Racusen LC, et al. Banff '05 Meeting Report: differential diagnosis of chronic allograft injury and elimination of chronic allograft nephropathy ('CAN'). *Am J Transplant*. 2007;7(3):518-26. PubMed PMID: 17352710.

43. Bohmig GA, Exner M, Habicht A, et al. Capillary C4d deposition in kidney allografts: a specific marker of alloantibody-dependent graft injury. *J Am Soc Nephrol.* 2002;13(4):1091-9. PubMed PMID: 11912271.
44. Zarkhin V, Kambham N, Li L, et al. Characterization of intra-graft B cells during renal allograft rejection. *Kidney Int.* 2008;74(5):664-73. PubMed PMID: 18547992.
45. Sis B, Halloran PF. Endothelial transcripts uncover a previously unknown phenotype: C4d-negative antibody-mediated rejection. *Curr Opin Organ Transplant.* 2010;15(1):42-8. PubMed PMID: 20009933.
46. Xu H, He X, Sun J, et al. The expression of B-cell activating factor belonging to tumor necrosis factor superfamily (BAFF) significantly correlated with C4D in kidney allograft rejection. *Transplant Proc.* 2009;41(1):112-6. PubMed PMID: 19249491.
47. Fotheringham J, Angel CA, McKane W. Transplant glomerulopathy: morphology, associations and mechanism. *Nephron Clin Pract.* 2009;113(1):c1-7; discussion c. PubMed PMID: 19590229.
48. Vincenti F, Kirk AD. What's next in the pipeline. *Am J Transplant.* 2008;8(10):1972-81. PubMed PMID: 18828764.
49. Carpenter CB ME, Sayegh MH. Transplantation in the treatment of renal failure. In: Kasper DL FA, Longo DL, Braunwald E, Hauser SL, Jameson JL, editor. *Harrison's principles of internal medicine.* New York: Mc Graw Hill; 2005. p. 1668-74.
50. Budde K, Giessing M, Liefeldt L, et al. [Modern immunosuppression following renal transplantation. Standard or tailor made?]. *Urologe A.* 2006;45(1):9-17. PubMed PMID: 16328215.
51. Katzung BG LD, Akporiaye ET, Hersh EM. *Basic & Clinical Pharmacology.* 8 ed. New York: Lange Medical Books/Mc Graw Hill; 2001.
52. Alberu J. Clinical insights for cancer outcomes in renal transplant patients. *Transplant Proc.* 2010;42(9 Suppl):S36-40. PubMed PMID: 21095450.
53. Webster AC, Wong G, Craig JC, et al. Managing cancer risk and decision making after kidney transplantation. *Am J Transplant.* 2008;8(11):2185-91. PubMed PMID: 18782291.
54. Flechner SM. Minimizing calcineurin inhibitor drugs in renal transplantation. *Transplant Proc.* 2003;35(3 Suppl):118S-21S. PubMed PMID: 12742481.
55. Barbari AG, Stephan AG, Masri MA. Calcineurin inhibitor-free protocols: risks and benefits. *Saudi J Kidney Dis Transpl.* 2007;18(1):1-23. PubMed PMID: 17237886.
56. Allison AC, Eugui EM. Purine metabolism and immunosuppressive effects of mycophenolate mofetil (MMF). *Clin Transplant.* 1996;10(1 Pt 2):77-84. PubMed PMID: 8680053.
57. George J. Mycophenolate mofetil in primary glomerular diseases. *J Assoc Physicians India.* 2011;59:103-6. PubMed PMID: 21751645.
58. Allison AC. Immunosuppressive drugs: the first 50 years and a glance forward. *Immunopharmacology.* 2000;47(2-3):63-83. PubMed PMID: 10878284.
59. Knight SR, Russell NK, Barcena L, et al. Mycophenolate mofetil decreases acute rejection and may improve graft survival in renal transplant recipients when compared with azathioprine: a systematic review. *Transplantation.* 2009;87(6):785-94. PubMed PMID: 19300178.
60. Opelz G, Dohler B. Influence of immunosuppressive regimens on graft survival and secondary outcomes after kidney transplantation. *Transplantation.* 2009;87(6):795-802. PubMed PMID: 19300179.
61. Remuzzi G, Cravedi P, Costantini M, et al. Mycophenolate mofetil versus azathioprine for prevention of chronic allograft dysfunction in renal transplantation: the MYSS follow-up randomized, controlled clinical trial. *J Am Soc Nephrol.* 2007;18(6):1973-85. PubMed PMID: 17460145.

62. Monaco AP. The role of mTOR inhibitors in the management of posttransplant malignancy. *Transplantation*. 2009;87(2):157-63. PubMed PMID: 19155967.
63. Dancy JE. Therapeutic targets: MTOR and related pathways. *Cancer Biol Ther*. 2006;5(9):1065-73. PubMed PMID: 16969122.
64. Guertin DA, Sabatini DM. The pharmacology of mTOR inhibition. *Sci Signal*. 2009;2(67):pe24. PubMed PMID: 19383975.
65. Wang X, Proud CG. The mTOR pathway in the control of protein synthesis. *Physiology (Bethesda)*. 2006;21:362-9. PubMed PMID: 16990457.
66. Lieberthal W, Levine JS. The role of the mammalian target of rapamycin (mTOR) in renal disease. *J Am Soc Nephrol*. 2009;20(12):2493-502. PubMed PMID: 19875810.
67. Caillard S, Lelong C, Pessione F, et al. Post-transplant lymphoproliferative disorders occurring after renal transplantation in adults: report of 230 cases from the French Registry. *Am J Transplant*. 2006;6(11):2735-42. PubMed PMID: 17049061.
68. van Gurp EA, Schoordijk-Verschoor W, Klepper M, et al. The effect of the JAK inhibitor CP-690,550 on peripheral immune parameters in stable kidney allograft patients. *Transplantation*. 2009;87(1):79-86. PubMed PMID: 19136895.
69. Vijayakrishnan L, Venkataramanan R, Gulati P. Treating inflammation with the Janus kinase inhibitor CP-690,550. *Trends Pharmacol Sci*. 2011;32(1):25-34. PubMed PMID: 21144599.
70. Vincenti F, Charpentier B, Vanrenterghem Y, et al. A phase III study of belatacept-based immunosuppression regimens versus cyclosporine in renal transplant recipients (BENEFIT study). *Am J Transplant*. 2010;10(3):535-46. PubMed PMID: 20415897.
71. Cooper JE, Wiseman AC. Novel immunosuppressive agents in kidney transplantation. *Clin Nephrol*. 2010;73(5):333-43. PubMed PMID: 20420793.
72. Bartel G, Bohmig GA. Desensitization and crossmatch conversion in deceased donor kidney transplantation. *Minerva Urol Nefrol*. 2011;63(1):21-34. PubMed PMID: 21336243.
73. Singh JA, Christensen R, Wells GA, et al. Biologics for rheumatoid arthritis: an overview of Cochrane reviews. *Cochrane Database Syst Rev*. 2009;7(4):CD007848. PubMed PMID: 19821440.
74. McLaughlin P, Grillo-Lopez AJ, Link BK, et al. Rituximab chimeric anti-CD20 monoclonal antibody therapy for relapsed indolent lymphoma: half of patients respond to a four-dose treatment program. *J Clin Oncol*. 1998;16(8):2825-33. PubMed PMID: 9704735.
75. Jordan SC, Toyoda M, Kahwaji J, et al. Clinical aspects of intravenous immunoglobulin use in solid organ transplant recipients. *Am J Transplant*. 2011;11(2):196-202. PubMed PMID: 21219579.
76. Kozlowski T, Andreoni K. Limitations of rituximab/IVIg desensitization protocol in kidney transplantation; is this better than a tincture of time? *Ann Transplant*. 2011;16(2):19-25. PubMed PMID: 21716181.
77. Waiser J, Budde K, Schutz M, et al. Comparison between bortezomib and rituximab in the treatment of antibody-mediated renal allograft rejection. *Nephrol Dial Transplant*. 2011;17:17. PubMed PMID: 21852274.
78. Matz M, Weber U, Mashreghi MF, et al. Effects of the new immunosuppressive agent AEB071 on human immune cells. *Nephrol Dial Transplant*. 2010;25(7):2159-67. Epub 2010/01/27. doi: gfp775 [pii] 10.1093/ndt/gfp775. PubMed PMID: 20100729.
79. Ron D, Kazanietz MG. New insights into the regulation of protein kinase C and novel phorbol ester receptors. *Faseb J*. 1999;13(13):1658-76. PubMed PMID: 10506570.
80. Li H, Weinstein IB. Protein kinase C beta enhances growth and expression of cyclin D1 in human breast cancer cells. *Cancer Res*. 2006;66(23):11399-408. PubMed PMID: 17145886.

81. Matsuzaki Y, Takaoka Y, Hitomi T, et al. Activation of protein kinase C promotes human cancer cell growth through downregulation of p18(INK4c). *Oncogene*. 2004;23(31):5409-14. PubMed PMID: 15107819.
82. Arbuzova A, Schmitz AA, Vergeres G. Cross-talk unfolded: MARCKS proteins. *Biochem J*. 2002;362(Pt 1):1-12. PubMed PMID: 11829734.
83. Sundaram M, Cook HW, Byers DM. The MARCKS family of phospholipid binding proteins: regulation of phospholipase D and other cellular components. *Biochem Cell Biol*. 2004;82(1):191-200. PubMed PMID: 15052337.
84. Ogata N, Yamamoto H, Kugiyama K, et al. Involvement of protein kinase C in superoxide anion-induced activation of nuclear factor-kappa B in human endothelial cells. *Cardiovasc Res*. 2000;45(2):513-21. PubMed PMID: 10728373.
85. Isakov N, Altman A. Protein kinase C(theta) in T cell activation. *Annu Rev Immunol*. 2002;20:761-94. PubMed PMID: 11861617.
86. Wei JF, Zheng SS. NF-kappa B in allograft rejection. *Hepatobiliary Pancreat Dis Int*. 2003;2(2):180-3. PubMed PMID: 14599965.
87. Pfeifhofer C, Kofler K, Gruber T, et al. Protein kinase C theta affects Ca²⁺ mobilization and NFAT cell activation in primary mouse T cells. *J Exp Med*. 2003;197(11):1525-35. PubMed PMID: 12782715.
88. Sun Z, Arendt CW, Ellmeier W, et al. PKC-theta is required for TCR-induced NF-kappaB activation in mature but not immature T lymphocytes. *Nature*. 2000;404(6776):402-7. PubMed PMID: 10746729.
89. Su TT, Guo B, Kawakami Y, et al. PKC-beta controls I kappa B kinase lipid raft recruitment and activation in response to BCR signaling. *Nat Immunol*. 2002;3(8):780-6. PubMed PMID: 12118249.
90. Aksoy E, Goldman M, Willems F. Protein kinase C epsilon: a new target to control inflammation and immune-mediated disorders. *Int J Biochem Cell Biol*. 2004;36(2):183-8. PubMed PMID: 14643884.
91. Wagner J, von Matt P, Sedrani R, et al. Discovery of 3-(1H-indol-3-yl)-4-[2-(4-methylpiperazin-1-yl)quinazolin-4-yl]pyrrole-2,5-dione (AEB071), a potent and selective inhibitor of protein kinase C isotypes. *J Med Chem*. 2009;52(20):6193-6. PubMed PMID: 19827831.
92. Skvara H, Dawid M, Kleyn E, et al. The PKC inhibitor AEB071 may be a therapeutic option for psoriasis. *J Clin Invest*. 2008;118(9):3151-9. PubMed PMID: 18688284.
93. Budde K, Sommerer C, Becker T, et al. Sotrastaurin, a novel small molecule inhibiting protein kinase C: first clinical results in renal-transplant recipients. *Am J Transplant*. 2010;10(3):571-81. PubMed PMID: 20121745.
94. Friman S, Arns W, Nashan B, et al. Sotrastaurin, a Novel Small Molecule Inhibiting Protein-Kinase C: Randomized Phase II Study in Renal Transplant Recipients. *Am J Transplant*. 2011;11(7):1444-55. PubMed PMID: 21564523.
95. Guo B, Su TT, Rawlings DJ. Protein kinase C family functions in B-cell activation. *Curr Opin Immunol*. 2004;16(3):367-73. PubMed PMID: 15134787.
96. Bohler T, Waiser J, Schutz M, et al. FTY720 mediates apoptosis-independent lymphopenia in human renal allograft recipients: different effects on CD62L⁺ and CCR5⁺ T lymphocytes. *Transplantation*. 2004;77(9):1424-32. PubMed PMID: 15167602.
97. Klein U, Tu Y, Stolovitzky GA, et al. Gene expression profiling of B cell chronic lymphocytic leukemia reveals a homogeneous phenotype related to memory B cells. *J Exp Med*. 2001;194(11):1625-38. PubMed PMID: 11733577.
98. Pugh RE, Bitter MA, Shpall EJ, et al. CD19 selection improves the sensitivity of B cell lymphoma detection. *J Hematother*. 1998;7(2):159-68. PubMed PMID: 9597573.

99. Cox VC, Ensom MH. Mycophenolate mofetil for solid organ transplantation: does the evidence support the need for clinical pharmacokinetic monitoring? *Ther Drug Monit.* 2003;25(2):137-57. PubMed PMID: 12657908.
100. Pascual J. Concentration-controlled everolimus (Certican): combination with reduced dose calcineurin inhibitors. *Transplantation.* 2005;79(9 Suppl):S76-9. PubMed PMID: 15880020.
101. Hayashi T, Morishita Y, Kubo Y, et al. Long-term effects of radiation dose on inflammatory markers in atomic bomb survivors. *Am J Med.* 2005;118(1):83-6. PubMed PMID: 15639214.
102. Tassone P, Neri P, Carrasco DR, et al. A clinically relevant SCID-hu in vivo model of human multiple myeloma. *Blood.* 2005;106(2):713-6. PubMed PMID: 15817674.
103. Engvall E, Perlmann P. Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). Quantitative assay of immunoglobulin G. *Immunochemistry.* 1971;8(9):871-4. PubMed PMID: 5135623.
104. Hengartner MO. The biochemistry of apoptosis. *Nature.* 2000;407(6805):770-6. PubMed PMID: 11048727.
105. Martin SJ, Reutelingsperger CP, McGahon AJ, et al. Early redistribution of plasma membrane phosphatidylserine is a general feature of apoptosis regardless of the initiating stimulus: inhibition by overexpression of Bcl-2 and Abl. *J Exp Med.* 1995;182(5):1545-56. PubMed PMID: 7595224.
106. Verhoven B, Schlegel RA, Williamson P. Mechanisms of phosphatidylserine exposure, a phagocyte recognition signal, on apoptotic T lymphocytes. *J Exp Med.* 1995;182(5):1597-601. PubMed PMID: 7595231.
107. Vermes I, Haanen C, Reutelingsperger C. Flow cytometry of apoptotic cell death. *J Immunol Methods.* 2000;243(1-2):167-90. PubMed PMID: 10986414.
108. Matz M, Naik M, Mashreghi MF, et al. Evaluation of the novel protein kinase C inhibitor sotrastaurin as immunosuppressive therapy after renal transplantation. *Expert Opin Drug Metab Toxicol.* 2011;7(1):103-13. PubMed PMID: 21142580.
109. Evenou JP, Wagner J, Zenke G, et al. The potent protein kinase C-selective inhibitor AEB071 (sotrastaurin) represents a new class of immunosuppressive agents affecting early T-cell activation. *J Pharmacol Exp Ther.* 2009;330(3):792-801. PubMed PMID: 19491325.
110. Kovarik JM, Stitah S, Slade A, et al. Sotrastaurin and cyclosporine drug interaction study in healthy subjects. *Biopharm Drug Dispos.* 2010;31(5-6):331-9. PubMed PMID: 20578209.
111. Kovarik JM, Slade A. Overview of sotrastaurin clinical pharmacokinetics. *Ther Drug Monit.* 2010;32(5):540-3. PubMed PMID: 20683390.
112. Saijo K, Mecklenbrauker I, Santana A, et al. Protein kinase C beta controls nuclear factor kappaB activation in B cells through selective regulation of the IkappaB kinase alpha. *J Exp Med.* 2002;195(12):1647-52. PubMed PMID: 12070292.
113. Gabardi S, Baroletti SA. Everolimus: a proliferation signal inhibitor with clinical applications in organ transplantation, oncology, and cardiology. *Pharmacotherapy.* 2010;30(10):1044-56. PubMed PMID: 20874042.
114. Sanchez-Fructuoso AI. Everolimus: an update on the mechanism of action, pharmacokinetics and recent clinical trials. *Expert Opin Drug Metab Toxicol.* 2008;4(6):807-19. PubMed PMID: 18611120.
115. Heidt S, Roelen DL, Eijsink C, et al. Effects of immunosuppressive drugs on purified human B cells: evidence supporting the use of MMF and rapamycin. *Transplantation.* 2008;86(9):1292-300. PubMed PMID: 19005412.
116. Vegso G, Sebestyen A, Paku S, et al. Antiproliferative and apoptotic effects of mycophenolic acid in human B-cell non-Hodgkin lymphomas. *Leuk Res.* 2007;31(7):1003-8. PubMed PMID: 17320952.

117. Majewski M, Korecka M, Kossev P, et al. The immunosuppressive macrolide RAD inhibits growth of human Epstein-Barr virus-transformed B lymphocytes in vitro and in vivo: A potential approach to prevention and treatment of posttransplant lymphoproliferative disorders. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2000;97(8):4285-90. PubMed PMID: 10759564.
118. Wadia PP, Herrera ND, Abecassis MM, et al. Mycophenolic acid inhibits maturation and function of human dendritic cells and B cells. *Hum Immunol*. 2009;70(9):692-700. PubMed PMID: 19445989.
119. Geng L, Jiang G, Xie H, et al. Mycophenolic acid upregulates B7-DC expression on dendritic cells, which is associated with impaired allostimulatory capacity of dendritic cells. *Transplant Proc*. 2006;38(5):1622-4. PubMed PMID: 16797370.
120. Formica RN, Jr., Lorber KM, Friedman AL, et al. The evolving experience using everolimus in clinical transplantation. *Transplant Proc*. 2004;36(2 Suppl):495S-9S. PubMed PMID: 15041395.
121. Augustine JJ, Bodziak KA, Hricik DE. Use of sirolimus in solid organ transplantation. *Drugs*. 2007;67(3):369-91. PubMed PMID: 17335296.
122. Nakanishi K, Matsui K, Kashiwamura S, et al. IL-4 and anti-CD40 protect against Fas-mediated B cell apoptosis and induce B cell growth and differentiation. *Int Immunol*. 1996;8(5):791-8. PubMed PMID: 8671668.
123. Foote LC, Howard RG, Marshak-Rothstein A, et al. IL-4 induces Fas resistance in B cells. *J Immunol*. 1996;157(7):2749-53. PubMed PMID: 8816375.
124. www.clinicaltrials.gov [Internet]. Novartis Pharmaceuticals. 2011. Available from: www.clinicaltrials.gov.
125. Satoh S, Tada H, Murakami M, et al. The influence of mycophenolate mofetil versus azathioprine and mycophenolic acid pharmacokinetics on the incidence of acute rejection and infectious complications after renal transplantation. *Transplant Proc*. 2005;37(4):1751-3. PubMed PMID: 15919454.
126. Halloran P, Mathew T, Tomlanovich S, et al. Mycophenolate mofetil in renal allograft recipients: a pooled efficacy analysis of three randomized, double-blind, clinical studies in prevention of rejection. The International Mycophenolate Mofetil Renal Transplant Study Groups. *Transplantation*. 1997;63(1):39-47. PubMed PMID: 9000658.
127. Sun Q, Liu ZH, Cheng Z, et al. Treatment of early mixed cellular and humoral renal allograft rejection with tacrolimus and mycophenolate mofetil. *Kidney Int*. 2007;71(1):24-30. PubMed PMID: 16969384.
128. Mauiyyedi S, Pelle PD, Saidman S, et al. Chronic humoral rejection: identification of antibody-mediated chronic renal allograft rejection by C4d deposits in peritubular capillaries. *J Am Soc Nephrol*. 2001;12(3):574-82. PubMed PMID: 11181806.
129. Ji SM, Liu ZH, Chen JS, et al. Rescue therapy by immunoadsorption in combination with tacrolimus and mycophenolate mofetil for C4d-positive acute humoral renal allograft rejection. *Transplant Proc*. 2006;38(10):3459-63. PubMed PMID: 17175303.
130. Sun Q, Liu ZH, Yin G, et al. Tacrolimus combined with mycophenolate mofetil can effectively reverse C4d-positive steroid-resistant acute rejection in Chinese renal allograft recipients. *Nephrol Dial Transplant*. 2006;21(2):510-7. PubMed PMID: 16421166.
131. Venetz JP, Pascual M. New treatments for acute humoral rejection of kidney allografts. *Expert Opin Investig Drugs*. 2007;16(5):625-33. PubMed PMID: 17461736.
132. Waiser J, Budde K, Schutz M, et al. Comparison between bortezomib and rituximab in the treatment of antibody-mediated renal allograft rejection. *Nephrol Dial Transplant*. 2012;27(3):1246-51. PubMed PMID: 21852274.
133. Grgic T, Mis L, Hammond JM. Everolimus: a new mammalian target of rapamycin inhibitor for the treatment of advanced renal cell carcinoma. *Ann Pharmacother*. 2011;45(1):78-83. PubMed PMID: 21177421.

134. Seidel C, Grunwald V. [Use of mTOR-inhibitors in solid tumors]. *Med Monatsschr Pharm.* 2011;34(4):116-26; quiz 27-8. PubMed PMID: 21528529.
135. Fasolo A, Sessa C. Current and future directions in mammalian target of rapamycin inhibitors development. *Expert Opin Investig Drugs.* 2011;20(3):381-94. PubMed PMID: 21299441.
136. Liefeldt L, Brakemeier S, Glander P, et al. Donor-Specific HLA Antibodies in a Cohort Comparing Everolimus with Cyclosporine After Kidney Transplantation. *Am J Transplant.* 2012;12(5):1192-8. PubMed PMID: 22300538.
137. Schneider P. The role of APRIL and BAFF in lymphocyte activation. *Curr Opin Immunol.* 2005;17(3):282-9. PubMed PMID: 15886118.
138. Mackay F, Figgett WA, Saulep D, et al. B-cell stage and context-dependent requirements for survival signals from BAFF and the B-cell receptor. *Immunol Rev.* 2010;237(1):205-25. PubMed PMID: 20727038.
139. Bossen C, Schneider P. BAFF, APRIL and their receptors: structure, function and signaling. *Semin Immunol.* 2006;18(5):263-75. PubMed PMID: 16914324.
140. Tangye SG, Bryant VL, Cuss AK, et al. BAFF, APRIL and human B cell disorders. *Semin Immunol.* 2006;18(5):305-17. PubMed PMID: 16916610.
141. Gupta M, Dillon SR, Ziesmer SC, et al. A proliferation-inducing ligand mediates follicular lymphoma B-cell proliferation and cyclin D1 expression through phosphatidylinositol 3-kinase-regulated mammalian target of rapamycin activation. *Blood.* 2009;113(21):5206-16. PubMed PMID: 19321861.

Lebenslauf

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

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei all jenen recht herzlich bedanken, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben. Mein besonderer Dank gilt Herrn Professor Dr. med. Klemens Budde für die freundliche Überlassung des interessanten Themas dieser Dissertation. Er stand mir zu jedem Zeitpunkt kompetent und wohlwollend mit Rat und Tat zur Seite. Im Besonderen möchte ich mich zudem bei Frau Dr. rer. medic. Mareen Matz bedanken, welche mich im gesamten Verlauf dieser Dissertation intensiv betreute und somit das Gelingen dieser Arbeit erst möglich machte. Ohne ihre organisatorischen Fähigkeiten, ihre stets konstruktive und hilfreiche Kritik sowie ihre unkomplizierte und freundliche Beratung wäre die Erstellung dieser Arbeit nicht möglich gewesen. Ihrer umsichtigen und verantwortungsvollen Anleitung, ihrer Begeisterung für die wissenschaftliche Forschung und ihrer intensiven Betreuung verdanke ich eine von Erkenntnisgewinn und Produktivität geprägte Zeit.

Weiterhin bedanke ich mich bei Christine Lorkowski, Kathrina Fabritius, Dr. rer. nat. Mir-Farzin Mashreghi sowie Dr. med. Peter Koppe. Ihre fachliche Kompetenz und ihre verständnisvolle Unterstützung schafften eine beständig lehrreiche und persönliche Atmosphäre.

Außerdem gilt mein Dank allen anderen Mitarbeitern des Nephrologischen Forschungslabors, die mir immerwährend hilfsbereit zur Seite standen. Außerordentlich bedanken möchte ich mich bei den freiwilligen Studienprobanden, ohne deren Beitrag diese Arbeit nicht zustande gekommen wäre.

Nicht zuletzt danke ich meiner Mutter, deren liebevolle Unterstützung und Anteilnahme meine ständigen Begleiter im Laufe der vergangenen zweieinhalb Jahre und während meines gesamten bisherigen Lebens waren und sind.

Erklärung

„Ich, Martin Lehnert, erkläre, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema: „Einfluss von immunsuppressiven Substanzen auf die Funktionen humaner B-Lymphozyten“ 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.“

Datum

Unterschrift

Teilpublikationen

Originalartikel

Matz M, **Lehnert M**, Lorkowski C, Fabritius K, Unterwalder N, Doueiri S, Weber U, Mashreghi MF, Neumayer HH, Budde K
Effects of sotrastaurin, mycophenolic acid and everolimus on human B-lymphocyte function and activation
Transplant International 2012: akzeptiert im Juni 2012

Poster

Matz M, Lorkowski C, **Lehnert M**, Fabritius K, Doueiri S, Mashreghi MF, Neumayer HH, Budde K
Effects of Immunosuppressive Drugs on Human B-Cell Functions
The Transplantation Society 2012

Matz M, Lorkowski C, **Lehnert M**, Doueiri S, Fabritius K, Mashreghi MF, Neumayer HH, Budde K
Effects of Immunosuppressive Drugs on Human B-Cell Functions
Nantes/ Actualités/ Transplantation "To B or not to B? That's the question in organ transplantation" 2011