

Aus dem Charité Centrum 13
Medizinische Klinik mit Schwerpunkt für Nephrologie und Internistische Intensivmedizin
der Medizinischen Fakultät Charité - Universitätsmedizin Berlin

Dissertation

Pharmakodynamisches Immunmonitoring und Infektionsvorbeugung bei Patienten nach Nierentransplantation

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

vorgelegt der Medizinischen Fakultät
Charité - Universitätsklinik Berlin

von

Peter Liman

aus Hannover

Datum der Promotion: 27.02.2015

1 Inhaltsverzeichnis

1 Inhaltsverzeichnis	2
2 Zusammenfassung	3
2.1 Abstract	3
Abstract (English).....	4
2.2 Einleitung und Zielstellung	5
2.3 Methodik und Patienten.....	6
2.4 Ergebnisse	8
2.5 Diskussion	10
2.6 Literatur	14
2.7 Abkürzungen	17
2.8 Abbildungen	18
3 Eidesstattliche Versicherung	22
4 Anteilserklärung	23
5 Publikationen	25
5.1 <i>Whole blood flow cytometric measurement of NFATc1 and IL-2 expression to analyze cyclosporine A-mediated effects in T cells</i>	26
5.2 <i>Mannose-binding lectin deficiency is not associated with increased risk for polyomavirus nephropathy</i>	33
5.3 <i>Impaired thymic function and CD4 + T lymphopenia, but not mannose-binding lectin deficiency, are risk factors for Pneumocystis jirovecii pneumonia in kidney transplant recipients</i>	38
6 Lebenslauf	43
7 Komplette Publikationsliste	45
8 Danksagung.....	46

2. Zusammenfassung:

2.1 Abstract:

Die Nierentransplantation stellt für viele Dialysepatienten mit terminaler Niereninsuffizienz eine kausale Therapieoption zur Verbesserung von Lebenserwartung und – qualität dar. Die dazu notwendige Immunsuppression bedeutet jedoch auch ein neues Risiko für Empfänger und Organ und ist für Arzt und Patient – nach chirurgisch erfolgreicher Transplantation – eine neue Herausforderung. Die richtige Einschätzung des individuellen Infektionsrisikos, sowie das Erkennen einer drohenden Abstoßungsreaktion sind wesentliche Ziele in der Patientenbetreuung.

Im Gegensatz zum pharmakokinetischen Monitoring können pharmakodynamische Tests helfen, die erforderliche Therapedosis von Calcineurininhibitoren (CNI), z.B. Ciclosporin A (CsA), besser einschätzen und somit individuell anpassen zu können.

Ein entscheidender Ansatzpunkt der CNIs ist dabei die indirekte Hemmung des durch Calcineurin aktivierten Transkriptionsfaktors NFAT. Im Rahmen einer Immunaktivierung kommt es zu einem quantitativen Anstieg der NFAT-Konzentration in T-Zellen mit nachfolgender Zytokinausschüttung, v.a. Interleukin 2 (IL-2) und Interferon gamma (IFN γ).

In dieser Arbeit entwickelten wir einen Test, welcher ex vivo die tatsächliche CsA-Wirkung anhand der durchflusszytometrischen Bestimmung von NFAT und IL-2 in aktivierten T-Zellen aus dem Vollblut abbildet. Es konnte eine konzentrationsabhängige CsA spezifische Inhibition der T-Zellantwort mit letztlich vollständiger Hemmung der NFAT- und IL-2-Expression gezeigt werden.

Weiterhin analysierten meine Kollegen und ich den Einfluss eines Mangels an Mannose-bindendem Lektin (MBL) auf BK-Virusinfektionen und Pneumocystis jirovecii - Pneumonien (PCP) bei nierentransplantierten Patienten. Bei 105 Patienten, darunter 16 mit Poliomyavirus assoziierter Nephropathie (PVAN) und 25 mit leichter BK-Virus (BKV) - Infektion, konnte ein MBL-Mangel nicht als Risikofaktor für vermehrte Infektionen identifiziert werden. Im Gegenteil fand sich ein Trend zu höheren MBL-Spiegeln bei Patienten mit PVAN im Vergleich zu Patienten mit nur leichter BKV-Infektion, insbesondere nach Ausschluss von Patienten mit Rejektion als potentielle Störgröße (p=0,076). Dieses ist möglicherweise auf eine verringerte Tubulusinflammation bei verminderter MBL-assoziiierter Komplementaktivierung zurückzuführen.

Zudem konnte bei 112 Patienten, darunter 17 Patienten mit PCP-Infektion, kein Zusammenhang zwischen PCP und MBL-Mangel gefunden werden.

In weiteren durchflusszytometrischen Untersuchungen von T-Zell-Subtypen (CD4+, CD8+ und CD31+ RTE – T-Zellen) bei 281 Patienten mit Nierentransplantation (n=14 für PCP) fand sich eine Assoziation des PCP-Risikos mit einer CD4+ Lymphopenie und einer Thymusunterfunktion.

Abstract (English):

For many patients on dialysis with end-stage renal failure renal transplantation represents a causal therapy to reduce mortality and improve quality of life. However, immunosuppressive therapy is a new risk for the recipient and graft even after successful surgical transplantation. Estimation and evaluation of the individual risk between imminent infection and graft rejection is challenging.

In contrast to pharmacokinetic drug monitoring, pharmacodynamic tests can help to find the adequate drug dosage of calcineurin inhibitors (CNI) such as Cyclosporine A (CsA). Furthermore, such tests can be helpful in adapting the drug dosage to individual needs of patients.

A substantial target of CNIs is the indirect inhibition of the calcineurin activated transcription factor NFAT. Immune activation leads to an increase of NFAT in T cells with consecutive cytokine expression – especially IL-2 and Interferon gamma (IFN γ).

As part of my thesis we developed an ex vivo test which shows the actual CsA effect by flow-cytometric determination of NFAT and IL-2 in activated T cells.

Furthermore, we analyzed the influence of mannose-binding lectin (MBL) on BK-Virus (BKV) infections and pneumocystis jirovecii pneumonia (PCP) in renal transplant recipients. In 105 patients - 16 with polyomavirus associated nephropathy (PVAN) and 25 with low level BK viremia – MBL deficiency was not a risk factor for BKV infection. We could show, that there was a trend towards higher MBL levels in patients with PVAN compared to those with low levels of BK viremia, especially after exclusion of patients with acute rejection as a possible bias (p=0,076). This might be caused by a lower local MBL associated complement activation and consecutive tubulus inflammation.

In addition, we could not detect an association between PCP and MBL deficiency in 112 patients including 17 with PCP infection.

Further flow-cytometric measurements of T cell subsets (CD4+, CD8+ and CD31+ RTE – T cells) in 281 renal transplant patients (n=14 for PCP) showed an association of PCP with CD4+ lymphopenia and thymic functional impairment.

2.2 Einleitung und Zielstellung

Die allogene Nierentransplantation hat sich während der letzten 30 Jahre, dank der Entwicklung neuer Immunsuppressiva (IS), als Standardtherapie der terminalen Niereninsuffizienz etablieren können. Insbesondere die Einführung des Calcineurininhibitors Ciclosporin A Anfang der 80er Jahre führte zu einem Durchbruch in der Transplantationsmedizin (1,2). Trotz dieser Erfolge ließ sich die Langzeitfunktionsfähigkeit der transplantierten Organe in den letzten 15-20 Jahren nur wenig verbessern (3,4). Neben einer zunehmenden Transplantation marginaler Organe ist dies u.a. auf chronische Transplantatabstoßung und auf die Nephrotoxizität der immunsuppressiven Therapien zurückzuführen (4,5). Eine personalisierte Therapie, die einerseits eine adäquate Suppression des Immunsystems zur Vermeidung einer Rejektion erreicht, andererseits jedoch eine überzogene Immunsuppression mit möglichen Nebenwirkungen verhindert, stellt somit ein wichtiges Ziel bei der Betreuung organtransplantierte Patienten dar. Ein Fokus vieler Forschungsprojekte ist deshalb die Charakterisierung und Bewertung des Immunsystems durch neue diagnostische Tests und Biomarker.

CNIs wie CsA und Tacrolimus (FK506) sind essentielle Bausteine in der Aufrechterhaltung einer dauerhaften IS bei nierentransplantierte Patienten (6,7). Aufgrund der geringen therapeutischen Breite und der nephrotoxischen Nebenwirkungen ist eine regelmäßige Bestimmung der Wirkstoffkonzentration C_0 im Vollblut erforderlich. Diese stellt jedoch die tatsächliche Immunsuppression nur ungenügend dar, eine drohende Abstoßung kann somit kaum vorhergesagt werden (8). Wir versuchten deshalb, ein durchflusszytometrisches Vollblut-Assay zum pharmakodynamischen Monitoring von CsA zu entwickeln. Als Biomarker wählten wir mit NFATc1 einen Calcineurin-abhängigen induzierbaren Transkriptionsfaktor, der direkt an der T-Zell-Aktivierung beteiligt ist und somit die pharmakodynamische Wirkung von CsA an T-Zellen widerspiegelt. Darüber hinaus wurde die T-Zellexpression von IL-2 gemessen.

Ebenfalls verbunden mit einer hohen Zahl an Organverlusten und infektionsgetriggerten Rejektionen ist die fast ausschließlich bei nierentransplantierten Patienten und durch den BK-Virus verursachte PVAN. Eine weitere gefürchtete Infektion mit hoher Mortalität bei organtransplantierten Patienten unter Immunsuppression ist die PCP.

Das Komplementsystem ist als Teil der nativen Immunabwehr nicht Ansatzpunkt der Immunsuppression bei organtransplantierten Patienten und bleibt somit ein wichtiger Baustein der Infektbekämpfung. Neben dem klassischen und dem alternativen Weg nutzt das in der Leber synthetisierte Mannose-bindende Lektin über Bindung an Glykopeptidstrukturen auf Bakterien und Viren (z.B. Mannose) den Lektin-Weg zur Komplementaktivierung.

Ein MBL-Mangel wurde bereits mit verschiedenen Infektionen, u.a. bei immunsupprimierten Patienten, in Verbindung gebracht (9-11). Im Gegensatz dazu führen erhöhte MBL-Konzentrationen jedoch auch zu einer erhöhten Rejektionsrate und frühzeitigem Organverlust nach Nierentransplantation (12,13). In diesem Rahmen sollte erstmals der Zusammenhang zwischen BK-Virus- und PCP-Infektion mit einem MBL-Mangel nach Nierentransplantation untersucht werden.

Ferner ist eine CD4+ Leukopenie ein bereits bekannter Risikofaktor für PCP bei HIV infizierten Patienten (14). Wir untersuchten deshalb zusätzlich den Einfluss von verschiedenen T –Zell Subtypen (CD4+, CD8+ und CD31+ RTE-T-Zellen) auf das PCP-Risiko bei nierentransplantierten Patienten.

2.3 Methodik und Patienten

2.3.1 NFATc1-Messung in isolierten CD4 Zellen

Mononukleäre Zellen (MNC) wurden mit Ficoll PAQUE aus heparinisiertem Vollblut präpariert, anschließend isolierten wir die CD4+ T-Zellen (MACS® Separations Kit; Miltenyi Biotech). Die CD4+ Zellen wurden mit verschiedenen CsA Konzentrationen versetzt und in RPMI Medium bei 37°C für 20 Minuten inkubiert. Danach stimulierten wir die Zellen mit 10 ng/ml PMA und 1 µg/ml Ionomycin für 6 Stunden im Inkubator. Nach Fixierung und Permeabilisierung (eBioscience Kit) wurden die Zellen mit PE-konjugierten anti-NFATc1-Antikörpern gefärbt und durchflusszytometrisch analysiert (FACS Calibur; BD).

2.3.2 Durchflusszytometrisches Vollblutassay zur Quantifizierung von NFATc1- und IL-2-Expression

Jeweils 1 ml heparinisiertes Vollblut von gesunden Probanden wurde mit 50 ng/ml PMA und 2,5 µg/ml Ionomycin (Sigma) für 5 Stunden im Inkubator (37°C) stimuliert. 20 Minuten vor Stimulation wurden die Samples mit verschiedenen klinisch relevanten Konzentrationen von CsA (Calbiochem.) versetzt, 30 Minuten nach Stimulation erfolgte die Zugabe von Brefeldin A (Sigma; 10µg/ml) zur Inhibierung der Zytokinexozytose. Anschließend wurden die Erythrozyten durch FACS Lysing Solution (BD) lysiert und die verbleibenden MNCs mit FACS Perm Sol. 2 (BD) permeabilisiert und fixiert. Nach Färbung der MNCs mit fluoreszierenden anti-IL-2, anti-CD3 und anti-NFATc1 Antikörpern analysierten wir die Zellen mit dem Durchflusszytometer (FACS Calibur; BD).

Zur Auswertung der Ergebnisse wurde die Software FlowJo (TreeStar) verwendet.

2.3.3 MBL-Messungen im Serum bei nierentransplantierten Patienten mit und ohne BK-Virus- bzw. PCP- Infektion

Aus dem Serum der Patienten erfolgte die Quantifizierung der MBL-Konzentration 30, 90 und/oder 180 Tage nach der Transplantation mithilfe eines kommerziell erhältlichen ELISA-Tests (AntibodyShop, Gentofte) nach den Instruktionen des Herstellers. Bei 39/105 (BKV-Studie) bzw. 37/112 Patienten (PCP-Studie) wurde die MBL-Konzentration zu allen drei Zeitpunkten (30, 90 und 180 Tage nach NTX) bestimmt. Für die weiteren Analysen wurde der Median aus den vorhandenen Messpunkten verwendet.

Zur Untersuchung eines Zusammenhangs zwischen BKV-Infektionen und MBL-Serumkonzentration wurden 105 Patienten mit Nierentransplantation zwischen 2005 und 2010 in drei Gruppen klassifiziert: Patienten mit PVAN (Gruppe 1, n=16, BK-Viruslast im Serum > 10⁴ copies/ml über 3 Wochen), Patienten mit leichter BKV-Infektion (Gruppe 2, n=25, Viruslast im Serum positiv) und Patienten ohne BKV-Infektion (Gruppe 3, n=64). Patienten mit PCP-Infektion wurden aus dieser Studie ausgeschlossen.

Zur Untersuchung eines Zusammenhangs zwischen PCP-Infektionen und MBL-Serumkonzentration wurden 112 Patienten mit Nierentransplantation zwischen 2004 und 2010 in zwei Gruppen mit (17/112) und ohne (95/112) PCP-Infektion klassifiziert. Patienten mit PVAN wurden aus der Studie ausgeschlossen.

In Übereinstimmung mit vorangegangenen Studien wurden mediane MBL-Serumkonzentrationen < 500 ng/ml als MBL-Mangel und MBL-Serumkonzentrationen < 1000 ng/ml als partieller MBL-Mangel klassifiziert (10,11).

2.3.4 Messung der T-Zell-Subpopulationen

Bei 281 nierentransplantierten Patienten wurde die Anzahl der CD3+, CD4+, CD8+ und CD31+/CD45RA+/CD4+ Zellen zwischen 1 bis 6 Zeitpunkten (präoperativ: Tag 0; postoperativ: Tag 30, 60, 90, 180, 365) wie bereits beschrieben bestimmt (15).

2.3.5 Statistische Analysen

Die klinischen und paraklinischen Daten der Patienten wurden der hauseigenen Datenbank für Nierentransplantation des Virchow-Klinikums der Charité (TBase) entnommen.

Zur Auswertung der statistischen Daten wurde die Software „PASW Statistics 18“, „GraphPad InStat“ und „SigmaPlot“ verwendet.

2.4 Ergebnisse

2.4.1 NFATc1-Induktion in isolierten CD4+ Zellen

Durchflusszytometrisch stellten sich die stimulierten isolierten CD4+ Zellen im Vergleich zu unstimulierten CD4+ Zellen in der NFATc1-Färbung mit einer deutlich höheren mittleren fluoreszierenden Intensität (MFI) dar. Durch Behandlung der CD4+ Zellen mit CsA während der Inkubation konnte dieser NFATc1-Shift in der stimulierten Population inhibiert und somit die Spezifität der Färbung nachgewiesen werden (Abb.1).

2.4.2 Etablierung des Vollblutassays zur durchflusszytometrischen Quantifizierung von NFATc1 und IL-2 in aktivierten CD3+ T-Zellen

Zur Verbesserung der Praktikabilität wurde nun ein Assay zur Messung der Expression von NFATc1 und IL-2 in CD3+ T-Zellen nach Stimulation im Vollblut konzipiert. Bei Inkubation des Vollblutes für 5 Stunden zeigte sich die höchste Expression von NFATc1 und IL-2. Durch Titrationsansätze stellte sich eine optimale Stimulationskonzentration von 50 ng/ml Ionomycin und 2,5 µg/ml PMA heraus (Abb. 2 A-D).

Nach Beifügen von CsA 20 Minuten vor Stimulationsbeginn konnte ein hemmender Effekt auf die NFATc1- und IL-2-Expression der ex vivo stimulierten T-Zellen nachgewiesen werden. In Hinblick auf die klinische Relevanz wurden in den Vollblutansätzen CsA-Konzentrationen zwischen 5 und 1000 nmol/l verwendet. Die mittlere inhibitorische Konzentration (IC_{50}) für NFATc1 und IL-2 lag bei 200 nmol/l bzw. 150 nmol/l. Bei höheren Konzentrationen >500 nmol/l ließ sich eine fast vollständige Hemmung der NFATc1- und IL-2-Expression erreichen (Abb. 3).

2.4.3 Assaystabilität und Lagerungsbedingungen

Die Stabilität und Reproduzierbarkeit des Vollblutassays analysierten wir durch Wiederholungen identischer Versuchsansätze. Hierbei zeigte sich eine niedrige Intra- und Interassay-Variabilität (Variationskoeffizienten für NFATc1/IL-2: 6,2 - 11,5%). Ferner ließen sich bei gesunden Probanden an verschiedenen aufeinanderfolgenden Tagen vergleichbare Ergebnisse erzielen (Abb. 4A). Eine Lagerung des Vollblutes bei Raumtemperatur im Dunkeln erbrachte auch nach 24 Stunden stabile Ergebnisse (Abb. 4B). In der zirkadianen Analyse mit Blutabnahmen zu verschiedenen Tageszeiten ließ sich hingegen eine erhöhte, jedoch nicht signifikante NFATc1- und IL-2-Expression in den Mittagsstunden nachweisen (Abb. 4C).

2.4.4 Klinische Charakteristika der nierentransplantierten Patienten

BKV-Studie: Die Patienten der drei Gruppen wiesen keine Unterschiede in Bezug auf Alter, Geschlecht, HLA-Übereinstimmung, Rejektionen oder Serumkreatinin (12 Monate nach Nierentransplantation) auf.

PCP-Studie: Die Patienten der zwei Gruppen zeigten keinen Unterschied in Bezug auf Geschlecht oder Rejektionen. Interessanterweise waren die Patienten der PCP-Gruppe im Vergleich zur Kontrollgruppe jedoch signifikant älter ($p=0,008$)

2.4.5 MBL-Konzentration bleibt konstant nach Nierentransplantation

Eine MBL-Bestimmung wurde in 39/105 (BKV-Studie) bzw. 37/112 (PCP-Studie) Patienten zu drei Zeitpunkten nach Nierentransplantation (30, 90 und 180 Tage) durchgeführt. Dabei fanden sich, auch unabhängig von BKV-Infektion oder PCP, keine signifikanten Unterschiede in der MBL-Serumkonzentration zu den jeweiligen Zeitpunkten (Friedman-Test $p=0,215$ bzw. $p=0,091$).

2.4.6 MBL-Mangel ist nicht mit BK-Virus Infektion bei nierentransplantierten Patienten assoziiert

Die Häufigkeit eines MBL-Mangels stellte sich zwischen den drei Gruppen mit PVAN, leichter BKV-Infektion und der Kontrollgruppe nicht signifikant unterschiedlich dar ($p=0,824$). Es fand sich jedoch ein Trend in Gruppe 2 (leichte BKV-Infektion) zu niedrigeren MBL-Konzentrationen im Vergleich zur Gruppe 1 (PVAN) (Abb. 5). In einer erneuten Analyse und nach Ausschluss aller Patienten mit Rejektionen als möglichen Störfaktor zeigte sich ein partieller MBL-Mangel in Gruppe 2 statistisch nicht signifikant häufiger im Vergleich zur Gruppe 1 ($p=0,076$).

2.4.7 MBL-Mangel ist nicht mit PCP- Infektion bei NTX Patienten assoziiert

Die Häufigkeit eines MBL-Mangels stellte sich zwischen nierentransplantierten Patienten mit und ohne PCP-Infektion nicht signifikant unterschiedlich dar ($p=0,292$) (Abb. 6).

2.4.8 CD4+ Lymphopenie und Thymusunterfunktion als Risikofaktor für PCP

Bei der Bestimmung der T-Zell-Subpopulationen konnte bei PCP-Patienten im Vergleich zur Kontrollgruppe eine niedrigere CD4+ Zellzahl zu allen Zeitpunkten, mit statistischer Signifikanz an Tag 0 ($p=0,017$) und Tag 60 ($p=0,032$), gefunden werden. Weiterhin zeigte sich eine signifikant niedrigere Anzahl an jungen, aus dem Thymus stammenden CD31+/CD45RA+/CD4+ Lymphozyten („recent thymic emigrants“ – RTE) an Tag 0 ($p=0,046$) (Abb. 7).

2.5 Diskussion

2.5.1 NFATc1 und IL-2 als Biomarker zum Immunmonitoring einer CNI-Therapie

Aufgrund der geringen therapeutischen Breite von CsA sind pharmakokinetische Messungen der C0 CsA-Konzentrationen im Vollblut bei organtransplantierten Patienten in der Klinik weiterhin von Bedeutung. Dabei bestehen jedoch große interindividuelle Unterschiede der dosisabhängigen Nebenwirkungen wie Nephrotoxizität. Ebenso wird die tatsächliche immunsuppressive Wirkung durch die Medikamentenkonzentration nur unbefriedigend widerspiegelt. Pharmakodynamische

Tests sind auf dem Weg zur individuellen Immunsuppression bei Organtransplantation folglich unabdingbar.

In der vorliegenden Arbeit wurden NFATc1 und IL-2 als potentielle Biomarker zum Monitoren der pharmakodynamischen Effekte von CsA auf die T-Zellantwort untersucht. CsA inhibiert dabei die Aktivierung von NFATc1 und damit durch Inhibierung einer Autoregulationsschleife die Expression von NFATc1 selbst (16,17). Erst durch aktiviertes NFAT kommt es zu einer Expression von Zytokinen wie IL-2. Die T-Zell-Expression von NFATc1 und IL-2 bildet die CsA-Wirkung auf verschiedenen Ebenen der Signaltransduktion bei der TZR-Aktivierung ab und gibt somit Aufschluss über den tatsächlichen Grad der Immunsuppression.

Wir konnten zeigen, dass bei verschiedenen CsA-Titrationsen, die den klinischen Therapiedosierungen entsprechen, eine konzentrationsabhängige Inhibition der NFATc1- und IL-2-Expression erreicht wird.

Für eine mögliche Translation in die klinische Praxis ließen sich die gesammelten Blutproben ohne signifikante Änderung der NFATc1- und IL-2-Expression bis zu 24 Stunden lagern.

Die Durchführung des Tests ist durch die Verwendung von Vollblut bereits mit einer kleinen Probenmenge von wenigen Millilitern möglich. Im Vergleich mit Messungen an isolierten T-Lymphozyten lässt sich neben Material auch kostbare Laborzeit sparen. Darüber hinaus wird die physiologische Situation der CsA-Wirkung und seiner Proteinbindung ex vivo dargestellt, insbesondere da sich ein Großteil der CsA-Menge in den Erythrozyten befindet.

In vorausgegangenen Studien konnten Giese und Kollegen bereits durch quantitative RT-PCR-Messungen von mRNA der Zytokine IL-2, IFN γ und Granzym A die CsA vermittelte Inhibition der T-Zellantwort darstellen (18).

Weitere Tests messen die intrazelluläre ATP-Produktion oder die intrazelluläre Calcineurin-Aktivität und zielen somit auf eine unspezifische Bestimmung der Immunsuppression ab (19,20). Ein Vorteil dieser Methoden ist die gleichzeitige Abbildung mehrerer immunsuppressiver Medikamente mit unterschiedlichen pharmakodynamischen Wirkungsmechanismen, wie sie in der Transplantationsmedizin verwendet werden.

Trotz aller Bemühungen ist es bislang nicht gelungen, einen pharmakodynamischen Test in den klinischen Alltag zu integrieren. Die klinische Relevanz des Vollblutassays

zum individuellen Monitoren der CsA-vermittelten IS muss deshalb zunächst durch weitere klinische Untersuchungen an organtransplantierten Patienten belegt werden.

2.5.2 MBL-Mangel als Risikofaktor bei immunsupprimierten Patienten nach Nierentransplantation für PVAN und PCP

In unseren Studien zeigten sich die MBL-Konzentrationen zwischen 30 und 180 Tagen nach Nierentransplantation stabil. Dies wurde bereits für die frühe Posttransplantationsphase in vorangegangenen Studien belegt (11,21).

Große interindividuelle Schwankungen basieren auf Polymorphismen des MBL2-Gens (22). Intraindividuelle MBL-Schwankungen wurden ebenfalls nach allogener Stammzelltransplantation, als auch bei Entzündungsreaktionen beschrieben (23-25).

Als Mitglied der Collectinfamilie ist MBL ein Bestandteil der unspezifischen Immunabwehr und bindet vor allem an glykosylierten bakteriellen Oberflächenproteinen (z.B. Mannose, Fucose) (22). Beispielhaft sei hier das Oberflächenprotein Glykoprotein A von *Pneumocystis jirovecii* erwähnt, ein stark glykosyliertes Protein mit Mannoseresten (26). Darüber hinaus scheint MBL auch eine Schutz vor viralen Infektion wie CMV und HPV zu bieten (10,27). Hier dienen möglicherweise auch Nukleinsäuren und nicht- glykosylierte Proteine als MBL-Angriffspunkt.

Ein Assoziation zwischen MBL-Mangel (<500ng/ml) und BK-Virus-Infektion bzw PCP konnte in unseren Studien bei nierentransplantierten Patienten jedoch nicht nachgewiesen werden. Im Gegenteil zeichnete sich bei Patienten mit partiellem MBL-Mangel, insbesondere nach Ausschluss von nierentransplantierten Patienten mit akuter Rejektion als möglichen Störfaktor, ein Trend zu niedrigerer BK-Viruslast ab. Wir nehmen an, dass ein MBL-Mangel, durch eine verminderte Komplementaktivierung und Tubulusinflammation seltener zur Progression von einer ‚leichten‘ BKV-Infektion zu einer PVAN mit hoher BK-Viruslast führen könnte. Eine Tubulusinflammation im Rahmen von Reperfusion-Ischämie-Schäden wurde bereits in vorangegangenen Studien als Risikofaktor für eine PVAN aufgeführt (28-30). Ebenfalls wurde eine Aktivierung des Lektin-Komplement-Weges durch Reperfusion-Ischämie-Schäden beschrieben (31-33). Interessanterweise gelten akute Rejektionen als eigenständiger Risikofaktor für eine PVAN, zudem sind hohe MBL-Level mit rejektions-bedingt kürzerem Organüberleben assoziiert (12,13).

Trotz einer relativ großen Kohorte von 16 Patienten mit hoher BK-Viruslast und 25 Patienten mit niedriger BK-Viruslast zeigte sich noch keine Signifikanz ($p=0,076$) und es sind somit weitere Studien zur Belegung unserer Hypothese notwendig.

2.5.3 Altersabhängige CD4+ Lymphopenie und Thymusunterfunktion bei nierentransplantierten Patienten sind mit einem erhöhten PCP-Risiko assoziiert

Im Vergleich zu HIV Patienten ist bei organtransplantierten Patienten kaum etwas über den Zusammenhang zwischen einer niedrigen Anzahl an CD4+ T-Helferzellen und einem erhöhten PCP-Risiko bekannt. In unserer Analyse fand sich bei CD4+ Lymphopenie ein erhöhtes PCP-Risiko in der frühen Posttransplantationsphase bei nierentransplantierten Patienten. Weiterhin zeigte sich vor Nierentransplantation auch die Thymusunterfunktion (in Form einer niedrigen Anzahl an CD31+ ‚RTE‘- T-Lymphozyten) mit PCP assoziiert. Erstmals konnte dabei eine altersabhängige Relation von PCP-Risiko, Thymusunterfunktion und CD4+ Lymphopenie aufgezeigt werden. Im Vergleich zu HIV-Patienten, bei welchen eine CD4+ Zellzahl von 200/ μ l als Grenze für ein erhöhtes PCP-Risiko gilt, konnte ein eindeutiger Schwellenwert bei den nierentransplantierten Patienten in unserer Studie nicht definiert werden (14).

Eine altersabhängige Verschlechterung der Immunfunktion ist neben einer Quantitätsabnahme der CD4+ und CD31+ ‚RTE‘-Lymphozyten jedoch auch von weiteren qualitativen Faktoren wie Proliferation, Zytokinausschüttung und T-Zellrepertoire abhängig (34). Zukünftige qualitative Studien zur T-Zellfunktion sollten helfen, das Risiko von PCP und anderen Infektionen nach Nierentransplantation besser einschätzen und vorhersagen zu können.

Aktuell scheint die medikamentöse IS in der Transplantationsmedizin die einzige realistische Möglichkeit zur Aufrechterhaltung der Transplantatfunktion, insbesondere da eine Immuntoleranz gegenüber einem transplantierten Organ (noch) nicht sicher induziert werden kann. Die vorgestellten Studien zielen auf eine Vorbeugung der hierdurch verursachten Nebenwirkungen ab und stellen einen weiteren, kleinen Schritt in Richtung einer individuellen Therapie dar.

2.6 Literaturverzeichnis

1. Merion RM, White DJ, Thiru S et al. Cyclosporine: five years' experience in cadaveric renal transplantation. *N Engl J Med.* 1984;310(3):148-54.
2. The Canadian Multicentre Transplant Study Group. A randomized clinical trial of cyclosporine in cadaveric renal transplantation. Analysis at three years. *N Engl J Med.* 1986;314(19):1219-25.
3. Lamb KE, Lodhi S, Meier-Kriesche HU. Long-term renal allograft survival in the United States: a critical reappraisal. *Am J Transplant.* 2011 Mar;11(3):450-62.
4. Nankivell BJ, Kuypers DR. Diagnosis and prevention of chronic kidney allograft loss. *Lancet.* 2011 Oct 15;378(9800):1428-37. doi: 10.1016/S0140-6736(11)60699-5.
5. Golshayan D, Pascual M. Minimization of calcineurin inhibitors to improve long-term outcomes in kidney transplantation. *Transpl Immunol.* 2008 Nov;20(1-2):21-8
6. Ekberg H, Tedesco-Silva H, Demirbas A et al. Reduced exposure to calcineurin inhibitors in renal transplantation. *N Engl J Med.* 2007 Dec 20;357(25):2562-75.
7. Casey MJ, Meier-Kriesche HU. Calcineurin inhibitors in kidney transplantation: friend or foe? *Curr Opin Nephrol Hypertens.* 2011 Nov;20(6):610-5
8. Sommerer C, Giese T, Meuer S, Zeier M. Pharmacodynamic monitoring of calcineurin inhibitor therapy: is there a clinical benefit? *Nephrol Dial Transplant.* 2009 Jan;24(1):21-7.
9. Hoeflich C, Unterwalder N, Schuett S, Schmolke K, Boenisch O, Hammer M, Scheufele R, Michael D, Volk HD, Scheibenbogen C, von Baehr V, Meisel C. Clinical manifestation of mannose-binding lectin deficiency in adults independent of concomitant immunodeficiency. *Hum Immunol.* 2009 Oct;70(10):809-12.
10. Manuel O, Pascual M, Trendelenburg M, Meylan PR. Association between mannose-binding lectin deficiency and cytomegalovirus infection after kidney transplantation. *Transplantation.* 2007 Feb 15;83(3):359-62.
11. Ghods FJ, Solgi G, Amirzargar AA, Nikbin B, Ghods AJ. High frequency of clinically significant infections and cytomegalovirus disease in kidney transplant recipients with serum mannose-binding lectin deficiency. *Iran J Kidney Dis.* 2009 Jan;3(1):28-33.
12. Berger SP, Roos A, Mallat MJ et al. Association between mannose-binding lectin levels and graft survival in kidney transplantation. *Am J Transplant.* 2005 Jun;5(6):1361-6.

13. Berger SP, Roos A, Mallat MJ, Schaapherder AF et al. Low pretransplantation mannose-binding lectin levels predict superior patient and graft survival after simultaneous pancreas-kidney transplantation. *J Am Soc Nephrol*. 2007 Aug;18(8):2416-22. Epub 2007 Jul 18.
14. Phair J, Muñoz A, Detels R et al. The risk of *Pneumocystis carinii* pneumonia among men infected with human immunodeficiency virus type 1. Multicenter AIDS Cohort Study Group. *N Engl J Med*. 1990 Jan 18;322(3):161-5.
15. Nickel P, Kreutzer S, Bold G et al. CD31+ naïve Th cells are stable during six months following kidney transplantation: implications for post-transplant thymic function. *Am J Transplant*. 2005 Jul;5(7):1764-71.
16. Serfling E, Chuvpilo S, Liu J, Höfer T, Palmeshofer A. NFATc1 autoregulation: a crucial step for cell-fate determination. *Trends Immunol*. 2006 Oct;27(10):461-9. Epub 2006 Aug 22.
17. Hock M, Vaeth M, Rudolf R et al. NFATc1 induction in peripheral T and B lymphocytes. *J Immunol*. 2013 Mar 1;190(5):2345-53. Epub 2013 Jan 30.
18. Giese T, Zeier M, Meuer S. Analysis of NFAT-regulated gene expression in vivo: a novel perspective for optimal individualized doses of calcineurin inhibitors. *Nephrol Dial Transplant*. 2004 Jul;19 Suppl 4:iv55-60.
19. Kowalski RJ, Post DR, Mannon RB et al. Assessing relative risks of infection and rejection: a meta-analysis using an immune function assay. *Transplantation*. 2006 Sep 15;82(5):663-8.
20. Grinyó JM, Cruzado JM, Millán O et al. Low-dose cyclosporine with mycophenolate mofetil induces similar calcineurin activity and cytokine inhibition as does standard-dose cyclosporine in stable renal allografts. *Transplantation*. 2004 Nov 15;78(9):1400-3.
21. Ibernón M, Moreso F, Moreno JM et al. Low serum mannose-binding lectin as a risk factor for new onset diabetes mellitus after renal transplantation. *Transplantation*. 2009 Jul 27;88(2):272-8.
22. Ip WK, Takahashi K, Ezekowitz RA, Stuart LM. Mannose-binding lectin and innate immunity. *Immunol Rev*. 2009 Jul;230(1):9-21.
23. Neth OW, Bacher U, Das P et al. Influence of mannose-binding lectin genotypes and serostatus in allo-SCT: analysis of 131 recipients and donors. *Bone Marrow Transplant*. 2010 Jan;45(1):13-9.

24. Thiel S, Holmskov U, Hviid L, Laursen SB, Jensenius JC. The concentration of the C-type lectin, mannan-binding protein, in human plasma increases during an acute phase response. *Clin Exp Immunol*. 1992 Oct;90(1):31-5.
25. Nielsen OL, Jensenius JC, Jørgensen PH, Laursen SB. Serum levels of chicken mannan-binding lectin (MBL) during virus infections; indication that chicken MBL is an acute phase reactant. *Vet Immunol Immunopathol*. 1999 Sep 20;70(3-4):309-16.
26. O'Riordan DM, Standing JE, Limper AH. Pneumocystis carinii glycoprotein A binds macrophage mannose receptors. *Infect Immun*. 1995 Mar;63(3):779-84.
27. Segat L, Crovella S, Comar M et al. MBL2 gene polymorphisms are correlated with high-risk human papillomavirus infection but not with human papillomavirus-related cervical cancer. *Hum Immunol*. 2009 Jun;70(6):436-9.
28. Drachenberg CB, Papadimitriou JC, Hirsch HH et al. Histological patterns of polyomavirus nephropathy: correlation with graft outcome and viral load. *Am J Transplant*. 2004 Dec;4(12):2082-92.
29. Atencio IA, Shadan FF, Zhou XJ, Vaziri ND, Villarreal LP. Adult mouse kidneys become permissive to acute polyomavirus infection and reactivate persistent infections in response to cellular damage and regeneration. *J Virol*. 1993 Mar;67(3):1424-32.
30. Han Lee ED, Kembell CC, Wang J et al. A mouse model for polyomavirus-associated nephropathy of kidney transplants. *Am J Transplant*. 2006 May;6(5 Pt 1):913-22.
31. Collard CD, Montalto MC, Reenstra WR, Buras JA, Stahl GL. Endothelial oxidative stress activates the lectin complement pathway: role of cytokeratin 1. *Am J Pathol*. 2001 Sep;159(3):1045-54.
32. Jordan JE, Montalto MC, Stahl GL. Inhibition of mannose-binding lectin reduces postischemic myocardial reperfusion injury. *Circulation*. 2001 Sep 18;104(12):1413-8.
33. Morrison H, Frye J, Davis-Gorman G et al. The contribution of mannose binding lectin to reperfusion injury after ischemic stroke. *Curr Neurovasc Res*. 2011 Feb;8(1):52-63.
34. Haynes L, Maue AC. Effects of aging on T cell function. *Curr Opin Immunol*. 2009 Aug;21(4):414-7. Epub 2009 Jun 6.

2.7 Abkürzungen

BKV	BK-Virus
CNI	Calcineurininhibitor
CsA	Ciclosporin A
HIV	Humanes Immundefizienz-Virus
IFN γ	Interferon gamma
IL-2	Interleukin 2
IS	Immunsuppressiva
NFAT	„nuclear factor of activated T-cells“
MBL	Mannose - bindendes Lektin
MFI	Mittlere fluoreszierende Intensität
MNC	Mononukleäre Zellen
PCP	Pneumocystis jirovecii - Pneumonie
PVAN	Poliomavirus assoziierte Nephropathie
RTE	„recent thymocyte escapers“
TZR	T-Zellrezeptor

2.8 Abbildungen

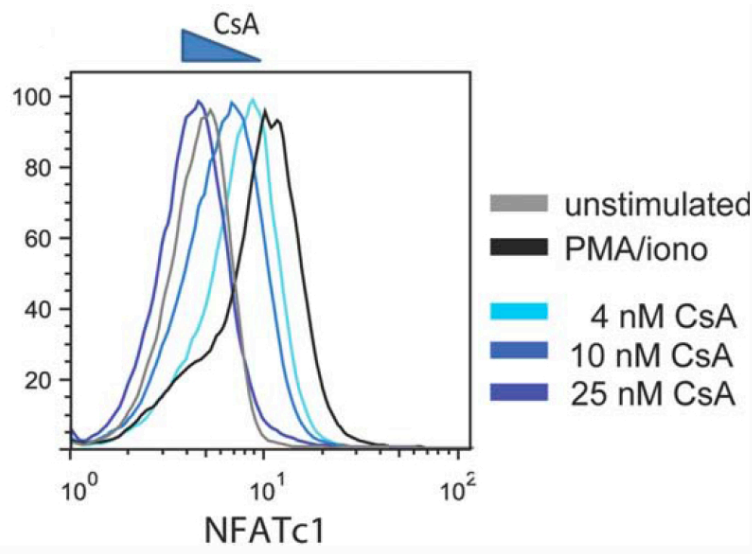


Abbildung 1: NFATc1 ist in der Durchflusszytometrie messbar. Isolierte CD4+ Zellen wurden 6 Stunden mit PMA/Ionomycin stimuliert. NFATc1-Expression wurde im Durchflusszytometer gemessen. Repräsentative Daten eines Experiments (von insgesamt drei) werden gezeigt.

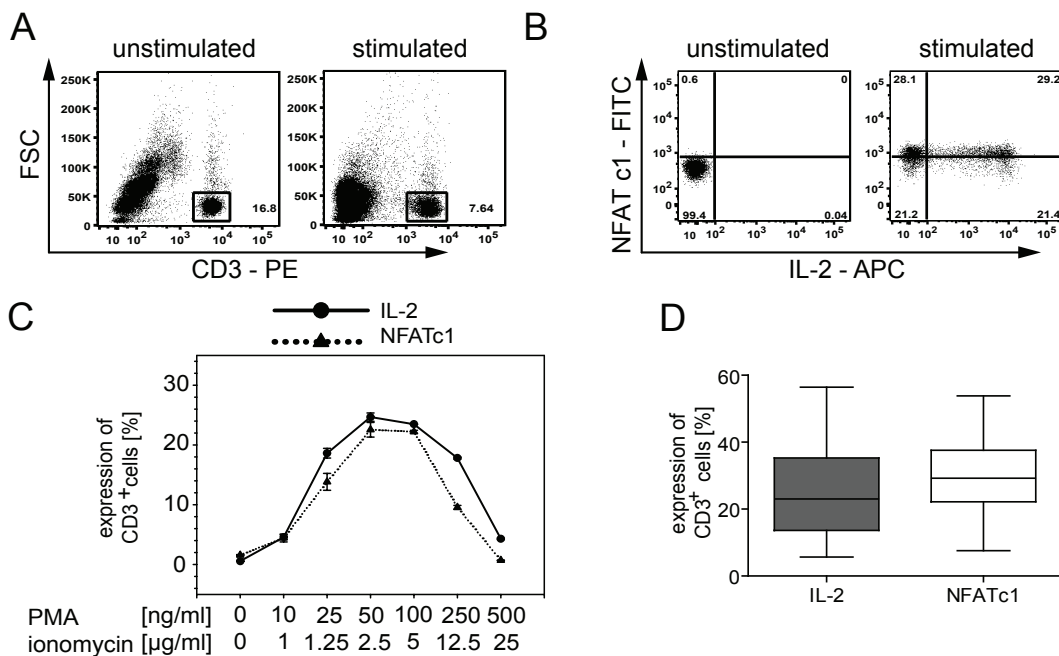


Abbildung 2: Durchflusszytometrische Messung von NFATc1 und IL-2 in T-Zellen aus stimuliertem Vollblut. (A, B) Proben aus Vollblut wurden 5 Stunden stimuliert (50 ng/ml

PMA/ 2.5 $\mu\text{g/ml}$ Ionomycin) oder nicht stimuliert. Nach Lyse der Erythrozyten wurden die übrigen Zellen permeabilisiert und gefärbt (CD3-FITC, intrazellulär IL-2-APC und NFATc1-PE). (A) Auswahl der CD3⁺ T-Zellen in einem repräsentativen Dot Plot. (B) Anzahl der IL-2 und NFATc1 produzierenden Zellen in einer Auswahl von CD3⁺ Zellen in einem repräsentativem Dot Plot. (C) IL-2 und NFATc1-Expression von CD3⁺ Zellen eines gesunden Probanden bei verschiedenen PMA/Ionomycin Konzentrationen (ein repräsentativer Dot Plot aus drei Versuchen). (D) Vollblutproben von gesunden Probanden wurden mit 2.5 $\mu\text{g/ml}$ PMA und 50 ng/ml Ionomycin für 5 Stunden stimuliert. Darstellung der Durchschnittswerte mit Standardabweichung der Anzahl IL-2 und NFATc1 produzierenden CD3⁺ Zellen (n=38 für IL-2; n=19 für NFATc1).

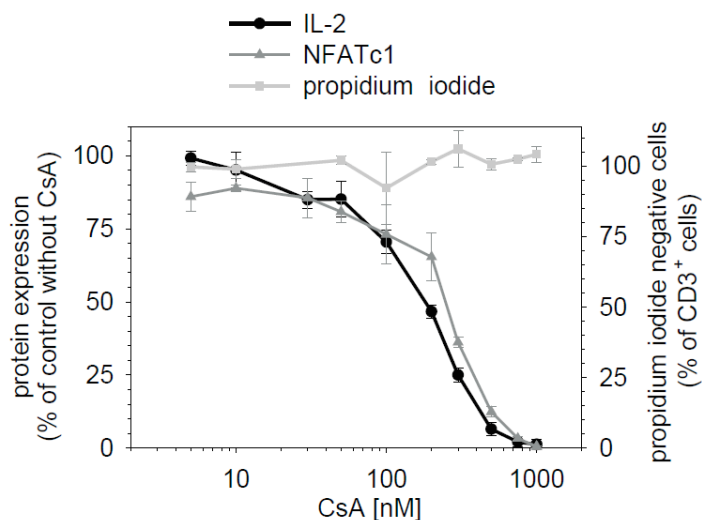


Abbildung 3: CsA-Behandlung von Vollblutproben reduziert die NFATc1- und IL-2-Expression. Die Proben wurden, wie in Abbildung 2 beschrieben, behandelt und mit unterschiedlichen CsA-Konzentrationen versetzt. Die Messungen von Propidiumiodid wurden in parallelen Proben durchgeführt. Die normalisierte Anzahl von NFATc1 und IL-2 produzierenden Zellen, wie auch die Anzahl der Propidiumiodid negativen CD3⁺ Zellen, ist im Diagramm als Durchschnittswert mit Standardabweichung (IL-2-Expression n= 5-17, NFATc1-Expression n= 3-15) angegeben. Die größte Anzahl an Proben wurden bei 100nM und 200nM gemessen; bei den Propidiumiodid-Färbungen ist jeweils n=3.

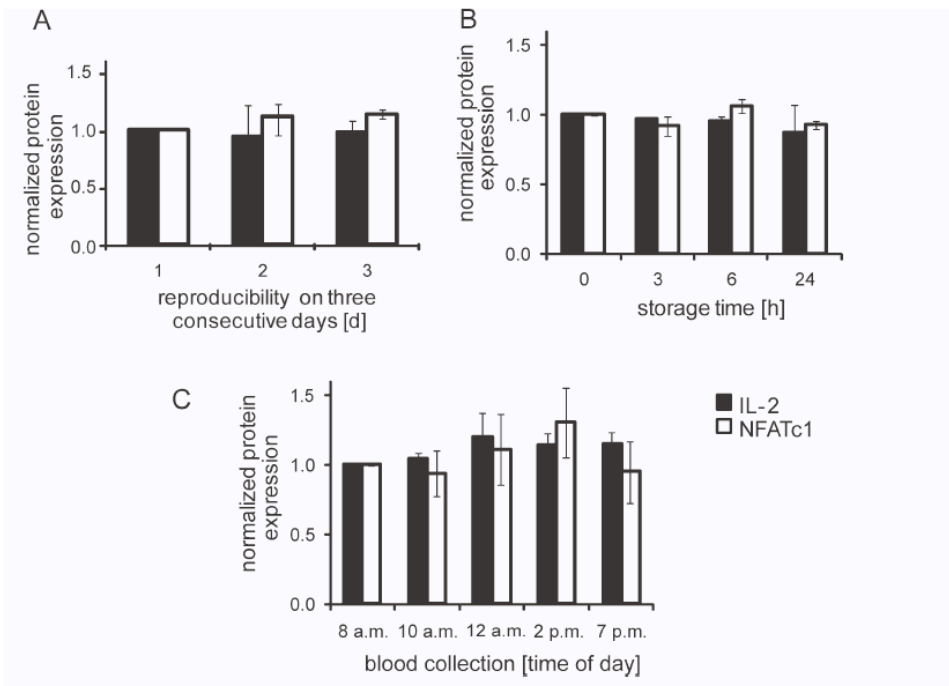


Abbildung 4: Normalisierte IL-2- und NFATc1-Expression in CD3+ Lymphozyten. Vollblutproben wurden stimuliert und gefärbt wie in Abbildung 2 beschrieben. Die Expression wurde in (A) auf Tag 1 normalisiert, in (B) auf 0 h Lagerungszeit und in (C) auf 8:00 a.m. Entnahmezeit. Die Daten sind als Durchschnittswerte mit Standardabweichung von 3 (A), 3 (B) und 5 (C) gesunden Probanden dargestellt.

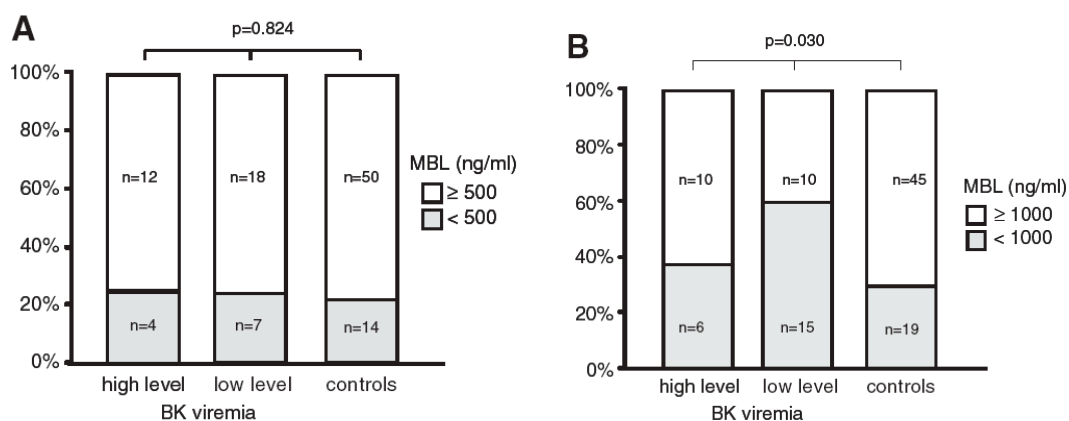


Abbildung 5: Anzahl der Patienten mit MBL-Mangel in den verschiedenen Patientengruppen: (A) Patienten mit hoher BK-Viruslast ($>10^4$ Kopien/ml über mind. 3 Wochen), Patienten mit niedriger Viruslast ($<10^4$ Kopien/ml oder $>10^4$ Kopien/ml über weniger als 3 Wochen) und Kontrollpatienten ohne BK-Virusreaktivierung. (B) Anzahl der Patienten mit partiellem MBL-Mangel in den verschiedenen Patientengruppen.

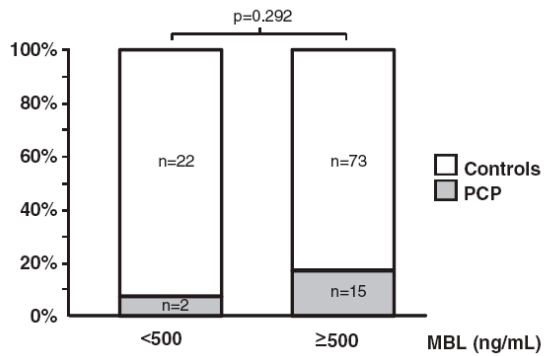


Abbildung 6: Aufteilung der Patienten mit MBL-Mangel in den Gruppen der PCP-Patienten und der Kontrollpatienten.

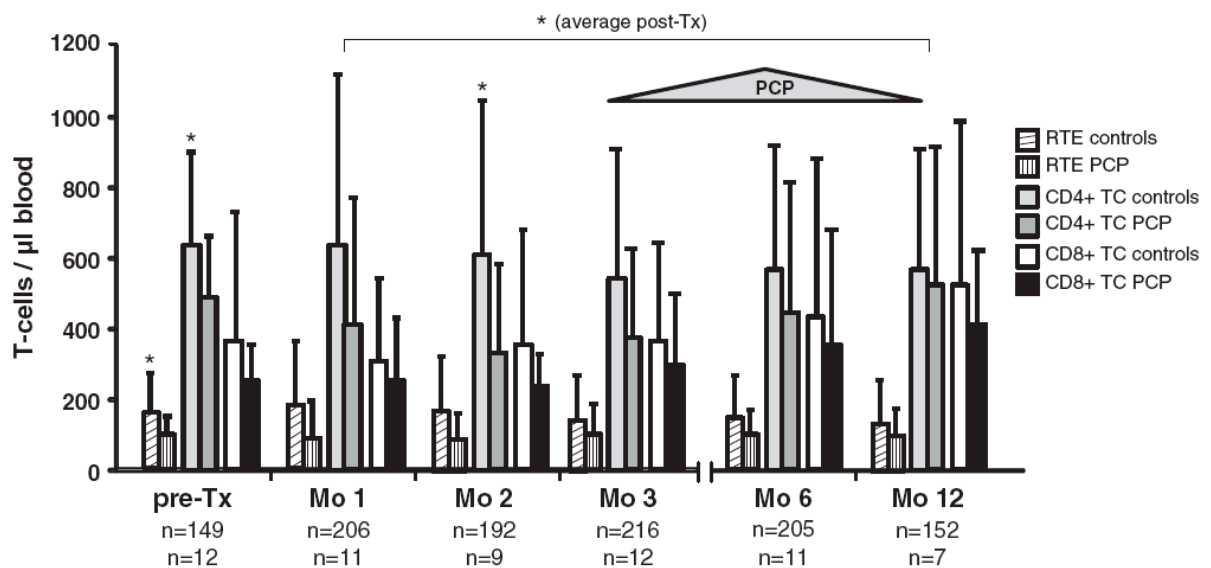


Abbildung 7: Absolute Anzahl der ‚RTE‘ - CD31+ CD45RA+ CD4+ Zellen, der CD4+ Zellen und der CD8+ Zellen vor und nach Nierentransplantation bei Patienten mit und ohne PCP. PCP trat im Median 192 Tage nach Transplantation auf (zwischen 124 bis 398 Tagen). *p<0,05.

3 Eidesstattliche Versicherung

„Ich, Peter Liman, versichere an Eides statt durch meine eigenhändige Unterschrift, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema: „Pharmakodynamisches Immunmonitoring und Infektionsvorbeugung bei Patienten nach Nierentransplantation“ selbstständig und ohne nicht offengelegte Hilfe Dritter verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel genutzt habe.

Alle Stellen, die wörtlich oder dem Sinne nach auf Publikationen oder Vorträgen anderer Autoren beruhen, sind als solche in korrekter Zitierung (siehe „Uniform Requirements for Manuscripts (URM)“ des ICMJE -www.icmje.org) kenntlich gemacht. Die Abschnitte zu Methodik (insbesondere praktische Arbeiten, Laborbestimmungen, statistische Aufarbeitung) und Resultaten (insbesondere Abbildungen, Graphiken und Tabellen) entsprechen den URM (s.o) und werden von mir verantwortet.

Meine Anteile an den ausgewählten Publikationen entsprechen denen, die in der untenstehenden gemeinsamen Erklärung mit dem/der Betreuer/in, angegeben sind. Sämtliche Publikationen, die aus dieser Dissertation hervorgegangen sind und bei denen ich Autor bin, entsprechen den URM (s.o) und werden von mir verantwortet.

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

Datum

Unterschrift

4 Anteilserklärung

Peter Liman hatte folgenden Anteil an den folgenden Publikationen:

Publikation 1:

Brandt C*, **Liman P***, Bendfeldt H, Mueller K, Reinke P, Radbruch A, Worm M, Baumgrass R. Whole blood flow cytometric measurement of NFATc1 and IL-2 expression to analyze cyclosporine A-mediated effects in T cells. Cytometry A. 2010 Jul;77(7):607-13.

PMID: 23684946

Impact Factor: 3,711

*der Anteil dieser Autoren ist gleichwertig

Beitrag im Einzelnen (60%): Probengewinnung und Blutentnahmen; Planung, Durchführung und Etablierung der durchflusszytometrischen Versuche; Analyse und Auswertung der Versuchsergebnisse; Studienentwurf; Schreiben des Manuskripts.

Publikation 2:

Liman P, Babel N, Schachtner T, Unterwalder N, König J, Hofmann J, Reinke P, Nickel P. Mannose-binding lectin deficiency is not associated with increased risk for polyomavirus nephropathy. Transpl Immunol. 2012 Mar;26(2-3):123-7.

PMID: 22198424

Impact Factor: 1,520

Beitrag im Einzelnen (40%): Planung des Studiendesigns; Probenzusammenstellung und statistische Auswertung der Studienergebnisse; Schreiben des Manuskripts.

Publikation 3:

Schürmann M, Schürmann D, Schindler R, Meisel C, **Liman P**, Kruse J, Enghard P, König J, Schmidt D, Reinke P, Nickel P. Impaired thymic function and CD4 + T lymphopenia, but not mannose-binding lectin deficiency, are risk factors for Pneumocystis jirovecii pneumonia in kidney transplant recipients. Transpl Immunol. 2013 May 15.

PMID: 20583270

Impact Factor: 1,520

Beitrag im Einzelnen (15%): Planung des Studiendesigns; Beteiligung an der Studienauswertung und Korrektur des Manuskripts.

Unterschrift

5 Publikationen

5.1

Brandt C, Liman P, Bendfeldt H, Mueller K, Reinke P, Radbruch A, Worm M, Baumgrass R. Whole blood flow cytometric measurement of NFATc1 and IL-2 expression to analyze cyclosporine A-mediated effects in T cells. *Cytometry A*. 2010 Jul;77(7):607-13.

<http://dx.doi.org/10.1002/cyto.a.20928>

5.2

Liman P, Babel N, Schachtner T, Unterwalder N, König J, Hofmann J, Reinke P, Nickel P. Mannose-binding lectin deficiency is not associated with increased risk for polyomavirus nephropathy. *Transpl Immunol.* 2012 Mar;26(2-3):123-7.

<http://dx.doi.org/10.1016/j.trim.2011.12.004>

5.3

Schürmann M, Schürmann D, Schindler R, Meisel C, Liman P, Kruse J, Enghard P, König J, Schmidt D, Reinke P, Nickel P. Impaired thymic function and CD4 + T lymphopenia, but not mannose-binding lectin deficiency, are risk factors for *Pneumocystis jirovecii* pneumonia in kidney transplant recipients. *Transpl Immunol.* 2013 May 15.

<http://dx.doi.org/10.1016/j.trim.2013.05.003>

6 Lebenslauf

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

7 Komplette Publikationsliste

1. Brandt C*, **Liman P***, Bendfeldt H, Mueller K, Reinke P, Radbruch A, Worm M, Baumgrass R. Whole blood flow cytometric measurement of NFATc1 and IL-2 expression to analyze cyclosporine A-mediated effects in T cells. *Cytometry A*. 2010 Jul;77(7):607-13.

*der Anteil dieser Autoren ist gleichwertig

2. Scuda N, Hofmann J, Calvignac-Spencer S, Ruprecht K, **Liman P**, Kühn J, Hengel H, Ehlers B. A novel human polyomavirus closely related to the african green monkey-derived lymphotropic polyomavirus. *J Virol*. 2011 May;85(9):4586-90.

3. **Liman P**, Babel N, Schachtner T, Unterwalder N, König J, Hofmann J, Reinke P, Nickel P. Mannose-binding lectin deficiency is not associated with increased risk for polyomavirus nephropathy. *Transpl Immunol*. 2012 Mar;26(2-3):123-7.

4. Schürmann M, Schürmann D, Schindler R, Meisel C, **Liman P**, Kruse J, Enghard P, König J, Schmidt D, Reinke P, Nickel P. Impaired thymic function and CD4 + T lymphopenia, but not mannose-binding lectin deficiency, are risk factors for *Pneumocystis jirovecii* pneumonia in kidney transplant recipients. *Transpl Immunol*. 2013 May 15.

8 Danksagung

An erster Stelle möchte ich meiner Doktormutter Frau Prof. Dr. med. Petra Reinke für ihre fachliche, materielle und mentale Hilfe und ihr Vertrauen danken. Ohne ihre liebenswerte und umfassende Betreuung wäre diese Arbeit nicht möglich gewesen.

Weiterhin danke ich Herrn Prof. Dr. med. Dieter Volk und dem Institut für Medizinische Immunologie, sowie Frau PD Dr. Ria Baumgraß (DRFZ) für die kompetente Unterstützung und die Bereitstellung der Laborräume und Materialien.

Besonders möchte ich mich bei den ehemaligen und aktuellen Mitgliedern der AG Reinke und der AG Baumgraß für die vielen fachlichen und nicht fachlichen Diskussionen, sowie für die harmonische und angenehme Laboratmosphäre bedanken.

Ganz herzlich danken möchte ich hier Frau Dr. Claudia Brandt für die Einführung in die methodische Laborarbeiten und die erfolgreiche Kooperation.

Ein ganz besonderer Dank gilt Herrn Dr. med. Peter Nickel für seine freundliche und geistreiche Zusammenarbeit in der Nierentransplantationsambulanz.

Nicht zuletzt danke ich meiner Familie für die langjährige und ausdauernde Unterstützung.