

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

DISSERTATION

**Die immunologischen Effekte der Influenza-Vakzinierung nach allogener
Nierentransplantation**

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

vorgelegt der Medizinischen Fakultät der Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Ali Yahyazadeh

aus Teheran

Gutachter: 1. Prof. Dr. med. Hans-Dieter Volk
2. Prof. Dr. med. Dr. h.c. Uwe Heemann
3. Priv.-Doz. Dr. med. Manfred Lehmann

Datum der Disputation: 26.09.2008

Meinen Eltern und meinem Bruder

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

Ak	Antikörper
BSA	„bovine serum albumin“= Rinderserum-albumin
CBA	Cytemetric Bead Array (Becton Dickinson)
CD	„Cluster of differentiation“, Internationale Nomenklatur Oberflächenantigene
CMV	Zytomegalievirus
CO ₂	Kohlendioxid
d 0, 7, 28	Tag 0, 7, 28
ELISA	„enzyme-linked immunosorbent assay“
ELISPOT	„enzyme-linked immunosorbent spot“
EBV	Epstein-Barr-Virus
et al.	und Mitarbeiter
FACS	„fluorescence activated cell sorting“= Fluoreszenzaktiviertes Zellsortierung
FAM	6-Carboxyfluorescein
FITC	Fluoreszeinisothiozyanat
FKS	Fötale Kälber Serum (hitzeinaktiviert)
FSC	forward scatter Vorwärtsstreulicht
g	Erdbeschleunigung ($g=9,81\text{m/s}^2$)
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
HA	Hämagglutinin
HBV	Hepatitis-B-Virus
HPRT	Hypoxanthin-Phosphoribosyl-Transferase
HCV	Hepatitis-C-Virus
IFN- γ	Interferon-gamma
IgG, IgA	Immunglobulin G, Immunglobulin A
IL-1	Interleukin-1
IL-2	Interleukin-2
IL-8	Interleukin 8
IL-10	Interleukin 10
ILI	Influenza-like illness
IP-10	Interferon inducible protein- 10

LCMV	Lymphozytäres Choriomeningitisvirus
NA	Neuraminidase
NFAT	Nuclear factor of Activated T-Cells
NFkB	Nuclear Factor of Kappa B
NTX-Ambulanz	Nierentransplantationsambulanz
mAk	monoklonaler Antikörper
MHC	„major histocompatibility complex“, Haupthistokompatibilitätskomplex
MMLV	Moloney Murine Leukemia Virus
RPMI-Medium	Zellkulturmedium für Leukozyten (benannt nach dem Roswell Park Memorial Institute, Buffalo, NY, USA an der die Formulierung entwickelt wurde)
RT	Raumtemperatur
RS-Virus	Respiratory syncythial virus
PBS	Phosphate Buffered Saline
PHA	Phytohämagglutinin (Mitogen zur T-Zellstimulation)
SD	(engl.: standard deviation) Standardabweichung
SLE	Systemischer Lupus Erythematoses
TAMRA	6-Carboxy-Tetramethyl-Rhodamin
TCR	T-Cell-Receptor (T-Zellrezeptor)
TNF- α	Tumor-Nekrose-Factor α
TGF- β	Tumor-Growth-Factor β
ToR	Target of Rapamycin

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	2
Abstract	1
1.1. Infektionen bei Transplantationspatienten.....	2
1.1.1. Zytomegalie-Virus	5
1.1.2. Epstein-Barr Virus.....	6
1.1.3. Hepatitis B und Hepatitis C Viren.....	7
1.1.4. Ambulant erworbene virale Infektionen.....	8
1.2. Influenza Infektionen und Infektionen bei Transplantationspatienten	9
1.2.1. Virologie.....	9
1.2.2. Pathogenese und Klinik.....	11
1.2.3. Therapie.....	13
1.3. Infektionen und Abstoßungsreaktionen	14
1.4. „Kreuzreaktivität“ und „Bystander-Aktivierung“.....	15
1.5. Die Impfung- Vorteile und Nachteile?.....	17
1.6. Problemstellung.....	22
1.7. Studiendesign.....	23
2. Material und Methoden	25
2.1. Influenzaimpfstoff.....	25
2.2. Antikörperbestimmungen.....	25
2.3. Zytokin-Sekretions-Assay aus Vollblutüberständen.....	28
2.4. Influenza- und Recall-Antigen-spezifische T-Zellfrequenzen.....	31
2.4.1. Präparation mononukleärer Zellen (PBMC) aus venösem Blut.....	33
2.4.2. Durchflusszytometrische Analysen.....	34
2.4.3. Ablauf der ELISPOT-Experimente.....	35
2.5. Monozytäre HLA-DR-Expression.....	39
2.6. Semiquantitative mRNA-Expression von Aktivierungsmakern im Urin (RT-PCR).....	41
2.6.1. Probengewinnung und Isolation der mRNA aus Urinzellsediment.....	43
2.6.2. Transkription der mRNA in cDNA.....	44
2.6.3. Real-Time RT-PCR.....	45

2.7.	Statistik und Darstellung der Ergebnisse.....	51
3.	Ergebnisse	52
3.1.	Humorale Immunantworten nach Influenza-Impfung.....	53
3.2.	Zelluläre Influenza-spezifische Immunantworten nach Influenza-Impfung.....	59
3.2.1.	Interferon- γ -Sekretion.....	59
3.2.2.	TNF- α -Sekretion.....	61
3.2.3.	Interleukin-10-Sekretion.....	63
3.2.4.	Interleukin-2-Sekretion.....	65
3.3.	Influenza-spezifische Memory-T-Zellfrequenzen nach Impfung.....	67
3.4.	Zeichen der systemischen Bystander-Aktivierung nach Impfung.....	70
3.4.1.	Bystander-Aktivierung der T-Zellantwort.....	70
3.4.2.	Monozytäre HLA-DR Expression.....	72
3.5.	Konsequenzen im Transplantat	73
3.5.1.	Realtime-RT-PCR aus den Urinproben der Patienten.....	73
3.5.2.	Serum-Kreatinin-Konzentrationen.....	75
4.	Diskussion	77
4.1	Lassen sich Influenza-spezifische humorale Immunantworten bei nierentransplantierten Patienten nach Impfung messen?.....	78
4.2	Lassen sich Influenza-spezifische zelluläre Immunantworten bei nieren- transplantierten Patienten nach Impfung messen?.....	80
4.2.1.	Zytokinsekretion aus Vollblutüberständen.....	80
4.2.2.	Influenza-spezifische T-Memory-Zellfrequenzen.....	81
4.3.	Lassen sich Bystander-Aktivierungen bei nierentransplantierten Patienten nach Impfung messen?.....	83
4.4.	Gibt es Konsequenzen für das Transplantat ?.....	87
4.5.	Gibt es Alternativen zur Impfung?.....	89
4.6.	Einschränkungen und Ausblicke.....	92
5.	Zusammenfassung.....	93
I.	Literatur.....	95
II.	Danksagung.....	109
III.	Lebenslauf.....	110

IV. Veröffentlichungen und Kongressbeiträge.....	111
V. Selbstständigkeitserklärung.....	112

Abbildungen und Tabellen

Abbildungen:

Abbildung 1:	Spezifische Infektionen zu verschiedenen Zeiten nach Organtransplantation.....	4
Abbildung 2:	Das Influenza-A-Virus.....	10
Abbildung 3:	Schematische Darstellung der Influenza Impfung/Infektion.....	19
Abbildung 4:	Studiendesign.....	24
Abbildung 5:	Schematische Darstellung des ELISA (Enzyme-linked immunosorbent Assay)	27
Abbildung 6:	Schematische Darstellung des Cytometric Bead Array CBA.....	30
Abbildung 7:	Schematische Darstellung des in dieser Studie Verwendeten ELISPOT(Enzyme-linked immunosorbent spot).....	32
Abbildung 8:	Schematische Darstellung des Prinzips der realtime- RT-PCR..	47
Abbildung 9:	Demographie der Transplantationspatienten.....	52
Abbildung 10:	Anti-Influenza A IgG Anstieg bei den Patienten.....	54
Abbildung 11:	Anti-Influenza B IgG Konzentrationen bei den Patienten	55
Abbildung 12:	Anti-Influenza A IgG Anstieg bei den Kontrollprobanden.....	56
Abbildung 13:	Anti-Influenza B IgG Anstieg bei den Kontrollprobanden.....	57
Abbildung 14:	Anti- Influenza A Antikörperkonzentrationen Patienten und Kontrollprobanden im Vergleich.....	58
Abbildung 15:	Anti- Influenza B Antikörperkonzentrationen Patienten und Kontrollprobanden im Vergleich.....	58
Abbildung 16:	Erhöhte Influenza-spezifische Interferon- γ Sekretion 7 Tage nach Influenza-Impfung (Transplantationspatienten & Kontrollprobanden).....	61
Abbildung 17:	Erhöhte Influenza-spezifische TNF-a Sekretion 7 Tage nach Influenza-Impfung (Transplantationspatienten & Kontrollprobanden).....	63

Abbildung 18:	Erhöhte Influenza-spezifische Interleukin-10 Sekretion 7 Tage nach Influenza-Impfung (Transplantationspatienten & Kontrollprobanden).....	65
Abbildung 19:	Erhöhte Influenza-spezifische Interleukin-2 Sekretion 7 Tage nach Influenza-Impfung (Transplantationspatienten & Kontrollprobanden).....	67
Abbildung 20:	Signifikant erhöhte Influenza-spezifische Memory-T-Zellfrequenzen 7 Tage nach Influenza-Impfung (Transplantationspatienten & Kontrollprobanden).....	69
Abbildung 21:	Erhöhte Recall-Antigen-spezifische Memory-T-Zellfrequenzen 7 Tage nach Influenza-Impfung (Transplantationspatienten & Kontrollprobanden).....	71
Abbildung 22:	Monozytäre HLA-DR Expression nach Influenza-Impfung.....	72
Abbildung 23:	mRNA-Expressionsanstiege im Urin der Patienten 7 Tage nach der Impfung Serum-Kreatinin-Konzentrationen der Transplantationspatienten vor und nach Impfung.....	74
Abbildung 24:	Serum-Kreatinin-Konzentrationen der Transplantationspatienten vor und nach Impfung.....	75
Abbildung 25:	Theorie der Bystanderaktivierung.....	86
Tabellen:		
Tabelle 1:	Verschiedene Immunsuppressiva in der Transplantationsmedizin.....	3
Tabelle 2:	Komplikationen einer Influenza-Infektion.....	12
Tabelle 3:	Empfehlungen des CDC 2006 zur Impfung gegen Influenza A/B.....	17
Tabelle 4 :	Primer und Sonden der untersuchten Kandidatenmarker.....	49
Tabelle 5:	Deskriptive Statistiken der Influenza A IgG Messungen bei den Patienten.....	54
Tabelle 6:	Deskriptive Statistiken der Influenza B IgG bei den Patienten.....	55
Tabelle 7:	Deskriptive Statistiken der Influenza A- und B - IgG Messungen bei den Kontrollprobanden.....	56
Tabelle 8:	Deskriptive Statistiken der Interferon-γ Sekretion bei den Patienten....	60
Tabelle 9:	Deskriptive Statistiken der Interferon-γ Sekretion bei den Kontrollprobanden.....	60
Tabelle 10:	Deskriptive Statistiken der TNF-α Sekretion bei den Patienten.....	62

Tabelle 11:	Deskriptive Statistiken TNF-α Sekretion bei den Kontrollprobanden.....	62
Tabelle 12:	Deskriptive Statistiken der Interleukin-10 Sekretion bei den Patienten.....	64
Tabelle 13:	Deskriptive Statistiken der Interleukin-10 Sekretion bei den Kontrollprobanden.....	65
Tabelle 14:	Deskriptive Statistiken der Interleukin-2-Sekretion bei den Patienten.....	66
Tabelle 15:	Deskriptive Statistiken der Interleukin-2 Sekretion bei den Kontrollprobanden.....	66
Tabelle 16:	Deskriptive Statistiken der Influenza-spezifischen T-Zellfrequenzen bei den Patienten.	68
Tabelle 17:	Deskriptive Statistiken der Influenza-spezifischen T-Zellfrequenzen bei den Kontrollprobanden.....	68
Tabelle 18:	Deskriptive Statistiken der Recallantigen spezifischen T-Zellfrequenzen bei den Patienten.....	70
Tabelle 19:	Deskriptive Statistiken der Recallantigen-spezifischen T-Zellfrequenzen bei den Kontrollprobanden.....	71
Tabelle 20:	Deskriptive Statistiken der monozytären HLA-DR Expression bei den Patienten und Kontrollprobanden.....	72

ABSTRACT

Influenza infections in transplant and other immunocompromised patients are associated with high morbidity and mortality. Therefore the yearly application of influenza vaccination is recommended for patients with impaired immunological status, e.g. chronically ill patients, elderly people, etc.. In most cases the vaccination has beneficial effects. However side-effects of more or less severity and even associations to autoimmune diseases have been described in the literature. Theoretically vaccination might induce systemic T-cell bystander activation, which may even be desirable. In the case of kidney transplant patients, however, this might have serious side-effects leading to graft injury or even loss. Our study analysed the immunological and clinical effects of influenza vaccination in 10 clinically stable kidney transplant patients and 10 healthy individuals on specific and systemic immune response. Vaccination response was ascertained by influenza-specific antibody-levels. Prior vaccination, at day 7 and day 28 post vaccination, cytokine T-cell responses to influenza, to recall antigens as well as monocytic HLA-DR and influenza-specific and recall-antigen-specific memory T-cell frequencies were analysed. To assess possible consequences concerning the graft, urinary CTL-marker-mRNA expression, cytokine levels and serum creatinine were analysed in Rx-patients. Respectively only 5/10 transplant patients but 10/10 healthy probands developed protective influenza-specific antibody-levels. However, a significant increase of influenza-specific IFN- γ -secretion, memory-T-cell-frequencies and an increased response to recall antigens were found in both collectives. Interestingly, in transplant patients we observed a significant increase in monocytic HLA-DR expression, which was not found in healthy probands, suggesting systemic bystander immune activation. Additionally a >2-fold increase of urinary CTL marker-mRNA was detected in 8/10 transplant patients. Correspondingly, a transient increase in serum creatinine levels in 7/10 transplant patients were noted. In conclusion, compared to the healthy control probands, the efficacy of Influenza vaccination is impaired in transplant patients. However, almost all patients developed specific T-cell-responses suggesting some cellular protection. Moreover a large proportion of transplant patients develop bystander activation as well as the induction of intra-graft immune activation. Remarkably, this intra-graft activation resulted in transient increase of serum-creatinine on most of transplant patients which actually was distinct and long-lasting in one patient only. Our data suggests that renal transplant patients who develop an increase of more than 10% in serum creatinine following influenza vaccination should be intensely, clinically and immunologically, monitored.

1. Einleitung

1.1. Infektionen bei Transplantationspatienten

Die Transplantation ist in vielen Fällen die Methode der Wahl bei einer irreversiblen Organschädigung. In den letzten Jahrzehnten sind die Kurzzeitergebnisse in der Transplantationsmedizin fortwährend verbessert worden. Dank der vielen Errungenschaften in der chirurgischen Technik, der immunsuppressiven Therapie und durch das effektive Management von infektiösen Komplikationen ist es nun in vielen Fällen möglich, durch eine Transplantation am Ende einer chronischen Erkrankung, ein „normales“ Leben durch ein neues Organ zu führen. Neben den akuten und chronischen Abstoßungsreaktionen und Infektionen, stellen Neoplasien und Medikamentennebenwirkungen die wichtigsten Hauptgründe für die erhöhte Morbidität und Mortalität nach Transplantation dar (Hanson und Alexander, 2006). Transplantationspatienten sind aufgrund der nötigen chronischen immunsuppressiven Therapie im Vergleich zur gesunden Population anfälliger für eine Vielzahl von Infektionen (Tolkoff-Rubin et al., 1998). Diese gehören zu den häufigsten lebensbedrohenden Komplikationen bei Transplantationspatienten mit chronischer immunsuppressiver Therapie (Fishman und Rubin, 1998). Neben dem Ausmaß der iatrogenen Immunsuppression zur Vermeidung von zellulären/humoralen Abstoßungsreaktionen sind weiterhin Alter, Histokompatibilität, Ischämiezeit, und Grunderkrankung wichtige Faktoren, die eine Infektion begünstigen (Kern et al., 2005).

Die übliche Erhaltungstherapie nach Transplantation besteht vornehmlich aus einer Kombination aus Calcineurininhibitoren wie Tacrolimus oder Ciclosporin mit Kortikosteroiden oder mit Azathioprin bzw. Mycophenolat mofetil. In manchen Fällen werden initial mono- und polyklonale anti-T-Zell Antikörper (z.B. Campath-1, Anti-Thymozytengobulin (ATG), Basiliximab, etc.) zur Induktionstherapie eingesetzt. Diese Medikamente supprimieren das Immunsystem auf verschiedenen Ebenen und bewirken neben dem erwünschten Effekt auch unerwünschte Nebenwirkungen wie z.B. die größere Infektionsanfälligkeit durch eine herabgesetzte Fähigkeit adäquate Immunantworten zu generieren. Die unten aufgeführte Tabelle 1 gibt einen Überblick über die verschiedenen Angriffspunkte einiger Immunsuppressiva.

Immunsuppressivum	Klinischer Gebrauch	Wirkungsmechanismus
Kortikosteroide (z.B. Urbason , Decortin)	Basis-Immunsuppression Puls-Therapie bei Rejektionen	- Modifizierung von Antigenprozessierung und – Präsentation - Hemmung der Sekretion von IL-1, IL-2, TNF- α , IFN-g - Hemmung von NF κ B
Azathioprin (z.B. Imurek)	Basis-Immunsuppression	-Nukleosidanalogen -Hemmung von sich schnell teilenden Zellen
Calcineurininhibitoren (Ciclosporin A, Tacrolimus) (z.B. Sandimmun, Prograf)	Basis-Immunsuppression	-Calcineurinhemmung -Hemmung der Aktivierung von NFAT -Hemmung NFAT abhängigen Zytokinsynthese (IL-2, IFN-g, ..)
ToR-Inhibitoren z.B. Rapamycin	Basis-Immunsuppression	-Hemmung von mToR -Hemmung von ToR anhängigen Zytokin-induzierte Proliferation
Mycophenolate mofetil (z.B. CellCept)	Basis-Immunsuppression	-Hemmung der IMP-Dehydrogenase (Enzym der de-novo Purinsynthese) -Hemmung der IMP-ase -Hemmung der Zellproliferation

Tabelle 1. Verschiedene Immunsuppressiva in der Transplantationsmedizin. Aufgeführt sind die verschiedenen Klassen, deren klinischer Gebrauch und die verschiedenen Wirkmechanismen. Modifiziert nach: Stark et al., 2005.

Die Kombination der verschiedenen Wirkungsweisen der Medikamente reduziert die Nebenwirkungen des einzelnen und bedingt ein relativ vergleichbares Spektrum von Infektionen als Komplikation (Kotton und Fishman, 2005).

Neben bakteriellen, fungalen und in manchen Fällen auch parasitären Infektionen stellen vor allem virale Infektionen für Transplantationspatienten ein großes Problem dar.

Diese können in 4 Hauptgruppen unterteilt werden (Tolkoff-Rubin und Rubin, 1998):

1. Die Herpesvirusfamilie, insbesondere Zytomegalieviren (CMV) und Epstein-Barr-Viren (EBV).
2. Hepatitis B (HBV) und Hepatitis C Viren (HCV).
3. „community-acquired“- ambulant erworbene Infektionen mit respiratorischen Viren wie z.B. Influenza-, Parainfluenza- und RS- (respiratory syncythial) - Viren.
4. Polyoma-Viren (z.B. BK-Viren)

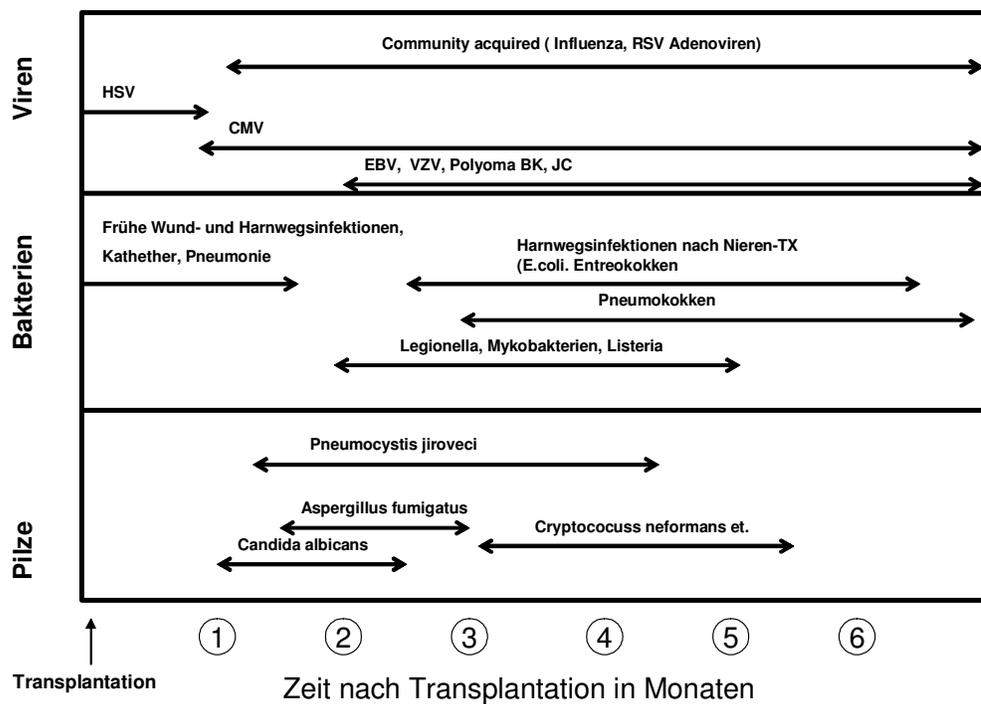


Abbildung 1: Spezifische Infektionen zu verschiedenen Zeiten nach Organtransplantation. Aufgeführt sind die verschiedenen Gruppen der Pathogene sowie das zeitliche Auftreten nach Transplantation. (Modifiziert nach: Kern et al., 2005)

Neben den Erregern der Infektionen unterscheidet man auch nach dem zeitlichen Auftreten der Erkrankungen nach der Transplantation, wobei es sich hier nur um grobe Regeln handelt. In der frühen postoperativen Phase sind die, mit dem operativen Eingriff verbunden bakteriellen und fungalen Infektionen zu nennen, wie z.B. Aspirationspneumonien, Wund- oder Katheterinfektionen. Von Bedeutung sind außerdem in dieser Phase rekurrende opportunistische Infektionen, deren Erreger sich bereits vor der Transplantation im Körper des Empfängers befanden oder die mit dem eingepflanzten Organ übertragen wurden. Die Neuinfektion oder die Reaktivierung von viralen Infektionen stellen ein großes Problem in der weiteren postoperativen Phase dar. Durch den Spender übertragene Infektionen, wie z.B. mit HBV, HCV, das *Human Immunodeficiency Virus* (HIV) sowie schon persistierende Infektionen mit z.B. *Herpes simplex-Viren* (HSV) manifestieren sich sehr früh; zumeist im ersten Monat nach Transplantation. Andere Vertreter der Herpesvirusfamilie spielen später, meist erst nach der stationären Entlassung, eine Rolle. In der weiteren postoperativen Phase (1 bis 6 Monate nach Transplantation) sind sie häufige Erreger von opportunistischen Erkrankungen, die für den Transplantationspatienten eine akute Bedrohung darstellen. Hier spielen vor allem das *Cytomegalievirus* (CMV), *Epstein-Barr-Virus* (EBV), *Varizella-Zoster Virus* (VZV) und auch andere Vertreter wie z.B. HHV-6 und HHV-7 (Fishman et al., 1998) sowie in den letzten Jahren vermehrt beschriebenen Infektionen mit Polyomaviren (BK-Virus) und dem *Parvovirus B19* bei nierentransplantierten Patienten eine wichtige Rolle (Nickeleit et al., 2004).

1.1.1. Zytomegalievirus

Das CMV ist ein behülltes doppelsträngiges DNA-Virus. Es hat einen Durchmesser von 200 nm. Das Genom besteht aus ca. 230000 Basenpaaren und kodiert 151 Gene. Unter Transplantationspatienten sind CMV eine der wichtigsten und gefährlichsten viralen Erreger. An diesen Viren lassen sich in klassischer Weise die Effekte einer viralen Infektion bei Transplantationspatienten beschreiben. Grundsätzlich wird die CMV-Infektion von einer CMV-Erkrankung differenziert. Eine Infektion ist definiert durch einen positiven Nachweis von viralen Antigenen oder Nukleinsäuren in Körperflüssigkeiten oder Gewebeproben. Mittels PCR lassen sich die Menge der Virus-DNA bestimmen. Diese erfasst jedoch sowohl ruhende als auch aktive Viren. Bei Transplantationspatienten, die chronisch immunsupprimiert sind, ist es von großer Bedeutung eine ruhende- von einer replizierenden

Infektion unterscheiden zu können um gegebenenfalls frühzeitig eine medikamentöse Therapie Virustatika wie z.B. Ganciclovir zu initiieren. Der Nachweis von pp65-Antigen positiven Lymphozyten stellt neben der quantitativen Bestimmung der Viruslast mittels *Polymerase Kettenreaktion* (PCR), hilfreiche Instrumente in der Diagnostik dar. Die Infektion mit CMV präsentiert sich oft als asymptomatische Virämie/ Antigenämie/ DNAämie oder mit unspezifischen Symptomen, wie Fieber, Neutropenie, Myalgien und Abgeschlagenheit. Die CMV Erkrankung hingegen manifestiert sich in der Regel jedoch erst in der späteren Posttransplantationsphase und zeichnet sich durch Symptome des virusspezifischen Gewebsschadens bei positivem Erregernachweis aus. So kann es zu CMV-spezifischen Entertiden, -Retinitiden, -Pneumonien, -Hepatitis, -Pankreatitiden und -Colitiden sowie Myelodepression kommen (Rubin RH, 2002). Neben diesen direkten Effekten der CMV Infektion sind auch indirekte Effekte dieser viralen Infektion bei Transplantationspatienten bekannt. Zu diesen gehören, die durch die Infektion hervorgerufene Entzündungsreaktion, die ihrerseits zu einem globalen, reaktiv immunsuppressiven, Effekt führen und somit das Risiko zur Entwicklung von weiteren potentiellen lebensbedrohlichen Superinfektionen durch andere Viren, Bakterien oder Pilze erhöhen. In den letzten Jahren zeichnet sich auch zunehmend ein erhöhtes Risiko an malignen Lymphomen, *post-transplantation lymphoproliferative disorders* (PTLD) zu erkranken und Abstoßungsreaktionen zu entwickeln ab (Kotton and Fishman, 2005).

1.1.2. Epstein-Barr Virus

Ein weiterer wichtiger Vertreter der Herpesviren Familie ist das Epstein-Barr-Virus (EBV). Bei Transplantationspatienten zeigt sich eine primäre und auch rekurrende EBV-Infektion in Form eines mononukleoseähnlichen Syndroms. Im Allgemeinen wird eine Lymphozytose mit oder ohne Lymphadenopathie oder Pharyngitis beobachtet. In schweren Fällen sind auch Meningitiden, Hepatitis und Pankreatitiden bis hin zu invasiv malignen Lymphomen beschrieben worden. EBV-Viren werden eine zentrale Rolle für die Entstehung von PTLD zugeschrieben (Opelz et al., 1993, Paya et al., 1999). PTLD stellen unter Transplantationspatienten, neben Malignomen der Haut, die zweithäufigste Neoplasie dar und sind eine potentiell lebensgefährliche Komplikation nach Transplantation (Taylor et al., 2005). Es wird davon ausgegangen, dass bis zu 10% aller Transplantationspatienten im

Verlauf ein PTLD entwickeln (Feng et al., 2003). EBV infiziert vornehmlich B-Lymphozyten und transformiert diese zu immortalisierten B-Zellen, die zu uneingeschränkter Proliferation neigen und gleichzeitig nicht mehr ihre ursprüngliche Funktion ausüben können. Durch die Immunsuppression ist es dem Organismus nicht möglich die entarteten Zellen zu eliminieren. Die Therapie des Lymphoms gestaltet sich schwierig. Zwar muss man eine Dosis-Reduktion einleiten, um die eigene zelluläre Abwehr zumindest teilweise wieder herzustellen, jedoch stellt dies für das transplantierte Organ eine Gefahr der Abstoßung dar.

1.1.3. Hepatitis B und Hepatitis C Viren

Bei Lebertransplantationspatienten können Hepatitis B Virusinfektionen zu schweren Verläufen führen und im Verlauf zur Zirrhose oder auch zur chronischen Transplantationsdysfunktion führen (Segovia et al., 2001). Neben der Re-Infektion stellt insbesondere die primäre Infektion eines HBV-negativen Spenderorgans durch einen Anti-HBc und Anti-HBs positiven Empfänger nach wie vor ein großes Problem dar, vor allem bei Lebertransplantationen. So fand man in einer Studie eine de-novo Infektionsrate von bis zu 78% (Dickson et al., 1997). Aus diesem Grund ist die Prognose für eine Organtransplantation entscheidend von einer effektiven Re- oder Infektionsprophylaxe abhängig. Um eine Infektion zu vermeiden, werden Hepatitis B Virus Hyperimmunglobuline in einer Kombination mit Lamivudin über einen Zeitraum von mindestens einem Jahr empfohlen (Chung et al., 2001). 2004 wurde bei nierentransplantierten Patienten Lamivudin-Resistenzen von HBV Viren beobachtet (Chan et al., 2004). In solchen Fällen schienen Adefovir dipivoxil und Entecavir effizient zu sein (Wai et al. 2004). Jedoch entwickelten sich auch hier Resistenzen. Zur Zeit stehen mit Tenofovir und Telbivudine neue und viel versprechende Therapiemöglichkeiten, bei fehlendem Ansprechen einer Therapie mit Adefovir, zur Verfügung (Riediger et al., 2007). Das Risiko für eine Infektion kann weiterhin durch eine aktive Immunisierung vor der Transplantation vermindert werden. Das Ansprechen der Patienten auf die Impfung variiert je nach Grunderkrankung zwischen 55% und 76%. Eine Impfung nach Transplantation ist ebenfalls möglich, jedoch sind die Ansprechraten aufgrund der immunsuppressiven Therapie erheblich niedriger (7% bis 23%) (Loinaz et al. 1997). Das Hepatitis C Virus stellt ein großes Problem vor allem bei Dialysepatienten dar. Unter nierentransplantierten Patienten ist die HCV Infektion mit einer hohen Morbidität und Mortalität assoziiert (Mahmoud et al., 2004). Selbst in Industrieländern lag, einer prospektiv-beobachtenden Studie zu Folge, die Prävalenz bei durchschnittlich

13,5% (Fissell et al., 2004). Eine Kombination aus Interferon α (IFN- α) und Ribavirin stellt die Therapie der Wahl einer Hepatitis C Infektion vor Transplantation dar. Nach der Transplantation bringt diese Therapie jedoch das Risiko einer Abstoßung mit sich (Baid et al., 2003). Neuere Berichte zeigen jedoch, dass eine Niedrigdosis IFN α /Ribavirin Gabe in manchen Fällen Infektionen mit Erfolg therapieren kann (Shu et al., 2004).

1.1.4 Ambulant erworbene virale Infektionen

Infektionen mit respiratorischen Viren stellen die häufigsten ambulant erworbenen Infektionen bei Transplantationspatienten dar (Rubin und Young, 2002). Vor allem deswegen, weil sie fast zu jeder Zeit auftreten können. Neben Adenoviren, Parainfluenza, Metapneumoviren u.a., stellen Influenzaviren die wichtigsten Erreger dieser Gruppe dar. Schätzungen besagen, dass weltweit jedes Jahr ungefähr 5% der erwachsenen Bevölkerung eine Influenza Infektion entwickeln und dass mehr als 500.000 Menschen jährlich an den Komplikationen dieser Infektion z.B. durch Pneumonien und kardiopulmonale Erkrankungen versterben (Nicholson et al., 2003). Influenzaviren betreffen nicht nur Menschen, sondern sie sind auch im Tierreich vertreten. So kommen Influenzaviren neben bei Menschen auch bei Schweinen, Pferden, Seehunden und auch Vögeln vor. Normalerweise verhalten sich diese Viren höchst speziesspezifisch und befallen nur selten andere Spezies. Insgesamt gibt es unter hunderten von Vogel-Influenzavirenstämmen nur vier, die humanpathogen sein können: H7N3, H7N7, H9N2 und H5N1, die allerdings in aller Regel keine lebensbedrohliche Infektionen verursachen. Die in den letzten Jahren beschriebenen teils tödlich verlaufenen Infektionen von Menschen mit einem hochpathogenen aviären Influenza A Viren Typ H5N1 richtet die Aufmerksamkeit aktuell wieder vermehrt auf die Influenza Infektion und die Bedeutung der Prävention.

1.2. Influenza Infektionen und Infektionen bei Transplantationspatienten

Die Influenza-Infektion ist eine sehr kontagiöse Infektion der oberen Atemwege durch Influenza Viren der Gruppe A, B oder C. Sie gehören zu der Familie der Orthomyxoviridae, zu denen auch Isaviren sowie Thogotoviren angehören. Von den genannten Viren stellen vor allem die Influenza A und – B Viren für den Menschen hochpathogene Erreger von großen Epidemien dar.

1.2.1. Virologie

Influenzaviren sind behüllte Einzelstrang- ssRNA Viren. Sie haben einen Durchmesser von ca. 120 nm und kodieren für mindestens 10 Proteine (Kamps et al., 2006):

- Polymerase A Protein (PA)
- Polymerase B1 Protein (PB1)
- Polymerase B2 Protein (PB2)
- Hämagglutinin (HA)
- Neuraminidase (NA)
- Nucleocapsidprotein (NP)
- M1 Matrix Protein (M1)
- M2 Matrix Protein (M2)
- NS1, NS2

Jedes RNA-Segment ist an ein Nukleoprotein angegliedert. Zusammen formen sie einen Ribonukleotidproteinkomplex (RNP). Während das Influenza C Virus aus sieben Segmenten besteht, sind Influenza A und –B Viren aus acht Segmenten aufgebaut. Die für die Replikation und Transkription notwendige RNA-RNA Polymerase wird durch die PA, PB1 und PB2 gebildet. Dieser Komplex ist mit den RNP verbunden. Die Funktion der nicht-strukturellen Proteine NS1 und NS2 sind noch nicht vollständig geklärt. Eine mögliche Funktion von NS1 könnte u.a. die Hemmung der IFN- γ Antwort und damit die uneingeschränkte Replikation in einer virusinfizierten Zelle. NS2 ist wahrscheinlich für den

Transport von neu synthetisierten RNP's aus dem Nukleus ins Zytoplasma verantwortlich und fördert hierdurch die virale Replikation (Kamps et al. 2006).

Die aufgeführte Abbildung gibt den schematischen Aufbau des Influenza-A-Virus wider.

DAS INFLUENZA-A-VIRUS

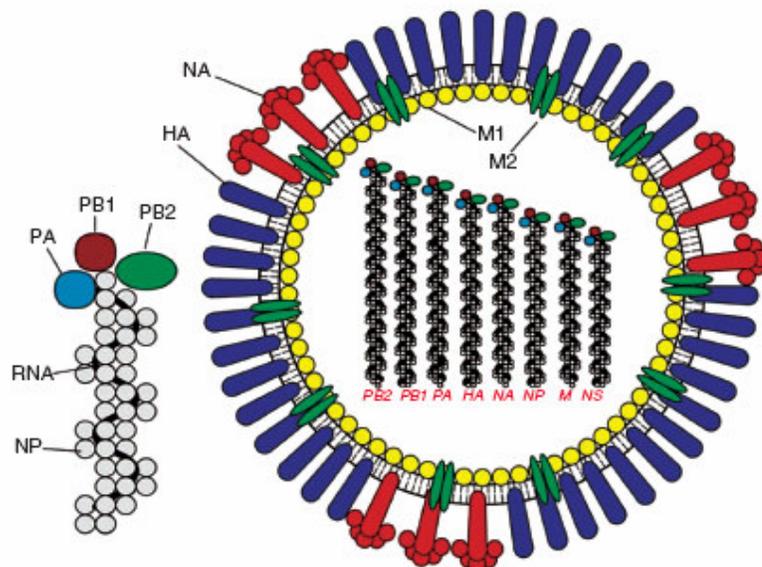


Abbildung 2: Das Influenza-A-Virus. Aufgeführt ist hier die schematische Darstellung des Influenza-A-Virus mit der Darstellung der Protein- und RNA Zusammensetzung. HA, Hämagglutinin; NA, Neuraminidase; M1, M2, Matrix-Proteine; NP, Nucleoprotein; NS, nicht-strukturelle Proteine; PA, PB1, PB2, Proteine, die bei der viralen Replikation von Bedeutung sind. Übernommen aus: Cox et al., 2003.

Die virale Hülle (auch *envelope* genannt) besteht aus einer Lipiddoppelschicht auf einer Membran (M1 Protein), welche die Hülle von innen auskleidet. Ein anderes wichtiges Protein ist das M2-Matrixprotein. Dieses bildet einen transmembranären Ionenkanal, der für die Aufnahme Nucleokapsidfreisetzung in der Zelle notwendig ist. Das M2-Matrixprotein ist das Zielmolekül von Virostatika wie Amantadin oder Rimantadin (Kamps et al., 2006). Neben diesen werden auf der Doppellipidmembran auch Hämagglutinin (HA) und Neuraminidase (NA) exprimiert.

Die HA und NA Antigene sind die beiden wichtigsten Pathogenitätsfaktoren und antigene Determinanten des Influenza A Virus. Gleichzeitig induzieren HA und NA eine protektive Immunität in Form von antikörpervermittelten (humoralen) wie auch zellvermittelten (zellulären) Immunantworten. Das Hämagglutinin wirkt durch die Bindung von zellständiger Sialinsäure und initiiert hierdurch das Andocken und die Penetration des Virus in die Zelle durch Membranfusion (Nicholson et al., 2003). Die Neuraminidase spaltet vornehmlich die glykosidischen Bindungen von Sialinsäure und bewirkt hierdurch die Ausschleusung (*release*) neuer Viren aus den infizierten Zellen (Nicholson et al., 2003).

Antigenic drift und *antigenic shift* sind zwei Phänomene, die Influenzaviren zu pathogenen Keimen machen und in regelmäßigen Abständen zu schweren Epi- und Pandemien führen (wie z.B. die Spanische Grippe 1918) (Barry et al., 2004).

Von *antigenic drift* spricht man, wenn es durch immer wieder entstehende z.B. kleine Punktmutationen bei Influenza A und B Viren, zu phänotypischen Veränderungen auf HA und/oder NA kommt. Folglich binden Antikörper von vorherigen Infektionen weniger effizient an die Viren. Diesen Vorgang nennt man *antigenic drift*. Hierdurch können neue Virenstämme selektioniert werden. *Antigenic shift* oder auch *Reassortment* kommt seltener vor und beschränkt sich nur auf Influenza A Viren. Eine günstige Voraussetzung für das *Reassortment* bietet sich wenn z.B. wenn eine Zelle mit einem humanen und einem aviären Influenzavirus co-infiziert wird. Bei der Replikation werden die verschiedenen HA und NA Subtypen vertauscht. Ein neuer Stamm entsteht, der sich aufgrund seiner „neuen“ Eigenschaften fast ungehindert in nicht immunen Organismen replizieren kann. Ein solches Szenario stellt den Ursprung für schwere Pandemien dar (Lamb et al. 2001). Neuere Untersuchungen zeigen, dass der Influenza Virus Stamm, der die verheerende Spanische Grippe von 1918 auslöste, Eigenschaften von aviären Infuenza Viren besaß (Taubenberger et al. 2005).

1.2.2. Pathogenese und Klinik

Influenzaviren werden in Form von Tröpfcheninfektionen übertragen. Sie gelangen über Zilien tragendes Epithel der oberen Atemwege in den Organismus. Bereits nach vier bis sechs Stunden beginnt die virale Replikation (Duchini et al., 2000). Durch den zytopathischen Effekt des Virus kommt es zu flächenhaften Nekrosen, die ihrerseits eine bakterielle Superinfektion begünstigen. Insbesondere Infektionen mit Staphylokokkus aureus, Hämophilus influenzae und Streptokokkus pyogenes stellen ein äußerst ernst

zu nehmendes Problem dar. In vielen Fällen führen sie zu schweren, kaum therapierbaren Pneumonien, die die Prognose erheblich verschlechtern (RKI-Ratgeber für Infektionskrankheiten, 2006). Des Weiteren sind verschiedene Komplikationen in verschiedenen Organsystemen bekannt. Insbesondere bei Kindern ist mit schwerwiegenden Komplikationen zu rechnen.

(System)	Symptom
Kinder	<ul style="list-style-type: none"> - Toxic shock like syndrome - Akute Myositis - Meningokokkeninfektion - Pseudokrupp - Reye-Syndrom bei Gabe von Acetylsalicylsäure
Herz	<ul style="list-style-type: none"> - Myokarditis, Perikarditis
Nervensystem	<ul style="list-style-type: none"> - Enzephalitis - Myelitis - Fieberkrampf - Guillain-Barré-Syndrom
Respiratorisches System	<ul style="list-style-type: none"> - Primäre Influenza Pneumonie - Superinfizierte bakterielle Pneumonie - Exazerbationen von CPD

Tabelle 2: Komplikationen einer Influenza-Infektion. Modifiziert nach: Kamps et al., Influenza Report 2006.

Die Influenza-spezifische Symptomatik (influenza-like illness, ILI) ist vor allem an

- akutem Erkrankungsbeginn mit teils hohem Fieber (>38°C)
- Kopf- sowie Muskelschmerzen
- und trockenem teilweise schmerzhaftem Husten

zu erkennen.

Ferner sind Symptome einer schweren Allgemeinerkrankung, wie Müdigkeit, Appetitlosigkeit, Schüttelfrost zu beobachten (Monto et al., 2000).

1.2.3. Therapie

Bei unkomplizierten Verläufen der Infektion reicht in den meisten Fällen eine symptomatische Therapie aus. In verschiedenen Risikogruppen, wie zum Beispiel alten oder chronisch kranken Menschen und Transplantationspatienten, spielt die medikamentöse Therapie eine adjuvante Rolle, da bei diesen Patienten von einer verminderten Effektivität durch die aktive Immunisierung ausgegangen werden muss. Neben der aktiven Immunisierung sind seit einigen Jahren potente Medikamente zur Prophylaxe und Therapie Influenza-Infektionen zugelassen. Zurzeit stehen zwei Wirkstoffgruppen zur Verfügung: a) Neuraminidase-Hemmer (Oseltamivir, Zanamivir) und b) M2-Matrixproteinhemmer (Rimantadin, Amantadin). Oseltamivir (orale Verabreichung) und Zanamivir (zur Inhalation) gehören zu der Klasse der Neuraminidase-Hemmer und wirken gegen Influenza A und – B Viren. Eine Hemmung dieses Enzyms hat eine Hemmung der Verbreitung des Virus im Organismus zur Folge. Amantadin und Rimantadin sind Derivate des Amantadins. Sie gehören zur Wirkstoffgruppe der M2 Matrixproteininhibitoren und wirken nur gegen Influenza A Viren. Eine Hemmung dieses M2-Proteins führt dazu, dass es nicht zum „uncoating“ des Virus und nachfolgend nicht zur Replikation kommt. Gegenwärtig ist, nur das Oseltamivir zur Chemoprophylaxe der Influenza zugelassen. Für Transplantationspatienten stellt eine Influenzainfektion, eine vitale Bedrohungssituation dar. Zum einen zeigt sich bei dieser Risikogruppe ein verlängerter Verlauf der Infektion (Bienzle et al. 2002). Ferner unterscheidet sich die klinische Ausprägung von der gesunder Menschen. So wurden in verschiedenen Studien eine höhere Rate an Pneumonien sowie bakteriellen und fungalen Superinfektionen (Kotton und Fishman, 2005), eine erhöhte Inzidenz von pulmonalen und auch extrapulmonalen (Vilchez et al., 2001) und neurologischen Komplikationen als bei nicht vorbelasteten Menschen beobachtet (Ljungman et al., 1993, Aschan et al., 1989). Des Weiteren sind Transplantationsdysfunktionen und eine verlängerte Verweildauer des Virus im Organismus beschrieben worden (Duchini et al., 2000).

1.3. Infektionen und Abstoßungsreaktionen

Im Jahre 1974 fanden Lopez, Simmons und Mitarbeiter in ihrer Arbeit eine Verbindung zwischen viraler Infektion und Abstoßungsreaktionen bei nierentransplantierten Patienten. Sie konnten eine klare Assoziation zwischen Infektionen mit Herpesviren (HSV, CMV, VZV) und Biopsie-gesicherten akuten Rejektionsepisoden zeigen (Lopez et al., 1974). Spätestens seitdem wird der Zusammenhang zwischen viralen Infektionen und Abstoßungsreaktionen bei Transplantationspatienten kontrovers diskutiert. Man unterscheidet hierbei zwischen akuten- und chronischen Abstoßungsreaktionen. Am Beispiel des CMV bei Nierentransplantierten sind in den letzten Jahren eine große Zahl von Arbeiten erschienen, in denen man einen deutlichen Zusammenhang zwischen einer Infektion und Abstoßungsepisoden aufzeigen konnte (Reinke et al. 1994, Sagedal et al., 2000, Mclaughlin et al., 2002). Hierbei werden verschiedene Szenarien diskutiert: CMV Viren scheinen die Expression von Oberflächenmolekülen (wie z.B. MHC Moleküle, ICAM-1, VCAM-1 und LFA3) hoch zu regulieren und somit die Immunogenität des Transplantats zu steigern, welches im Extremfall zu Rejektionen führen können (Cainelli und Vento, 2002). In tierexperimentellen Modellen auch andere Möglichkeiten beschrieben worden. Es ist bekannt, dass zurückliegende immunologische Expositionen mit verschiedenen Pathogenen zukünftige Immunreaktionen beeinflussen, welche sich auch gegen andere Ziele (Auto- oder Alloantigene) richten können (Welsh et al., 2001). Dieses Phänomen der „heterologen“ Immunität kann vornehmlich durch 2 Mechanismen erzeugt werden, die vor allem in Verbindung mit Autoimmunerkrankungen und Rejektionen diskutiert werden- Kreuzreaktivität und Bystanderaktivierung.

1.4. „Kreuzreaktivität“ und „Bystander-Aktivierung“

Der Begriff der Kreuzreaktivität, von manchen Autoren auch *molecular mimicry* genannt, geht von der Annahme aus, dass T-Zellen, die im Rahmen einer Immunreaktion gegen mikrobielle Peptide generiert werden, aufgrund von Sequenzhomologien gleichzeitig auch auf bestimmte körpereigene Antigene reagieren (Aichele et al., 1996). In diesem Zusammenhang ist Kreuzreaktivität auch in Bezug auf die Entstehung von Autoimmunerkrankungen wie z.B. Typ 1 Diabetes und multipler Sklerose nach viralen Infektionen oder Impfungen beschrieben worden. Ferner werden auch Beziehungen zu Abstoßungsreaktionen untersucht. Aus tierexperimentellen Studien an Mäusen ist bekannt, dass eine virale Infektion mit z.B. LCMV (Lymphozytäres Choriomeningitisvirus) alloreaktive T-Zellen aktivieren kann (Yang et al., 1986). Heutzutage verdichten sich die Hinweise immer mehr, dass die Antigenerkennung durch T-Zellrezeptoren nicht wie früher angenommen hochspezifisch, sondern durchaus variabel sein kann. Nach neueren Studien ist anzunehmen, dass ein T-Zell-Rezeptorklon einige hundert verschiedene Peptide erkennen kann (Hemmer et al., 1999). Folglich, so zeigen andere Studien, ist Kreuzreaktivität eher die Regel als die Ausnahme (Fujinami et al., 2006). Dabei scheinen nicht Sequenzhomologien sondern vielmehr definierbare strukturelle Motive der Grund für Kreuzreaktivität zu sein. Um eine klinisch bedeutende Manifestation zu erreichen, bedürfte es jedoch einer ganzen Reihe an Bedingungen, wie Prozessierung und Präsentation durch APC, quantitativ ausreichende Menge des Mimikry-Peptids, ausreichende Anzahl an allo- oder autoreaktiven T-Zellen. Diese kommen im Normalfall nur selten vor (Kamradt 2001). Ein zweiter Aspekt der heterologen Immunität beinhaltet den Begriff der „Bystander-Aktivierung“. Hierunter versteht man „die Aktivierung einer T-Zelle die gegen das Antigen X reagiert während einer Reaktion auf das Antigen Y“ (Ehl et al., 1997). Gegenwärtig wird im Allgemeinen angenommen, dass diese unspezifische Aktivierung durch immunstimulatorische Zytokine, zum Beispiel, durch IFN- γ oder durch Kostimulatorische Moleküle wie CD40/ CD40L oder CD80/86 erzeugt werden kann. Diese Situation kann zum einen erwünscht sein, d.h. mit einer spezifischen Stimulation gegen ein Pathogen kommt es zu einer Immunantwort gegen verschiedene Pathogene. Auf der anderen Seite kann jedoch die Stimulation zu einer unspezifischen Aktivierung von eventuell präformierten ruhenden autoreaktiven und/oder alloreaktiven T-Zellen kommen, welches sich wiederum schädlich auswirken kann.

Gerade im Hinblick auf zelluläre Abstoßungsreaktionen ist dieser Ansatz von großer theoretischer Bedeutung. Virale Infektionen führen zu einer erheblichen Aktivierung von Antigen-präsentierenden Zellen (APC). Diese können potentiell präformierte (auto)-reaktive T-Zellen aktivieren (Fujinami et al., 2006). Eine Aktivierung von zytotoxischen CD8+ T Zellen mit virus-induziertem IFN- γ ist im tierexperimentellen Modell bereits gezeigt worden (Ehl et al., 1997). Auch Influenza-Infektionen sind in der Vergangenheit des Öfteren mit Abstoßungsreaktionen in Zusammenhang gebracht worden. So fand man in einer großen retrospektiven Multicenterstudie unter nierentransplantierten Patienten, einer höhere Rate an Abstoßungsepisoden bei vorausgegangener Infektion mit Influenza B und Adenoviren (Gabriel et al., 1976). Andere Arbeiten von Keane et al., 1978 und Briggs et al., 1972 bestätigen diese Ergebnisse. Auch neuere Studien zeigen einen, insbesondere mit Hinblick auf Influenzavirus Infektionen, direkten Zusammenhang zwischen Infektion und Biopsie-gesicherten zellulären Abstoßungsreaktionen hin (vor allem nieren- und lungentransplantierte Patienten) (Vilchez et al., 2001). Ob und in wiefern Influenzaviren systemische Mechanismen induzieren, die zu Immunaktivierung bis hin zu Abstoßungsreaktionen bei Transplantationspatienten führen können, ist bis zum gegenwärtigen Zeitpunkt nicht ausreichend geklärt.

1.5. Die Impfung- Vorteile und Nachteile ?

Aus den bereits genannten Ausführungen ist zu ersehen, welche große Gefahr von Infektionen vor allem bei Risikogruppen wie z.B. Transplantationspatienten ausgehen kann. Somit ist es von größter Bedeutung eine effiziente Prävention zu betreiben. Immunisierungen sind eine kosteneffektive Methode und werden nunmehr seit einigen Jahrzehnten gegen eine Vielzahl von pathogenen Keimen durchgeführt, idealerweise um die Infektion weitestgehend zu vermeiden oder um die mit ihr einhergehenden Komplikationen zu vermindern. Im Falle der Influenza wird von internationalen Fachgremien die jährliche Influenza-Impfung gerade auch für Transplantationspatienten empfohlen (ACIP, 2006, Duchini et al., 2003). Die Impfung wird empfohlen für:

• Kinder im Alter von 6 bis 59 Monaten
• Frauen, die während einer Influenza Saison schwanger sind
• Personen \geq 50 Jahren
• Kinder und Jugendliche, die unter einer Langzeit Aspirin Therapie stehen und ein Risiko tragen ein Reye-Syndrom während einer Influenzainfektion zu entwickeln.
• Erwachsene und Kinder mit chronischen Erkrankungen der Lungen oder Herzkreislauf-Erkrankungen, einschließlich Asthma
• Erwachsene und Kinder, die regelmäßige medizinische Betreuung benötigen und/oder im vorangehenden Jahr aufgrund folgender Erkrankungen hospitalisiert wurden: Chronischen Stoffwechselerkrankungen (einschl. Diabetes mellitus), Niereninsuffizienz, Hämoglobinopathien oder Immundefizienzen (einschl. iatrogenen Immunkompromittierung bei z.B. durch medikamentöse Therapien nach Transplantation und HIV Infektionen)
• Erwachsene und Kinder, in jeglichen Zuständen, die respiratorische Probleme mit sich bringen oder eine Aspirationsgefahr darstellen. (Wirbelsäulenverletzungen, Schwindsucht, neuromuskuläre Erkrankungen, Mukoviszidose, u.a.)
• Bewohner von Altenheimen oder anderen Langzeit-Pflege Einrichtungen
• Personen, die mit Personen aus dem Risikogruppen leben oder pflegen. (Einschl. Haushälter und Babysitter)
• Medizinisches Personal

Tabelle 3. Empfehlungen des CDC 2006 zur Impfung gegen Influenza A/B. Modifiziert nach:
(Smith et al., 2006).

Im Allgemeinen gelten Influenza-Impfungen als gut verträglich. Gelegentlich kommt es kurz nach der Applikation des Impfstoffs zu lokalen Reaktionen wie Hautrötung und Schwellung an der Injektionsstelle. Systemische Reaktion wie Kopfschmerzen, Fieber, Malaise und Myalgien kommen in 5 % der Impflinge vor (Belshe et al., 2005, Potter et al., 2005, Musana et al., 2004). Diese Effekte sind auf die im Rahmen der Immunantwort produzierte IFN- γ zurückzuführen und als Zeichen der Reaktion des Immunsystems auf den Impfstoff anzusehen. Bei einer Impfung, zum Beispiel in den Deltoidmuskel, werden die geimpften Antigene entweder frei oder von Antigenpräsentierenden Zellen (APC) internalisiert und zum nächst drainierenden Lymphknoten transportiert. Die aufgenommenen Antigene werden durch MHC Klasse II-Moleküle gegenüber T-Zellen präsentiert. Durch Kontakt zu einer naiven T-Zelle wird diese Zelle zur Proliferation und Differenzierung in eine Effektor-T-Zelle angeregt. Bei Erkennung des Antigens durch eine Antigen-spezifische Memory T-Zelle kommt es innerhalb kurzer Zeit zu einer Sekretion von IFN- γ , welche sich ihrerseits rückwirkend auf die APC-Zelle auswirkt. Es findet eine Hochregulierung der MHC-Moleküle sowie kostimulatorischer Moleküle statt. Des Weiteren wird durch die Zytokine ein inflammatorisches Milieu geschaffen. Hier kommt es zu einer Präsentation und Aktivierung von CD 4+ Th1 und Th2 Helfer Zellen als auch von CD8 + zytotoxischen T-Zellen. Die Th2 Zellen stimulieren B-Zellen durch MHC Klasse II und CD40/CD40L Interaktion und induzieren die Differenzierung zur Plasmazelle und die konsekutive Produktion von spezifischen Antikörpern. Th1-T-Zellen sezernieren IFN- γ , welches sowohl stimulierend auf B-Zellen als auch auf CTL-Zellen wirkt (Holvast et al., 2007).

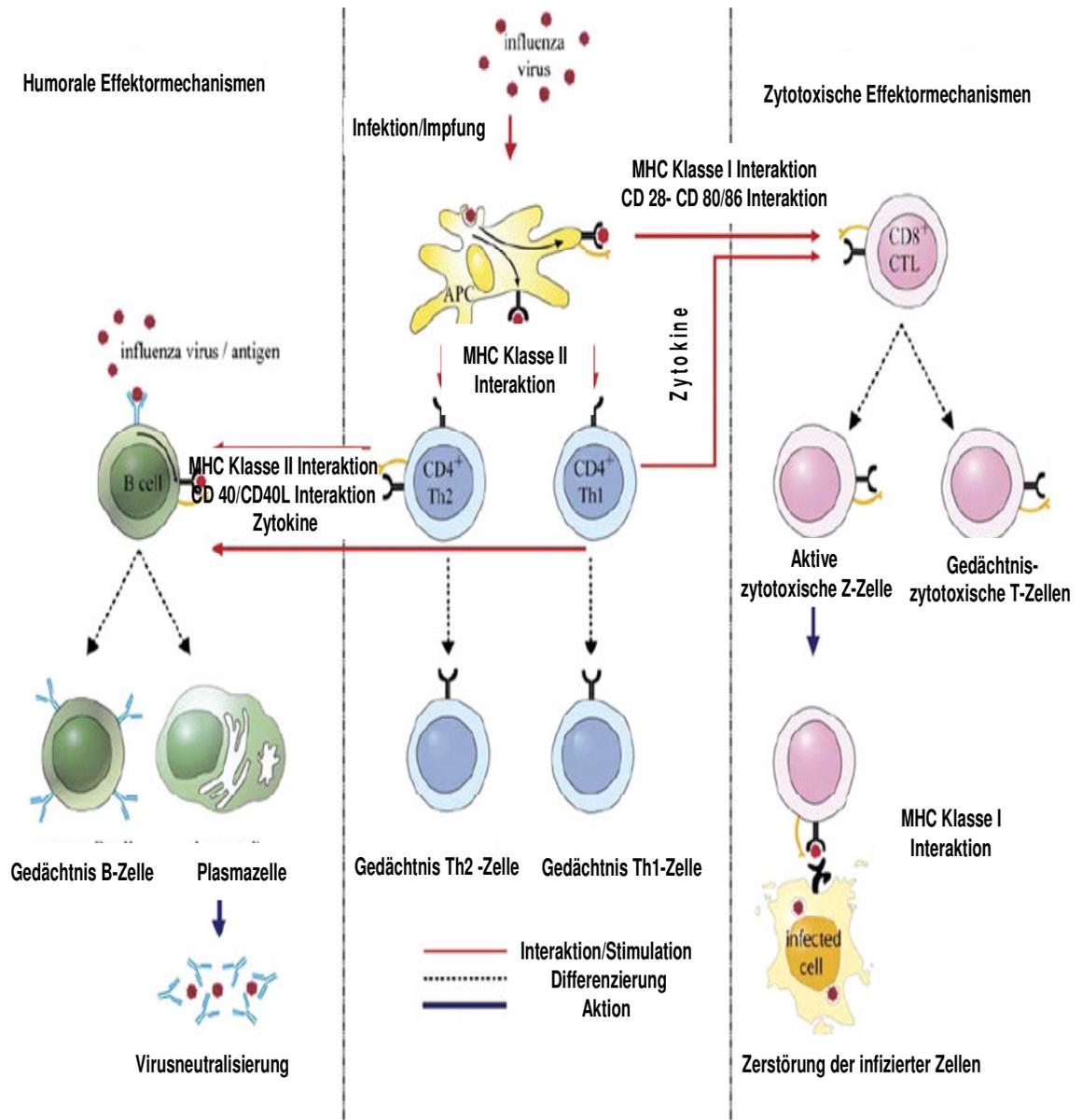


Abbildung 3: Die schematische Darstellung der Influenzainfektion/-impfung. Influenzaviren oder -Antigen infizieren oder werden von den APC aufgenommen und im Lymphknoten präsentiert. Durch Interaktionen mit verschiedenen T-Helfer Zellen und B Zellen kommt es zu einer zellulären und humoralen Immunantwort in Form von Zerstörung von infizierten Zellen, Generierung von memory T-Zellen und die Bildung von neutralisierenden Antikörpern durch Plasmazellen. (Modifiziert nach: Holvast et al., 2007)

Andere Mechanismen hingegen bewirken eine Aktivierung von zytotoxischen T-Zellen: Dies geschieht vor allem durch die Interaktion von Antigenpräsentierenden Zellen über MHC Klasse I- und Kostimulationsmolekülen, wie z.B. CD28-CD80/86. Somit wird durch die Impfung sowohl auf humoraler als auch auf zellulärer Ebene eine Antwort gegen das stimulierende Antigen induziert. Die Influenza-Impfung ist seit Jahren fester Bestandteil der Routineimpfungen von Transplantationspatienten. Eine Vielzahl von Studien sind mit Transplantationspatienten, welchen verschiedene Organe transplantiert wurden, bezüglich Ihrer Wirksamkeit und Sicherheit durchgeführt worden, mit teils widersprüchlichen Ergebnissen (Blumberg et al., 1996, Fraund et al., 1999; Burbach et al., 1999). Zusammenfassend wird angenommen, dass die Impfantwort von Patienten mit einem kompromittierten Immunsystem (wie auch Transplantationspatienten) im Vergleich zur gesunden Population vermindert ist (Stark et al., 2002). Ein anderer interessanter Aspekt an aktiven Immunisierungen liegt darin begründet, dass diese im Prinzip eine Infektion „simulieren“ ohne klinisch krank zu machen. Theoretisch ist es möglich, dass es hierbei zu Immunantworten kommt, die unter oben genannten Umständen zu Autoimmunerkrankungen führen könnten. Diese Überlegungen sind in der Literatur kritisch und ausführlich diskutiert worden (Shoenfeld und Aron-Maor, 2000). Als Beispiele hierfür können Berichte über Guillain-Barré-Syndrom nach Influenza-Impfungen (Lasky et al. 1998, Juurlink et al. 2006, Joon-Shik und Souayah, 2006) oder verschiedene Formen von Vaskulitiden (Saadoun et al., 2001, Tavadia et al., 2006, Famularo et al., 2006) genannt werden. Andere Autoren fanden ein gehäuftes Auftreten von multipler Sklerose nach Hepatitis A/B Impfungen (Herroelen et al., 1991, Marshall 1998). Neben der Infektion als Trigger für Auto- oder auch Alloreaktivität ist auch ein möglicher Zusammenhang mit Abstoßungsreaktionen bei Transplantationspatienten nach Impfung oft diskutiert worden. In einer kleinen Studie (n=8) mit herztransplantierten Patienten beobachteten Hosenpud et al. in einigen Fällen Rejektionen nach Influenza-Impfung. Interessanterweise zeigte sich bei allen, in der Studie eingeschlossenen Patienten (auch ohne Abstoßungsreaktion), eine gesteigerte Immunantwort auf endotheliale Zellen des Spenders (Hosenpud et al., 1993). Mögliche Veränderungen der Alloimmunität beim Menschen durch Impfungen sind von Roddy und Mitarbeitern in gesunden Probanden und Malignompatienten bestätigt worden (Roddy et al., 2005). In einer weiteren Studie mit nierentransplantierten Patienten beobachteten Blumberg et al. bei einigen Patienten Biopsie-gesicherte (milde bis moderate) Abstoßungsreaktionen nach Influenza-Impfung. Es gilt hervorzuheben, dass diese Reaktionen allesamt asymptomatisch waren und auf die eingeleitete Abstoßungstherapie ansprachen (Blumberg et al., 1998).

Weiterhin wiesen die Ergebnisse eines Case Reports ein weiteres Mal auf einen möglichen Zusammenhang von Abstoßungsreaktionen bei in dem Fall korneatransplantierten Patienten hin (Wertheim et al., 2006). Außer der Beobachtung eines zeitlichen Zusammenhang zwischen Impfung und Abstoßungsreaktionen blieben auch hier Fragen über kausale Zusammenhänge und zugrunde liegender Mechanismen (wie z.B. Bystander Aktivierung, molekulare Mimikry o.a.) ungeklärt.

1.6. Problemstellung

Aus den obigen Ausführungen ist zu ersehen, dass Influenza-Infektionen für Transplantationspatienten eine ernsthafte Bedrohung darstellen können. Die Infektion kann neben der mit ihren verbundenen schwerwiegenden Komplikationen auch zur Schädigung des Transplantats führen. Aus diesem Grunde stellt gegenwärtig die jährliche Influenzaschutzimpfung eine sehr gute Abwehrmaßnahme dar. Fragen zur Effektivität und Sicherheit von Influenza-Impfungen bei Transplantationspatienten sind in verschiedenen Studien untersucht worden, mit teilweise gegensätzlichen Ergebnissen. Immer wieder beschriebene Fälle von Rejektionen nach (Influenza)-Impfungen haben mancherorts zu einer gewissen „Impfscheue“ unter Transplantationsmedizinern geführt. Die gegenwärtige Datenlage lässt hierfür jedoch keine definitiven Rückschlüsse zu.

Um diesen Fragen weiter nach zugehen, untersuchten wir, unter Anwendung immunologischer und molekularbiologischer Methoden die Effekte der Influenza Impfung bei einem Kollektiv von nierentransplantierten Patienten und gesunden Probanden auf spezifische, unspezifische sowie auf das Transplantat bezogene Wirkungen.

Unser Hauptinteresse richtete sich auf die im Folgenden genannten Fragen:

- (1) Lassen sich Influenza-spezifische humorale Immunantworten bei nierentransplantierten Patienten nach Impfung messen?
- (2) Lassen sich Influenza-spezifische zelluläre Immunantworten bei nierentransplantierten Patienten nach Impfung messen?
- (3) Wie unterscheiden sich diese von denen gesunder Probanden?
- (4) Lässt sich eine Bystander-Aktivierung bei den nierentransplantierten Patienten nach Impfung messen?
- (5) Lässt sich eine Bystander-Aktivierung bei den gesunden Probanden nach Impfung messen?
- (6) Gibt es Hinweise auf eine Immunaktivierung im Transplantat?
- (7) Welches sind die Konsequenzen für das Transplantat?

1.7. Studiendesign

Es wurden insgesamt 20 Probanden/-innen und Patienten/-innen in diese Studie eingebunden und in zwei Gruppen unterteilt. Von allen Studienteilnehmern lag eine schriftliche Einverständniserklärung vor. Die Analysen sind von der lokalen Ethikkommission genehmigt worden. Die erste Gruppe setzte sich aus 10 gesunden Kontrollprobanden (5 weiblich und 5 männlich) mit einem Durchschnittsalter von 31 Jahren (SD 8,37) zusammen. Die Kontrollprobanden, die zwischen November 2003 – Juni 2004 geimpft wurden, hatten sich, bis auf einen Probanden (Proband 10), zuvor nie einer Influenza-Impfung unterzogen. Die zweite Gruppe bestand aus 10 Patienten mit stabiler Transplantatsfunktion aus dem Nierentransplantationsprogramm der Charité Universitätsmedizin Berlin, Campus Virchow Klinikum (6 männlich und 4 weiblich) mit einem Durchschnittsalter von 47,9 Jahren (SD 11,93), die im Zeitraum zwischen Anfang bis Mitte Februar 2004 geimpft wurden. Diese Patienten unterzogen sich im Rahmen der Nachsorge seit ihrer Transplantation jährlich einer Influenza-Impfung. Alle Patienten und Probanden wurden mit dem für die Influenza-Saison 2003/2004 empfohlenen Influenza-Spalt-Impfstoff (Influsplit® SSW 2003/04) geimpft. Die Impfung erfolgte durch eine Injektion in den linken oder rechten Musculus deltoideus. Insgesamt sah die Studie 3 Untersuchungszeitpunkte vor. Am ersten Untersuchungstag (Tag 0, unmittelbar vor der Impfung) und am zweiten Untersuchungstag (Tag 7) wurden von den Transplantations-patienten und den Kontrollprobanden jeweils 5,5 ml EDTA-Blut, 10 ml Heparin-Blut und 10 ml Citrat-Blut an peripheren Armvenen entnommen.

- 1- Anti- Influenza A/ B IgG-Konzentrationen (ELISA) (EDTA-Blut)
- 2- Monozytäre HLA-DR Expression (Durchflusszytometrie) (EDTA-Blut)
- 3- Influenza-spezifische Memory-T-Zellfrequenzen (ELISPOT) (Citrat-Blut)
- 4- Recall-spezifische Memory-T-Zellfrequenzen (ELISPOT) (Citrat-Blut)
- 5- Influenza spezifische Zytokin-Sekretionsassay (CBA) (Heparin-Blut)

Am 3. Untersuchungstag (Tag 28) wurden 5,5ml EDTA-Blut entnommen und auf die Influenza A/B IgG Antikörperkonzentration untersucht.

Des Weiteren wurden im Rahmen dieser Studie an Tag 0, an Tag 7 und 28 wie auch bei jedem Besuch der Transplantationspatienten in der Nierentransplantationsambulanz der Charité die Serum-Kreatinin-Konzentrationen bestimmt.

Diese Untersuchung ist als blind durchgeführte Untersuchung anzusehen, da die Proben der Patienten vollautomatisch in verschiedenen Laboren der Charité Universitätsmedizin Berlin gemessen und einem von der Nierentransplantationsambulanz genutzten Onlinedatenbank (TBase 2.0) zugeführt wurden. Um eventuelle Aktivierungen im Transplantat nachzuweisen, wurde an Tag 0 und an Tag 7 nach der Impfung jeweils 50-100 ml Mittelstrahlurin der Transplantationspatienten gesammelt und mittels RT-PCR auf die semiquantitative mRNA Expression von Aktivierungsmarkern hin untersucht.

In der folgenden Abbildung wird das Studiendesign erläutert:

Schematische Darstellung des Studiendesigns

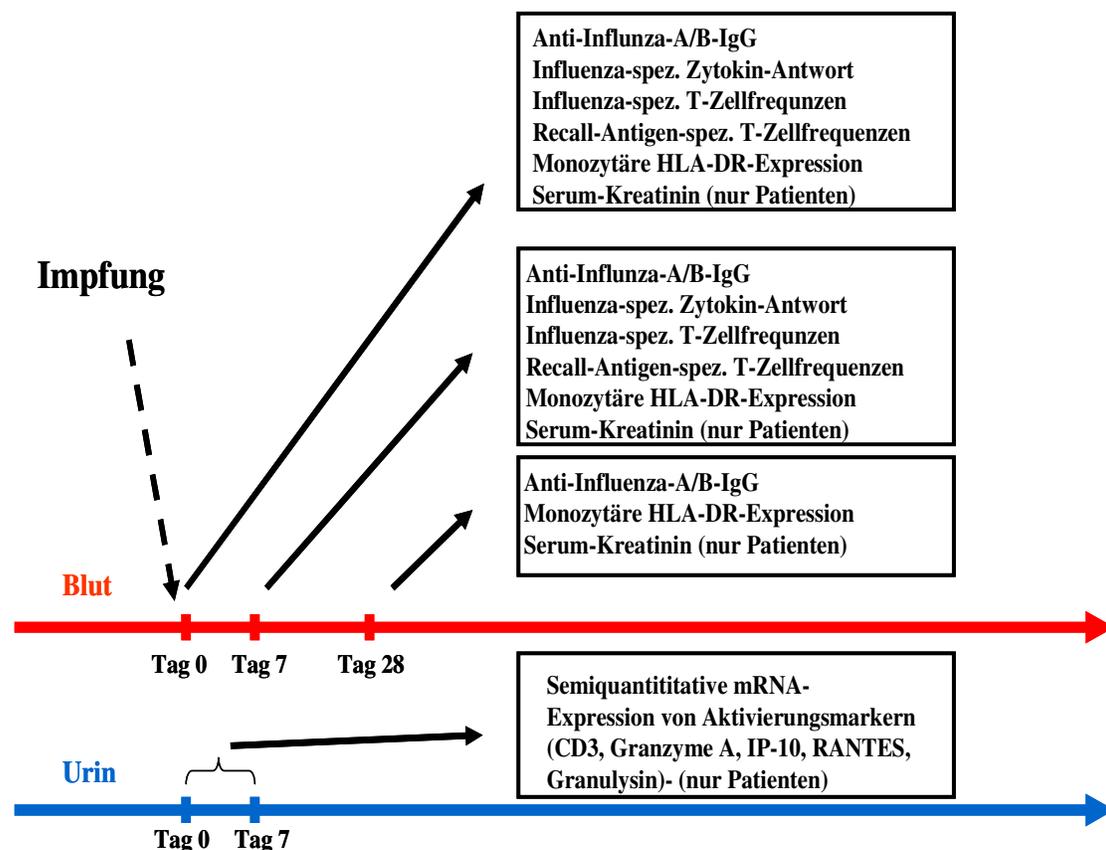


Abbildung 4: Studiendesign.

2. Material und Methoden

2.1. Influenzaimpfstoff

Bei dem in dieser Studie verwendeten Impfstoff, handelt es sich um eine Influenza-Spalt-Vakzine (Influsplit SSW® 2003/2004). Der inaktivierte Impfstoff besteht aus isolierten Oberflächenantigenen (Hämagglutinin und Neuraminidase) der Influenza A und -B Virusstämme.

Die Empfehlungen über die Zusammensetzung von Influenza-Impfstoffen werden einmal jährlich von der Weltgesundheitsorganisation (WHO) modifiziert und veröffentlicht. Auf dieser Basis enthält jede Impfdosis von 0,5 ml jeweils 15µg Hämagglutinin und Neuraminidase entsprechend der nachfolgenden Virusstämme:

- A/ New Caledonia/ 20/ 99 (H1N1)-ähnlicher Stamm (Reassortante IVR-116, abgeleitet von A/ New Caledonia/ 20/ 99)
- A/ Moscow/ 10/ 99 (H3N2)-ähnlicher Stamm (Reassortante RESVIR 17, abgeleitet von A/ Panama/ 2007/ 99)
- B/ Hong Kong/ 330/ 2001-ähnlicher Stamm (B/ Shangdong/ 7/ 97 oder B/ Hawaii/ 10/2001)

Für die Stimulationsversuche kamen dieselben Antigene zur Anwendung.

2.2. Antikörperbestimmungen

Es wurden Anti-Influenza A und B- IgG Titer bei den Studienteilnehmern gemessen. Diese Messung wurde freundlicherweise vom Institut für Virologie, Charite, CCM, Berlin, vorgenommen. Zur Anwendung kam ein Antikörper-Kit, der Firma Genzyme Virotech, GmbH, Deutschland (Influenza A/B ELISA IgG/IgM Testkit®). Es gilt zu erwähnen, dass die Messung blind vorgenommen wurde und die Untersucher weder Informationen über Patienten oder Probanden noch über die Ziele und Fragestellungen der Studie hatten. Die Vorgehensweise richtete sich hierbei strikt nach der vom Hersteller herausgegebenen Gebrauchsanleitung.

Testprinzip:

Bei dieser Untersuchung kam ein ELISA-Test (Enzyme-linked Immunosorbent Assay) zur Anwendung. Auf einer Mikrotiterplatte fixierte Antigene (bei Influenza A eine Mischung aus A/Panama/2007/99 (H3N2) RESVIR-17 und A/New Caledonia/20/99 (H1N1) IVR-116 und bei Influenza B aus dem Stamm B/Shangdong/7/97) bilden mit den im Serum befindlichen (Primär-) Antikörpern einen Immunkomplex. Nicht gebundene Antikörper werden in verschiedenen Waschschrinen entfernt. Mit diesem Komplex verbindet sich ein im Kit bereitgestellter, an Meerrettich-Peroxidase konjugierter sekundärer Antikörper. Dieser bindet an den freien Fc-Teil des primären Antikörpers. Durch weitere Waschprozesse werden eventuell weiterhin ungebundene Antikörper entfernt. Nach Zugabe einer Substratlösung, in diesem Fall TMB (Tetramethylbenzidin) entsteht durch die Enzymaktivität ein blauer Farbstoff, der nach Zugabe einer Stopplösung nach gelb umschlägt. Die Extinktionen werden von einem Photometer bei 450/620 nm gemessen. Die Intensität des gelben Farbstoffes ist proportional zur Menge der untersuchten Antikörper. Die gemessenen Antikörpertiter werden in Virotech units (VE) angegeben.

2.3. Zytokin-Sekretions-Assay aus Vollblutüberständen

Mittels der „Beadassay-Technik“ können Zytokinkonzentrationen aus Zellkulturüberständen durchflusszytometrisch bestimmt werden. Für die Messungen kam ein kommerzielles Testkit (CBA, Cytometric Bead Array Human Th1/Th2 Cytokine Kit® der Firma BD Biosciences) zur Anwendung. Es wurden die Konzentrationen von Interleukin-2, Interleukin-4, Interleukin-5, Interleukin-10 sowie TNF- α und IFN- γ im Überstand stimulierter PBMC's gemessen.

Testprinzip:

In den Grundzügen ist diese Technik dem ELISA ähnlich. Während beim ELISA eine Platte das Trägermedium für den „capture“-Antikörper darstellt, bilden beim CBA 6 verschiedene Latexkügelchen („Beads“) das Trägermedium. Für jedes Zytokin wird eine Beadpopulation mit einer bestimmten Fluoreszenzintensität geliefert. Somit ist eine spätere durchflusszytometrische Differenzierung der Beads möglich. Diese sind mit spezifischen, gegen verschiedene Antigene, wie in diesem Fall, Zytokine, gerichtete Primärantikörper bestückt. Nach Inkubation wird ein sekundärer, mit einem Fluoreszenzfarbstoff versehener Nachweisantikörper, (Phycoerythrin, PE) hinzugefügt. Nach einer erneuten Inkubation und Waschung können die Proben durchflusszytometrisch untersucht werden. Anhand der Eigenfluoreszenz der Beads und dem sekundären Nachweisantikörper ist es nun möglich, die genaue Konzentration aller untersuchten Zytokine zu messen. Hierzu werden in einem anderen Schritt Standardkurven mit bekannten Zytokinkonzentrationslösungen hergestellt und mit denen aus den Proben verglichen. Die endgültige Auswertung erfolgt mit einer entsprechenden Software (BD®CBA Software). Diese neuartige Technik bietet gegenüber anderen (ELISA-ähnlichen) Methoden folgende Vorteile: Im Vergleich zum konventionellem ELISA wird hierbei nur ein Bruchteil der Menge an Probenmaterial benötigt. Ein weiterer Vorteil des CBA liegt darin, dass hierbei Messungen von bis zu 6 verschiedenen Zytokinen gleichzeitig durchgeführt werden können. Somit bietet das CBA einen großen Zeit- und Materialvorteil gegenüber der konventionellen ELISA-Methode.

Durchführung der Experimente:

Stimulationslösung: 5 µl des Influenzaimpfstoffes wurden mit 2495 µl reinem Nährmedium (RPMI 1640) in einem Verhältnis von 1:500 verdünnt. In einem Eppendorfgesäß wurden 300µl periphervenöses Heparin-Vollbut mit 300 µl der Stimulationslösung vermischt und bei 37°C und 5% CO₂ für 24 Stunden inkubiert. Nach der Inkubation wurden die Proben bei 3000 U für 5 Minuten zentrifugiert. Anschließend wurden die Überstände vorsichtig abgenommen (zu 2 Aliquots à 100 µl) und bis zur Messung bei -80°C gelagert. Die Inkubationszeit von 24 Stunden wurde deshalb gewählt, um die in-vitro Zytokinsekretionskapazität von Memory-T-Zellen zu erfassen. Memory-T-Zellen reagieren bereits nach einer Inkubationszeit von 4-24 Stunden mit der Sekretion von Effektorzytokinen wie z.B. IFN-γ; anders als naive T-Zellen. Diese benötigen eine längere Inkubationszeit von 48 bis 72 Stunden. Es erfolgten 2 verschiedene Messreihen. Bei der ersten Messreihe wurden alle gesammelten Patientenproben auf die Zytokinsekretionskapazität hin untersucht. Die Vorgehensweise bei der Verarbeitung und Messung der Proben richtete sich hierbei strikt an die vom Hersteller herausgegebene Gebrauchsanleitung. Auch hier gilt zu erwähnen, dass die Messung der Proben verblindet erfolgte. Eine zweite Messreihe wurde mit den Probandenproben durchgeführt.

Prinzip des Cytometric Bead Array

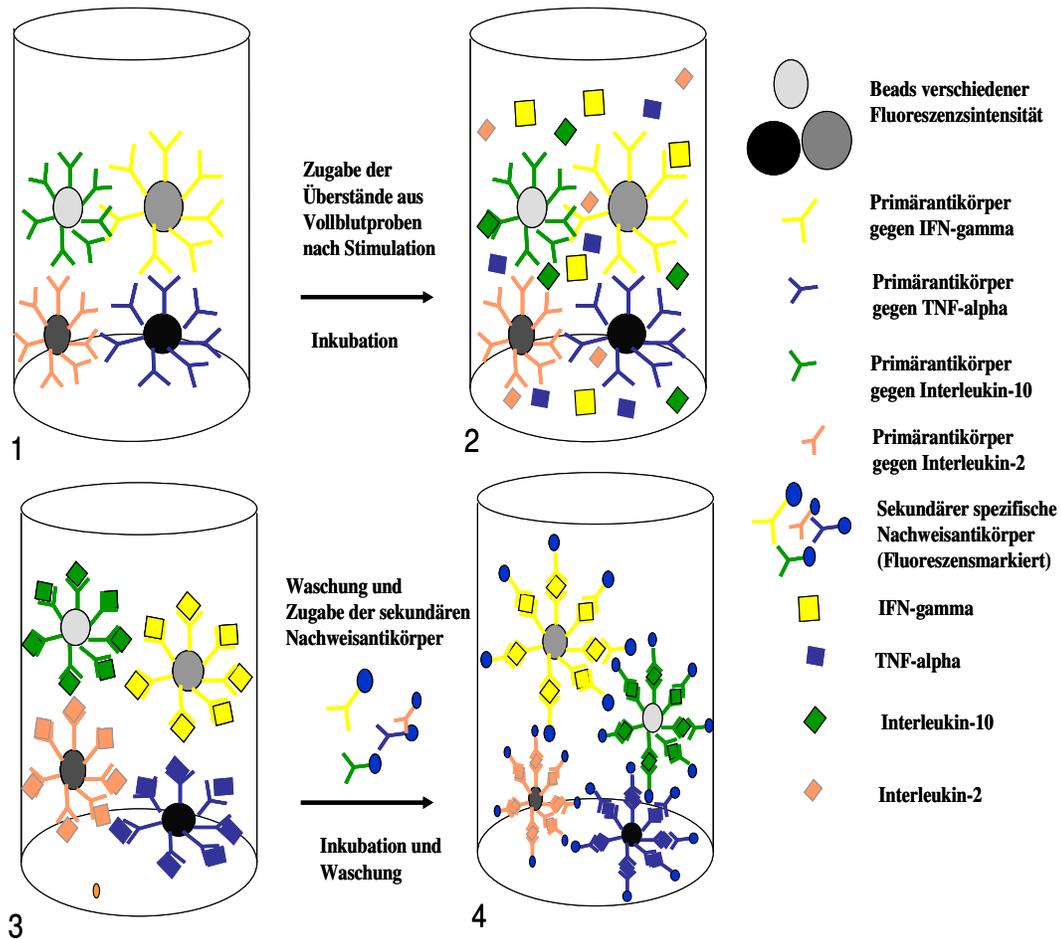


Abbildung 6 : Prinzip des Cytometric Bead Array. Eine Lösung mit verschiedenen Beads wird bereit gestellt (1). Jede Beadpopulation entspricht einem zu untersuchenden Zytokin. Die Beads sind mit gegen verschiedene Zytokine gerichtete Primärantikörpern bestückt. Die Überstände aus den Vollblutproben werden nach Stimulation hinzugefügt. Die in der Probe vorhandenen Zytokine können nun an den Primärantikörpern binden (2). Unspezifische Bindungen werden anschließend in Waschrufen entfernt. In einem weiteren Schritt wird der fluoreszenzmarkierte sekundäre Nachweisantikörper hinzugefügt und inkubiert (3). Nach einem weiteren Waschrufen kann die Suspension nun durchflusszytometrisch untersucht werden (4). Anhand der Eigenfluoreszenz der Beads und dem PE-markierten sekundären Nachweisantikörper können nun verschiedene Zytokinkonzentrationen ausgemessen werden.

2.4. Influenza- und Recall-Antigen-reaktiver T-Zellfrequenzen

Für diese Untersuchungen kam die ELISPOT-Methode (**E**nzyme-linked **I**mmunos**p**ot) zur Anwendung. Der ELISPOT misst durch den Nachweis von Zytokinen (IFN- γ , IL-2, u.a.) die Anzahl Antigen-spezifischer Memory-T-Zellen. Die Tatsache, dass diese Zellen, im Gegensatz zu naiven T-Zellen (48-72 Stunden) bereits nach 4-24 Stunden nach Antigenstimulation mit einer IFN- γ Antwort reagieren macht man sich hierbei zu Nutze. Diese Technik wird vor allem eingesetzt, um möglichst die genaue Zahl spezifisch reagierender T-Zellen zu erfassen. Ein Beispiel hierfür stellt die Messung von alloreaktiven T-Zellen dar (Heeger et al., 1999, Valujskikh et al., 2000). Andere Anwendungen sind u.a. auch Untersuchungen zu Antigen-spezifischen T-Zellen nach Impfungen (Lindemann et al., 2006). In der vorliegenden Studie ging es um die Erfassung von Influenza-spezifischen Memory-T-Zellfrequenzen nach Impfung. Eine weitere Fragestellung zielte auf die Erfassung der parallel im Rahmen dieser Immunantwort induzierten unspezifischen Aktivierung („Bystander-Aktivierung“) von T-Zellen anderer Spezifität ab. Hierbei kommt es, wie in der Einleitung erwähnt, durch verschiedene Stimuli (Zytokine, Kostimulatorische Moleküle etc.) zu einer Aktivierung von präformierten, ruhenden Memory-T-Zellen. Ein guter und praktischer Parameter für die Erfassung einer Bystanderaktivierung bildet die „Recallantigen-spezifische“ Immunantwort. Recallantigene sind körperfremde Antigene mit denen der Organismus durch vorhergehende Impfungen und/oder Expositionen bereits mehrfach Kontakt hatte und gegen die Memory-T-Zellen gebildet wurden. In dieser Studie kam ein Gemisch von verschiedenen Antigenen zur Anwendung (CMV, PPD, Tetanus/Diphtherie Toxoid und Candida Albicans). Als Negativkontrolle kamen Zellen ohne Stimulantien (nur RPMI) zum Einsatz. Als Positivkontrolle wurden die Zellen mit in RPMI-Medium verdünntem PHA (Phytohämagglutinin), einem Mitogen, zur IFN- γ Produktion angeregt. Das Experiment erstreckte sich über einen Zeitraum von 4 Tagen. Mit Immuno-bilon-p, einer synthetischen Membran, beschichtete 96-well Platten wurden hierzu verwendet. Die Membran wurde mit einem primären anti-IFN- γ Antikörper beschichtet. Während der folgenden 24-stündigen Inkubation der Zellen mit den Stimulantien, wurde das sezernierte IFN- γ in der „Umgebung“ der Zellen gebunden. Anschließend wurde ein biotinylierter, sekundärer Antikörper hinzugefügt, der die gebundenen IFN- γ Moleküle an einem anderen

Epitop verband. Unter Zugabe von Streptavidin-Peroxidase und einer Visualisierungslösung wurde eine Enzym-gekoppelte Reaktion, die in einem Farbumschlag endet, in Gang gesetzt. Auf Boden des wells wurden rote sog. „Spots“ sichtbar. Am 4. Tag konnte die Platte von einem automatisierten Lesegerät gelesen und die spots gezählt werden. Die folgende Abbildung stellt das Prinzip des ELISPOTs schematisch dar.

Enzyme-linked immunosorbent spot (ELISPOT)

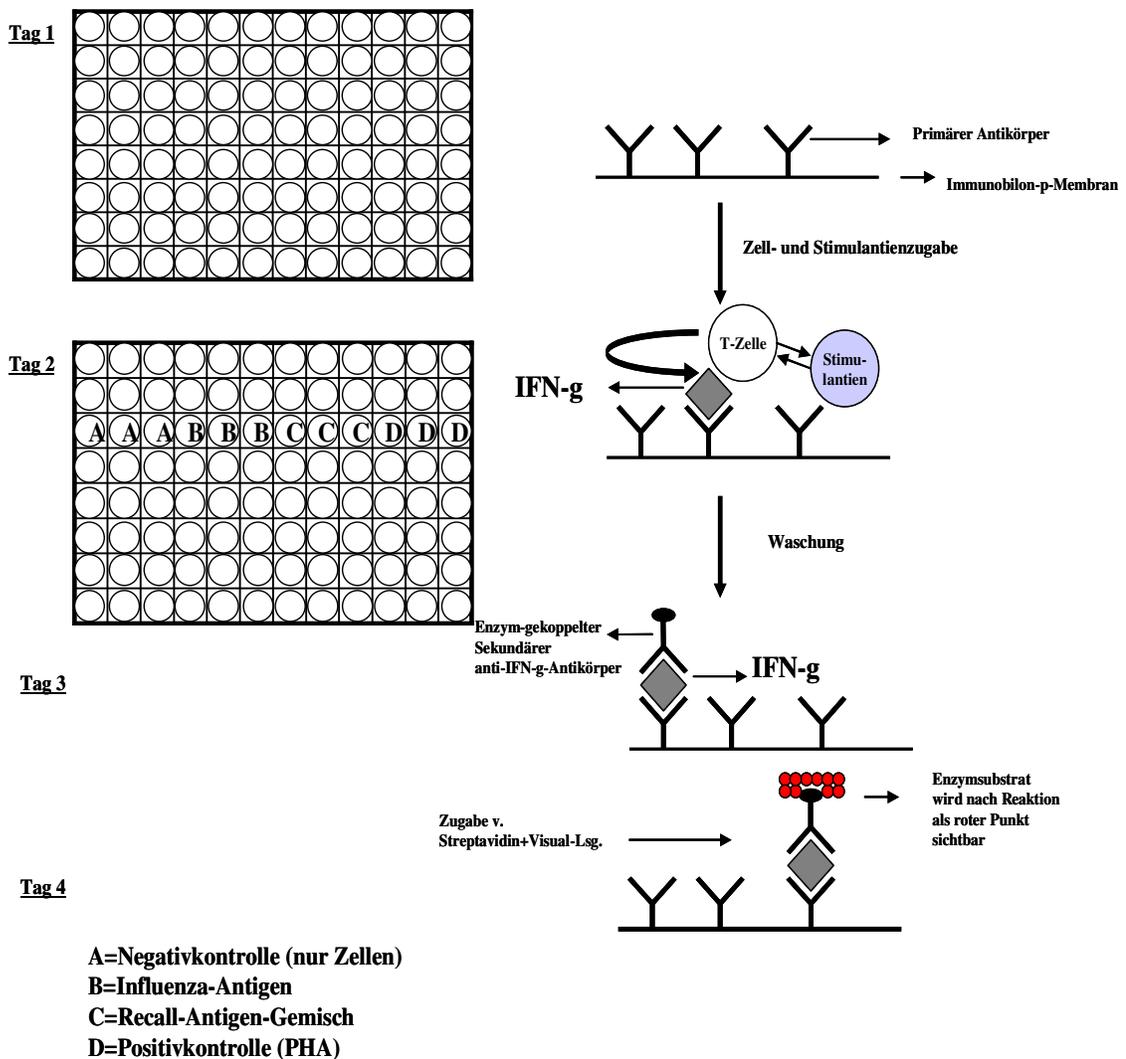


Abbildung 7: Schematische Darstellung des in dieser Studie verwendeten ELISPOT (Enzyme-linked immunosorbent spot).

2.4.1. Präparation mononukleärer Zellen (PBMC) aus venösem Blut

Materialien und Geräte:

- 14 ml-Röhrchen (Cellstar):

Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen

- 50 ml-Röhrchen (Falcon):

Becton Dickinson Labware, Franklin Lakes, NJ, USA

- PBS: PAA Laboratories GmbH, Pasching, Österreich

- Ficoll-Plaque Plus: Amersham Biosciences AB, Uppsala, Schweden

- Zellkulturmedium: RPMI 1640-Medium: Biochrom AG, Berlin

+ 10% FKS (hitzeinaktiviert): Biochrom AG, Berlin

+ 1% Penicillin/Streptomycin: Biochrom AG, Berlin & Gibco Auckland NZ

+ 1% Glutamin: Biochrom AG, Berlin

- Zentrifuge: Megafuge 1.0 Heraeus Sepatech, Osterode

Zellzahlbestimmung:

- 96-well Rundbodenplatte (Falcon):

Becton Dickinson Labware, Franklin Lakes, USA

- 3 %-ige Essigsäure:

Herstellung aus aqua dest. und 100%-iger Essigsäure: Merck, Darmstadt

- Neubauer Zählkammer

- Lichtmikroskop: Olympus BX 45

Jeweils zwei 14-ml-Röhrchen wurden mit 3 ml Ficoll-Plaque vorgelegt.

10 ml Zitratblut wurden in einem 50-ml-Falcon-Röhrchen mit 10 ml PBS im Verhältnis 1:2 vermischt. Anschließend wurden ca. 9 ml des Gemisches vorsichtig über die Ficoll-Phase geschichtet. Die Röhrchen wurden bei 1000 g für 20 Minuten bei Raumtemperatur zentrifugiert. Durch die Anwendung des Ficolls wurden beim Zentrifugieren die zellulären Blutbestandteile in 4 Schichten aufgeteilt. Von oben nach unten: Plasma und Thrombozyten, PBMC-Schicht, Ficoll-Plaque und Erythrozyten/ Granulozyten/ tote Zellen.

Die PBMC-Schichten wurden mit einer Pasteurpipette vorsichtig abgenommen und in ein 50-ml-Röhrchen überführt. Anschließend wurde das Röhrchen auf 50ml mit PBS aufgefüllt und zweimal zentrifugiert und gewaschen. (1.Waschung bei 210 g, 2.Waschung bei 174 g für 10 min bei RT). Nach dem Waschen wurde der Überstand vorsichtig dekantiert und das entstandene Pellet mit dem Restvolumen PBS resuspendiert. Anschließend wurden die Zellen auf eine Zellzahl von 2×10^6 Zellen/ml eingestellt.

2.4.2. Durchflusszytometrische Analysen

Materialien und Geräte:

T-Zell-Antikörpergemisch:

Jeweils 100 µl von

- anti-CD45-PerCP: Becton Dickinson, San Jose, CA USA
- anti-CD3-FITC: Immunotech, Marseille, Frankreich
- + 800 µl FACS-Puffer:
- Falk-Lösung+ 2 % FKS+ 0,1 % Natriumazid: Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg
- Zentrifuge: Megafuge 1.0, Heraeus , Hanau
Centrifuge 5810, Eppendorf, Hamburg
- FACSSort-Durchflusszytometer: Becton Dickinson, Heidelberg

Mit der Methode der Durchflusszytometrie ist es möglich, verschiedene Aussagen über den Phänotyp einer untersuchten Zelle zu treffen. Kurz zum Prinzip dieser Methode: Eine zu untersuchende Zellsuspension wird mit einer Nadel aufgesogen und in einem laminären Fluss dem Strahlengang, des im Gerät befindlichen Lasers zugeführt. Wird die Zelle vom Laser getroffen, so wird das Licht je nach Größe und Granularität in verschiedene Richtungen gestreut. Hierbei unterscheidet man FSC (forward scatter = Vorwärtsstreulicht) und SSC (sideward scatter = Seitwärtsstreulicht): FSC gibt Auskunft über die Größe, und SSC Auskunft über die Granularität der Zelle. Die Verwendung von fluoreszenzmarkierten Antikörpern hat die Möglichkeiten der Differenzierung der Zellcharakteristika erheblich verbessert. Diese Antikörper, die gegen Oberflächenantigene der Zelle gerichtet sind, emittieren

nach Anregung durch den Laser Fluoreszenzen. Hierdurch ist eine Aussage über die vorhandenen Oberflächenantigene einer Zelle sowie eine Beurteilung der Herkunft, des Reifegrad- sowie Aktivitätszustandes möglich.

Quantifizierung der T-Zellen

Die Messungen dienen der Ermittlung der T-Zellzahl in den PBMC`s, um später anhand der ELISPOT Technik die Frequenz IFN- γ positiver Memory-T-Zellen pro x^n Lymphozyten bestimmen zu können. Jeweils 20 μ l- des Antikörper-Gemisches (bestehend aus anti-CD45-PerCP und anti-CD3-FITC) wurden mit 50 μ l der präparierten PBMC`s in ein Micronic-Röhrchen vorpipettiert. Anschließend wurde der Ansatz für 20 min im Dunklen bei 4°C inkubiert. Danach wurden den Ansätzen jeweils 1000 μ l FACS-Lösung zugesetzt und bei 1200 U/min für 5 min zentrifugiert. Hiernach wurde der Überstand verworfen, die Zellen wurden resuspendiert und am Durchflusszytometer auf Ihre T-Zellzahl hin untersucht.

2.4.3. Ablauf der ELISPOT-Experimente

Materialien und Geräte:

Tag 1

- 96-well Platten (Multi Screen): Millipore Corporation, Bedford, MA, USA
- Primärantikörper (anti-human IFN- γ monoklonal, 2 μ g/ml): Perbio Science Deutschland GmbH, Bürstadt
- PBS: PAA Laboratories GmbH, Pasching, Österreich

Tag 2

- PBS: PAA Laboratories GmbH, Pasching, Österreich
- PBS-BSA:
 - 500 ml PBS + 1% BSA (Waage: Sartorius, Göttingen) gut geschüttelt
- RPMI 1640 Medium: Biochrom AG, Berlin

- Influenza Antigen: Influsplit 2003/2004 , Glaxo Smith Kline, Dresden.
5 µl Influsplit mit 2495 µl RPMI-Medium verdünnt (1:500).
- Recall-Antigen-Cocktail (5ml-Ansatz):
 - 10 µl Tetanus:Impfstoff Merieux, Aventis Pasteur, Frankreich (1:500).
 - + 40 µl PPD (Tuberkulin):Serumwerk Dessau (1:125).
 - + 20µl CMV-Antigen :
Virales Lysat, Beads Axsym, Abbott, IL, USA (1:250).
 - + 100 µl Candida albicans : IMD, Berlin (1:50).wurden zu einem Antigencocktail vermischt.

Für beide Stimulationen (Influenza-Antigen und Recall-Antigene) wurden pro well 100 µl mit 100 µl Zellsuspension zusammengeführt. So ergaben sich folgende Endkonzentrationen (C_E):

- Influenza-Antigen: $C_E= 1:1000$
- Tetanus : $C_E= 1:1000$
- PPD : $C_E= 1:250$
- CMV-Antigen : $C_E= 1: 500$
- Candida albicans : $C_E= 1:100$
- PHA (Lectin) : $C_E= 1:1000$ Sigma Chemical CO, St.Louis, MO, USA

Tag 3

- PBS
- PBS-Tween: 1000 ml PBS + 0,05 % Tween 20:
Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen
- Sekundär-Antikörper (biotinylierter monoklonaler anti-human IFN- γ -Antikörper 0,5 mg/ml: Perbio Science Deutschland GmbH, Bürstadt)
- PBS-Tween-BSA: 1000 ml PBS + 0,05% Tween 20
+ 1% BSA: Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg

Tag 4

- PBS-Tween siehe Tag 3
- Streptavidin: (Dako A/S Dänemark)
- PBS-Tween-BSA siehe Tag 3
- PBS

- 50 ml-Röhrchen, Falcon :
- Visualisierungslösung: Für jedes Experiment frisch hergestellt:

0,4 ml AEC (3-Amino-9-Ethyl-Carbazol)-Lösung (α)
+ 12 ml „AEC-Puffer“ (0,1M Acetat-Puffer) (β)

Das Gemisch wurde anschließend durch ein 0,45 μ m-Filter (115 ml-Filter-Einheiten, steril, 0,45 μ m Porengröße: Sigma Chemical CO., St. Louis, MO, USA gefiltert.

12 μ l Hydrogenperoxid: Sigma, Aldrich CO. Ltd, St. Louis, MO, USA.

Herstellung von (α):

10 ml DMF (N,N-Dimethylformamid): Merck, Darmstadt.

+ 100 mg AEC: Sigma Chemical Co, St. Louis, MO, USA.

Herstellung von (β):

352 ml 0,2 M Natrium-Azetat-Lösung (13,6 g Natriumazetat: Fluka Chemie Buchs, Schweiz) wurde in 500 ml destilliertes Wasser.

+ 148 ml 0,2 M Essigsäure (2,3 ml 100%-ige Essigsäure: Merck, Darmstadt, in 200 ml destilliertes Wasser) gelöst.

Anschließend wurde mit Wasser auf 1 Liter aufgefüllt und den pH-Wert auf 5,0 eingestellt. (pH-Meter: Knick GmbH, Berlin)

- Brutschrank: Heraeus, Hanau

- ELISPOT-Lesegerät: Bioreader-3000 C, Bio-Sys Karben

Tag 1 Plattenbeschichtung und PBMC-Isolation

Jedes well der ELISPOT-Platte wurde mit 100 μ l des in sterilem PBS verdünnten primären anti-IFN- γ -Antikörper-Gemisches beschichtet (Konzentration 3 μ g/ml). Nach der Beschichtung wurde die Platte mit Frischhaltefolie eingewickelt und bei 4°C über Nacht im Dunklen inkubiert.

Tag 2 Zusammenführung von Stimulation und Zellen sowie Inkubation

Die Ak-beschichtete Platte wurde dreimal mit jeweils 200 µl PBS gewaschen und mindestens für 1 h, aber weniger als 4 h „geblockt“. Pro well wurden 200 µl der „blocking-solution“ (PBS+BSA) hinzu gegeben. Diese Lösung bricht unspezifische Bindungen, die das Ergebnis verfälschen würden, auf. Andernfalls würde bei dem automatisierten Zählen der spots ein roter Hintergrund die Auswertung erschweren. Nach dem „blocken“ wurde die Platte erneut mit 200 µl PBS pro well dreimal gewaschen. Für jede Stimulationsgruppe (Negativkontrolle, Influenza-Antigene, Recallantigene und Positivkontrolle) wurden jeweils 3 wells mit jeweils 100 µl Antigen/Mitogen (Influenza- und Recall-Antigen) und 100 µl der auf $2 \cdot 10^6$ /ml eingestellten Zellen hinzugefügt (siehe oben Abb. 7). (Hierbei war es wichtig, dass dies vorsichtig geschieht, da sonst die zu stimulierenden Zellen an den Außenrand des wells gespült würden). In jeden well befanden sich nun 200.000 PBMC`s. Die Stimulantien erreichten in dem well ihre in 2.4.3. beschriebene Endkonzentration. Für die Negativkontrolle wurde 100 µl RPMI-Medium und für die Positivkontrolle 100 µl der verdünnten PHA-Lösung verwendet. Die Platte wurde nun, in Frischhaltefolie eingewickelt und für 24 Stunden im Brutschrank bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert.

Bis zu diesem Teil des Experimentes mussten sterile Bedingungen herrschen.

Tag 3 Zuführen des sekundären Antikörpers und Inkubation

Nach der Inkubation wurde die Platte zunächst dreimal mit jeweils 200 µl PBS pro well gewaschen. Anschließend wurde dreimal mit PBS-Tween gewaschen, wobei beim 3. Waschgang für 10 min bei Raumtemperatur inkubiert wurde, um möglichst viele Zellen von dem Rundboden abzulösen. Danach wurden 100 µl pro well des in PBS-Tween-BSA verdünnten, biotinylierten, sekundären Antikörper hinzu pipettiert und anschließend erneut über Nacht bei 4°C im Dunklen inkubiert.

Tag 4 Enzymatische Farbreaktion und Zählen der spots

Die Platte wurde viermal mit PBS-Tween (100µl pro well) gewaschen und verdünntes Streptavidin (100 µl pro well) wurde hinzu pipettiert. (Verdünnung 1:2000 mit PBS-Tween- BSA). Die Platte wurde anschließend mindestens für 2 h, jedoch weniger als 4 h bei RT inkubiert, und daraufhin sechsmal gewaschen. (Dreimal mit PBS-Tween und dreimal mit PBS, jeweils 100 µl pro well) Nun wurden pro well 200 µl des frisch angesetzten Visualisierungslösung hinzugefügt. Die Farbreaktion trat in den folgenden 5 Minuten in Gang. Allerdings, so zeigen Erfahrungen aus unserem Labor, sollte nicht länger gewartet werden, da ansonsten mit der Zeit das Hintergrundrauschen steigt und sich die Rundböden immer stärker verfärben. Die Platte wurde dreimal mit aqua dest. vorsichtig gespült und bei Raumtemperatur und Dunkelheit getrocknet. Die ELISPOT Platte konnten anschließend mit dem Bioreader, einem computergestützten Spot-Zähl-Gerät gelesen und die Anzahl der Spots pro well ermittelt werden. Anschließend wurde der Median der aus den 3 wells pro Gruppe (Kontrolle, Influenza-Antigen, Recall-Antigen, PHA) gemessenen Spots bestimmt. Um die genaue Frequenz Influenza- bzw. Recall-Antigen-spezifischer T-Zellen pro 100.000 T-Zellen zu ermitteln, wurde die Zahl unter Einbeziehung der bereits durchgeführten durchflusszytometrischen T-Zellzahlbestimmung berechnet.

2.5. Monozytäre HLA-DR-Expression

HLA-DR ist ein glykolysiertes transmembranäres Oberflächenprotein, welches konstitutiv auf Antigenpräsentierenden Zellen (Makrophagen, Monozyten, Dendritische Zellen etc.) exprimiert wird. Es gehört zu der MHC Klasse II Molekülen und ist von wesentlicher Bedeutung für die Präsentation exogener Antigene (Bakterien, Viren...) gegenüber CD4 pos. T-Zellen (Kayser et al., 2002). Die HLA-DR Expression ist von großer Bedeutung für die Präsentation gegenüber T-Zellen und somit der Initiierung einer Immunantwort. Es ist eines der wichtigen Signale der T-Zellaktivierung. Die monozytäre HLA-DR Expression ist ein gut etablierter Surrogatmarker für die zelluläre Immunkompetenz (Volk et al., 1999, Payen et al., 2000). Durch die Entwicklungen in der Durchflusszytometrie ist es möglich, exakte, quantitative Messungen von Oberflächernmarkern an Zellen vorzunehmen. Die monozytäre HLA-DR Expression wird positiv von T-Zell-Zytokinen (z.B. IFN- γ , GM-CSF) und negativ von endogenen (z.B. Glucocorticoide, IL-10) und exogenen (z.B. LPS,

starke Immunsuppression, Stress) Faktoren reguliert (Volk und Kern, VL-Script 2001). Bei Immunstimulation (z.B. durch aktive Immunisierungen) kommt es durch das von T-Zellen gebildete und sezernierte IFN- γ zu einem Anstieg der monozytären HLA-DR Expression. Insbesondere im klinischen Bild der Sepsis aber auch im Rahmen von Immunmonitoring, stellt sich die monozytäre HLA-DR Expression als ein guter prognostischer Marker für den Verlauf dar (Döcke et al., 2005)

Durchführung:

Materialien und Geräte:

- Anti HLA-DR/ Anti CD 14 PerCP-Cy 5.5- Antikörper: Becton Dickinson, San Jose, CA, USA.
- Micronic-Röhrchen: ICN Biomedicals, Irvine, USA.
- Zentrifuge: Centrifuge 5139, Heraeus, Hanau.
- Absaugpumpe: Laborport, Neuberger, Freiburg i.Br.
- FacsSort Durchflusszytometer: Becton Dickinson, Heidelberg.

Das EDTA-Blut wurde nach Entnahme auf Eis gekühlt. 50 μ l Blut wurden zusammen mit 20 μ l Antikörper-Gemisch in ein Micronic-Röhrchen gegeben. Dieses Gemisch enthielt PE-konjugierte Antikörper gegen HLA-DR und PerCP-CY5.5-konjugierte Antikörper gegen CD 14, einem Antigen welches hauptsächlich auf Monozyten exprimiert wird. Es folgte eine 30 minütige Inkubation im Dunkeln bei Raumtemperatur. Anschließend wurden 500 μ l BD-Lysing Solution hinzugefügt und für 15 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde erneut mit 200 g für 5 Minuten zentrifugiert und der Überstand verworfen. Zuletzt wurde erneut mit 1ml FACS-Puffer gewaschen und für 5 Minuten bei 200 g zentrifugiert und der Überstand bis auf 100 μ l verworfen.

Analyse und Auswertung

Die Messung der Ansätze erfolgte mit einem FACS-Calibur Durchflusszytometer und der zum Gerät gehörigen CellQuest-Software. Zu Beginn einer jeden Woche wurde vor der Messung eine Geräte-Kalibrierung mit dem Programm FACSComp und dem CaliBRITE-Beads-Kit“ durchgeführt. Dabei wurden synthetische, mit den genannten Fluoreszenzmolekülen bestückte Beads gemessen und die Photomultiplier-Spannungen automatisch eingestellt. In einem weiteren Schritt wurden die elektronische Kompensation sowie ein Empfindlichkeitstest durchgeführt. Anschließend wurde mit dem „QuantiBRITE PE-Kit“ die 1:1-Quantifizierung vorgenommen. Dieses Kit enthält vier Populationen von Beads, die jeweils mit einer genau definierten Zahl von PE-Molekülen bestückt sind. Diese wurden gemessen und die Messwerte der Molekülzahl der jeweiligen Zellpopulation zugeordnet. Aus der sich so entstandenen Standardkurve wurde nach der Messung der jeweiligen Proben die durchschnittliche Anzahl gebundener Antikörper pro Zelle (Monozyt) berechnet werden.

2.6. Semiquantitative mRNA-Expression von Aktivierungsmakern im Urin (RT-PCR)

Neben dem Goldstandard, der Biopsie und histologischen Untersuchung zur Diagnose einer Transplantatsabstoßung, spielen gerade bei nierentransplantierten Patienten in den letzten Jahren Untersuchung des Urins auf (Aktivierungs-)moleküle mittels RT-PCR eine zunehmend wichtige Rolle in der Diagnostik. Mit dieser neuen und nicht-invasiven Methode ist es möglich transplantatspezifische Immunaktivierungen auf molekularer Ebene zu erfassen. Li und Mitarbeiter berichteten 2001 über eine Methode zur Diagnose von Rejektions-episoden. Hierbei konnte anhand einer gesteigerten Expression von Perforin und Granzyme B Biopsie-gesicherte Rejektionen bestätigt werden (Li et al., 2001). Perforin, ein Poren-bildendes Protein und Granzyme B, eine Serin-Peptidase, sind Moleküle, die beide im Exozytoseweg von cytotoxischen T-Zellen exprimiert werden. In den folgenden Jahren wurde die Technik immer weiter verfeinert. Von großem Interesse stand zunehmend nicht nur die Möglichkeit zur Erfassung des molekularen Korrelates zur Biopsie, sondern viel mehr die Frage, ob es möglich ist mit dieser nicht-invasiven Technik womöglich auch Vorhersagen z.B. über eine bevorstehende Rejektionen zu treffen. So konnten in Arbeiten von Kotsch et al. einige neue Moleküle identifiziert werden, die bei Immunaktivierungen

im Transplantat vermehrt exprimiert wurden und mit einem Transplantatsschaden/Rejektion einhergingen (Kotsch et al., 2004). Neben CD3 und RANTES zeichnete sich das Granulysin als ein spezifischer Marker für die Vorhersage von frühen oder späten Rejektionen aus. Um eine Immunaktivierung als Folge der Impfung im Transplantat erfassen zu können, untersuchten wir Urinproben der Nierentransplantationspatienten unmittelbar vor der Impfung und 7 Tage nach der Impfung bezüglich der mRNA-Expression von folgenden Proteinen:

CD 3: Ein aus 5 Untereinheiten bestehendes Protein, welches mit dem TCR stabil verbunden ist und den TCR/CD3 Komplex bildet. CD3 dient zur Stabilisierung des TCR-Komplexes und ist vor allem für die Antigen-induzierte Signaltransduktion verantwortlich. Es wird auf allen T-Lymphozyten exprimiert und dient in unserer Studie als Infiltrationsmarker.

Granulysin: Ein Protein, welches in den Granula von zytotoxischen T-Zellen und in NK-Zellen gespeichert wird und lytische Aktivität besitzt. Es induziert Apoptose durch Caspase-abhängige Wege. Untersuchungen an Biopaten, peripheren Blutlymphozyten sowie im Urinsediment, wiesen auf eine Assoziation von Expressionsanstieg des Granulysin und Rejektionsepisoden hin (Sarwal et al., 2000, 2001, Kotsch et al., 2004).

Granzyme A: Granzyme sind „granule associated enzymes“. Diese Serinproteasen werden in Granula zytotoxischer T-Zellen gespeichert und wird nach Aktivierung der Zelle freigesetzt. Durch rezeptor-vermittelte Endozytose gelangt es in die Zielzelle und induziert ebenfalls den Zelltod durch Apoptose. Besonders Granzyme B hat sich in einigen Studien als spezifischer Marker für Rejektionsepisoden in nierentransplantierten Patienten erwiesen (Li et al., 2001, Kotsch et al., 2004).

IP-10: Das „interferon-inducible protein-10“ IP-10 gehört zur CXC-Chemokinfamilie. Chemokine sind kleine Peptide, die Signale für die Rekrutierung von verschiedenen T-Zell Subpopulationen induzieren (Bendall et al., 2005). Manche Autoren fanden eine erhöhte IP-10 mRNA-Expression in Urinen von Patienten während einer Rejektion (Tatapudi et al., 2004). Andere konnten anhand der Protein-Expression von IP-10 bevorstehende Rejektionen identifizieren (Matz et al., 2006).

RANTES: RANTES (*Regulation upon Activation, Normal T-cell Expressed and Secreted*) gehört ebenfalls zur CC-Chemokinfamilie und reguliert ebenfalls die Rekrutierung von T-Zellen sowie Eosinophilen und Basophilen Granulozyten zu entzündeten Arealen. Kotsch und Mitarbeiter konnten im Urinsediment vermehrt mRNA-Expressionsanstiege vor einer Rejektionsepisode messen. (Kotsch et al., 2004)

2.6.1. Probengewinnung und Isolation der mRNA aus Urinzellsediment

Reagenzien und kommerzielle Kits:

Erythrozytenlysepuffer: Qiagen, Hilden

RNeasy® Mini Kit: Qiagen, Hilden

PBS: PAA Laboratories GmbH, Pasching, Österreich

Geräte:

Centrifuge 5410 Eppendorf: Eppendorf, Hamburg

Urinproben von (50ml-100ml) von Transplantationspatienten der Nierentransplantationsambulanz der Klinik für Innere Medizin mit Schwerpunkt für Nephrologie und internistische Intensivmedizin des Universitätsmedizin Charité Berlin-Campus Virchow-Klinikum, Berlin wurden gesammelt und anschließend für 15 min. bei 4°C und 10.000 rpm zentrifugiert und der Überstand verworfen. Das entstandene Pellet wurde mit 1 ml PBS gewaschen und anschließend erneut bei 14.000 rpm und 4°C für 7 Minuten zentrifugiert. Das Pellet wurde in 500 µl RLT Lysepuffer + 3,5 µl Mercaptoethanol aufgenommen. Die so aufgearbeiteten Proben wurden bis zur Weiterverarbeitung bei -80°C gelagert. Zur weiteren Aufarbeitung wurden die Proben zunächst erneut mit 1ml kalten PBS gewaschen und für 10 min bei 10.000 rpm und 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und aus dem Pellet mit dem RNeasy® Mini Kit RNA isoliert. Die Proben wurden in einem Guanidiniumisothiocyanathaltigen Puffer lysiert und mit β-Mercaptoethanol (14,2 M) in einem Verhältnis von 1:143 versetzt. Die Fällung erfolgte im Gegensatz zu dem vom Hersteller empfohlenen Protokoll mit -20 °C kaltem 70%igen Ethanol, das in einem Verhältnis von 1:2 eingesetzt wurde. Zur quantitativen Fällung der RNA wurden die Ethanolgemische bei für 30 min -80°C inkubiert. Nach der Inkubation wurden die Proben auf Raumtemperatur gebracht, auf silikatmaterialbeschichtete Zentrifugationssäulen

aufgetragen und 15 Sekunden bei 13000 rpm zentrifugiert. Die Filtrate wurden verworfen und die Säule gewaschen und getrocknet. Zur vollständigen Elution der an der Silikatmembran gebundenen Gesamt-RNA wurden die Säulen fünf Minuten bei 37°C zweimal mit jeweils 22 µl RNase freiem Wasser inkubiert und anschließend für eine Minute bei 13000 rpm zentrifugiert.

2.6.2. Transkription der mRNA in cDNA

Materialien:

Reagenzien und Puffer:

DNase RNase frei: Ambion, Huntingdon, UK.

MMLV-Reverse Transkriptase, FSB-Puffer, DTT: Gibco BRL, Gaithersburg, D.

RNase Inhibitor: Promega, Madison, USA.

dNTPs: Pharmacia Biotech, Uppsala, Schweden.

Oligo-dT: Pharmacia Biotech, Uppsala, Schweden.

DEPC-H₂O: 1ml Diethyl Pyrocarbonate, add 1l dd H₂O, autoklavieren.

Geräte:

Thermal Cycler: Perkin Elmer, Branchburg, USA

Das Umschreiben der RNA in cDNA erfolgte mit der MMLV Reversen Transkriptase. Dieses Enzym ist eine RNA abhängige DNA Polymerase mit einer schwach ausgeprägten RNase H-Aktivität. Um die Proben auf DNA Kontamination zu prüfen, wurde von jeder Probe eine Kontrollreaktion in halben Ansätzen ohne Reverse Transkriptase angefertigt. Als Synthesepimer wurde oligo dT verwendet, da dieses sich nur an den 3'-Poly-A-Schwanz der mRNA anlagert. Als Ausgangsmaterial wurden 18 µl RNA eingesetzt und mit 2 µl odT-Primer (0.1 mg/ml) vermischt. Die Ansätze wurden 10 min bei 75°C zur Vermeidung von Sekundärstrukturen inkubiert und 2 min auf Eis abgekühlt. Folgender Mix wurde pro Reaktion hinzu pipettiert:

8 µl First Strand Buffer (FSB)
4 µl Dithiothreitol (DTT, 0.1 M)
4 µl dNTP (2.5 mM)
2 µl DNase (2 U/µl)
0.5 µl RNase-Inhibitor (40 U/µl).

Für die Kontrollreaktion wurde folgender Mix eingesetzt:

4 µl First Strand Buffer (FSB)
2 µl Dithiothreitol (DTT, 0.1 M)
2 µl dNTP (2.5 mM)
1 µl DNase (2 U/µl)
0.25 µl RNase-Inhibitor (40 U/µl).

Während der 30-minütigen Inkubation bei 37°C wurden eventuell noch vorhandene Restkontaminationen mit genomischer DNA zerstört und die DNase beim darauf folgenden Erhitzen auf 75°C inaktiviert. Danach wurden die Proben auf eis gelagert und abgekühlt und es wurde 1 µl MMLV-Reverse Transkriptase und 1 µl RNase-Inhibitor, bzw. zum Kontrollansatz 0.5 µl steriles Wasser und 0.5 µl RNase-Inhibitor, hinzugefügt. Die cDNA-Synthese erstreckte sich über einen Zeitraum von 60 min bei 42°C mit einem daran anschließenden Enzym-Inaktivierungsschritt bei 95°C für 5 min. Die erhaltene cDNA wurde bei -20°C gelagert. Bei sämtlichen Schritten war darauf zu achten, dass RNase-frei gearbeitet wurde.

2.6.3. Real-Time RT-PCR

Die real-time RT-PCR ist eine schnelle und gut etablierte Methode zur Vervielfältigung von spezifischen DNA-Abschnitten. Da diese Methode ein Höchstmaß an Sensitivität bietet, sind bereits kleinste Mengen ausreichend um das Material beliebig oft vervielfältigen zu können. Im Gegensatz zur klassischen PCR, bei der nur eine qualitative Bestimmung des Transkriptionsprodukts möglich ist, kann mit der real-time RT-PCR auch Aussagen über die Ausgangs-DNA-Menge getroffen werden. Die Auswertung wurde mit der dazu gehörigen Software (Gene Amp 5700 Sequence Detection Software, Applied Biosystems, Rodgau-Jügesheim) vorgenommen. Die Quantifizierung der DNA/cDNA

beruht auf der Berechnung des Schwellenwertes (Cycle of Threshold, C_T -Wert). Hier überschreitet die Reporterfluoreszenz die Hintergrundfluoreszenz signifikant und die Amplifikation geschieht exponentiell ohne limitierende Faktoren wie Primer- oder Nukleotidmangel oder nachlassende Enzymaktivität. Der C_T -Wert kann zur absoluten Quantifizierung mit Hilfe einer Kalibrierungskurve oder zur relativen Quantifizierung eingesetzt werden. In der vorliegenden Studie wurde in Bezug zur Zielgenexpression auf ein ubiquitär vorhandenes Haushaltsgen relativ quantifiziert.

Prinzip

Das Prinzip der realtime RT-PCR beruht, ebenfalls wie die herkömmliche PCR auf die Interkalierung von Ethidiumbromid an doppelsträngige DNA und seine Fluoreszenz unter UV-Licht. Die Quantifizierung erfolgt mit Hilfe von fluoreszierenden Farbstoffen, wobei proportional zur Menge des neu entstandenen Produktes ein Anstieg der Fluoreszenz angezeigt wird. In dieser Arbeit wurde mit fluoreszenzmarkierten Sonden gearbeitet. Beim TaqMan® liegt zwischen den beiden sequenzspezifischen Primern noch ein zusätzliches Oligonukleotid. Diese Sonden sind am 5'-Ende mit einem Reporterfarbstoff (FAM) und am 3'-Ende mit einem Quencher (TAMRA) markiert. Die Fluoreszenzemission des Reporters wird bei einer intakten Sonde durch den Quencher (engl. Dämpfen) unterdrückt. Wird der neue Strang synthetisiert, baut die Taq-Polymerase durch ihre 5', 3'-Endonukleaseaktivität die Sonde in kleine Fragmente ab und die räumliche Nähe zwischen Reporter und Quencher geht verloren. Es kommt zu einer Fluoreszenzemission. Die zunehmende Reporterfluoreszenz kann nach jedem Zyklus gemessen werden und ist proportional zur DNA-Menge, bzw. zur ursprünglichen Menge an mRNA. Die Messungen wurden am ABI PRISM 7700 Sequence Detector durchgeführt.

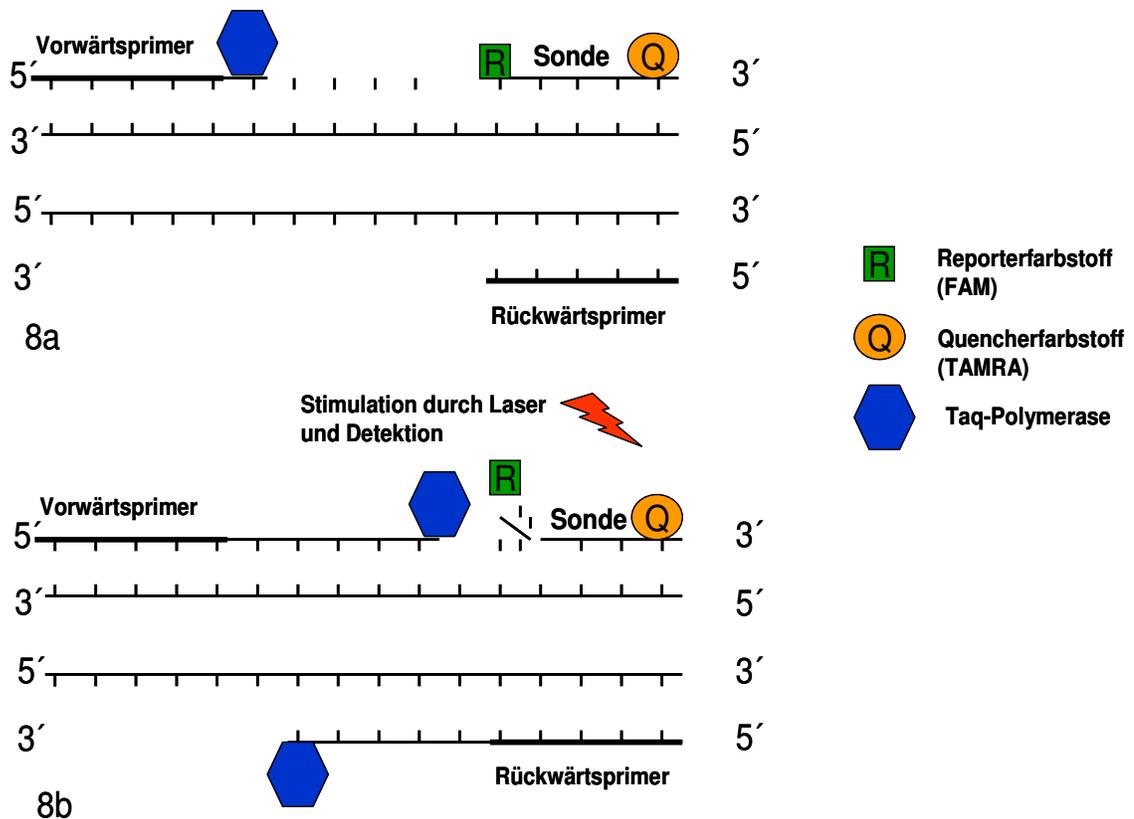


Abbildung 8: Schematische Darstellung des Prinzips der realtime- RT-PCR. a) Beginn der Polymerisation. An den am 3'-Ende gebundenen Primer synthetisiert die Taq-Polymerase einen komplementären neuen Strang. Durch die intakte Sonde wird das Reportersignal vom Quencherfarbstoff durch die räumliche Nähe aufgrund eines Fluoreszenztransfers unterdrückt. b) Stößt die Taq-Polymerase auf die in der Nähe des Primers gelegene Sonde, wird diese durch die 5'-3'-Exonukleaseaktivität der Polymerase hydrolysiert, so dass das Reportersignal nun nicht mehr unterdrückt wird und nach Anregung mit einem Argonlaser (bei 488 nm) detektiert werden kann. Hierbei ist die Fluoreszenzintensität direkt proportional zu der vorhandenen DNA-Menge. Modifiziert nach: Strohmeyer, 2003.

Relative Genexpression

Grundsätzlich unterscheidet man bei der Analyse der realtime RT-PCR eine absolute Quantifizierung von einer relativen Quantifizierung. Beim erstgenannten werden die Kopienzahl einer Probe durch die Relation des PCR Signals zu einer Standardkurve, bei welcher definierte Templatemengen eingesetzt wurden, bezogen. Bei einer relativen Quantifizierung werden zwei Gruppen miteinander verglichen. In unserer Studie wurden die Ct Werte des Zielgens auf die eines ubiquitär vorkommenden und exprimierten, so genannten Haushaltsgen normalisiert und durch die Formel $2^{-\Delta\Delta C_t}$ auf die Kontrollgruppe bezogen. Zu den Haushaltsgenen gehören u.a. Histone, HPRT, GAPDH u.a. .

Dabei errechnet sich der $\Delta\Delta C_t$ -Wert durch $\Delta\Delta C_t = \Delta C_t$ (Probe) - ΔC_t (Kontrollgruppe), wobei $\Delta C_t = C_t$ (Zielgen) - C_t (Haushaltsgen). Die Herleitung der $\Delta\Delta C_t$ -Methode wurde von Livak et al. beschrieben (Livak et al., 2001). In der vorliegenden Studie wurde diese Art der Auswertung bei der Untersuchung auf Expressionsveränderungen nach Influenza-Impfung angewendet. Da die durchgeführten Urinuntersuchungen rein deskriptiven Charakter haben, wurden keine statistischen Berechnungen durchgeführt. Aufgrund der außerordentlich hohen Variabilität konnten keine statistisch signifikanten Veränderungen beobachtet werden. Als Haushaltsgen wurden in dieser Studie Histone eingesetzt. Die Zielgene, die untersucht wurden, werden in der aktuellen Literatur als Kandidatenmarker für Abstoßungsepisoden oder Aktivierungen im Transplantat angesehen und in vielen Fällen nachgewiesen. Es wurden Expressionen der mRNA von CD3, von IP-10, von RANTES, von Granulysin und von Granzyme A gemessen. Die C_t -Werte des Zielgens wurden auf die des Haushaltsgens normalisiert und dann miteinander in Beziehung gebracht. Für die Reaktionen wurden kommerziell erhältliche Mastermixe eingesetzt, welche Puffer, dNTP, Taq-Polymerase beinhalten. Die verwendeten Sonden und Primer wurden bereits von etabliert und validiert worden. Die Konzentrationen der Primer wurden für eine optimale Amplifikationseffizienz titriert. Es kamen ausschließlich Proben zur Anwendung, bei denen die aus der cDNA-Synthese stammenden Kontrollansätze (ohne Reverse Transkriptase) keine Kontamination mit genomischer DNA aufwiesen. Dies wurde mit einem kreuzreaktiven Panel für Histone zuvor ausgetestet. Die aufgeführte Tabelle gibt die Primer und SONDENSEQUENZEN der untersuchten Gene an:

Histone

Sonde	5'- GCA-AGT-GAG-GCC-TAT-CTG-GTT-GGC-CTT-T-3'
Primer sense	5'- CCA-GAG-CGC-AGC-TAT-CGG-T-3'
Primer antisense	5'- CAC-GTT-TGG-CAT-GGA-TAG-CAC-3'

CD3

Sonde	5'- TCA-TTA-TCG-AAT-GTG-CCA-GAG-CTG-TGT-GG-3'
Primer sense	5'- AGG-ACA-AAG-AAT-CTA-CCG-TGC-AAG-3'
Primer antisense	5'- TGA- CAT-CAG-TGA-CAA-TGA-TGC-CA-3'

Granulysin

Sonde	5'- ACC-CAG-AGA-AGT-GTT-TCC-AAT-GCT-GCG-AC-3'
Primer sense	5'- AAA-ACT-GAA-GAA-GAT-GGT-GGA-TAA-GC-3'
Primer antisense	5'- ATC-GTG-ACC-TCC-CCG-TCC-TA-3'

Granzyme A

Sonde	5'- CTT-CCA-GAA-TCT-CCA-TTG-CGC-GAG-TCT-CTT-3'
Primer sense	5'- CCC-TGT-GAT-TGG-AAT-GAA-TAT-GGT-3'
Primer antisense	5'- ACA-CCC-TCG-CAC-AAC-AAA-GG-3'

RANTES

Sonde	5'- CAA-CCC-AGC-AGT-CGT-CTT-TGT-CAC-CC-3'
Primer sense	5'- TTT-CTA-CAC-CAG-TGG-CAA-GTG-CT-3'
Primer antisense	5'- GCA-CAC-ACT-TGG-CGG-TTC-TT-3'

IP-10

Sonde	5'-TCC- ACG-TGT-TGA-GAT-CAT-TGC-TAC-AAT-GAA-3'
Primer sense	5'-TTG-AAA-TTA-TTC-CTG-CAA-GCC-AA-3'
Primer antisense	5'- GGA-TTC-AGA-CAT-CTC-TTC-TCA-CCC-T-3'

Tabelle 4: Sonden- Primersequenzen der untersuchten Kandidatenmarker.

Durchführung der RT-PCR

Materialien:

Reagenzien:

qPCR-Mastermix: Eurogentech, Köln.

ddH₂O: Delta Pharma, Pfullingen.

Verbrauchsmaterial:

MicroAmp Optical Caps und Tubes: Stratagen, Cedar Creek, USA.

Geräte:

ABI PRISM 7700 Sequenz Detection System: Applied Biosystems, Weiterstadt

Das verwendete Probenvolumen betrug 13 µl. In jedem PCR-Ansatz wurden 2 µl steriles Wasser, 3 µl Primermix, 1 µl Sonde, 1 µl zu analysierende cDNA und 6 µl Mastermix zusammen pipettiert. Das hierzu verwendete PCR-Programm beinhaltete insgesamt vier Schritte. Im ersten Schritt wurden so genannte „Carryover Fragmente“ für 2 min bei 50°C verdaut, dann das Enzym bei 95°C für 10 Minuten inaktiviert. Für 40 anschließende Zyklen erfolgte der Denaturierungsschritt bei 95°C für 15 Sekunden, die Annealing- und Extensionsschritte bei 60°C für 60 Sekunden. Zum Beweis der Reproduzierbarkeit wurden für alle Proben Doppelansätze erstellt, wobei der C_t-Wert idealerweise nicht mehr als 0.5 Zyklen voneinander abweichen durfte. Bei C_t-Werten des Zielgens von über 40 wurde davon ausgegangen, dass keine spezifische Ausgangs-DNA vorgelegen hatte.

2.7. Statistik und Darstellung der Ergebnisse

Die Darstellung der Daten erfolgte mit SPSS 12.0, MS Excel und MS Powerpoint.

Für die Darstellung der Antikörperkonzentrationen wurden Säulendiagramme mit den jeweiligen Werten der Patienten und Probanden benutzt. Für die Darstellung der Serum-Kreatinin-Werte wurden Liniendiagramme mit Angabe der Werte der jeweiligen Patienten benutzt. Die Ergebnisse der Antikörperkonzentrationen, Influenza- und Recall-Antigen-spezifischen T-Zellfrequenzen, Influenza-spezifische Zytokinkonzentrationen und die monozytäre HLA-DR Expression wurden in Boxplots mit Angabe der Mediane, der 75%- und der 25%- Perzentilen und der inneren Eingrenzung mit Berücksichtigung der Ausreißer dargestellt. Wichtige Ausreißer wurden in den Abbildungen mit einer Zahl gekennzeichnet und im Text gesondert beschrieben. Die deskriptive Statistik mit Angabe der jeweiligen arithmetischen Mittelwerte, der Standardabweichung sowie Mediane, der 75%- und 25%- Perzentilen wird in Tabellen angegeben. Die Ergebnisse aus den RT-PCR Untersuchungen aus dem Urinsediment und Serum-Kreatinin-Konzentrationen wurden für jeden Patienten auf Balken- und Liniendiagrammen aufgetragen. Für Vergleiche der Immunantworten zwischen zwei Gruppen kam der Mann Whitney U Test zum Einsatz. Zum Vergleich der Immunantworten zwischen Tag 0 und Tag 7 innerhalb einer Gruppe wurde der Wilcoxon-Test verwendet. Ein Ergebnis wurde als signifikant angesehen, wenn die Irrtumswahrscheinlichkeit $p < 0,05$ betrug.

3. Ergebnisse

Die Impfung wurde von allen Patienten gut vertragen. Es wurden keine schwerwiegenden Nebenwirkungen beobachtet. In einem Fall kam es bei einem Probanden zu Übelkeit direkt nach der Applikation, die jedoch nach wenigen Minuten wieder verschwand.

In der unten dargestellten Abbildung sind die Daten der Transplantationspatienten aufgeführt.

Transplantationspatienten

Patient	Geschlecht	Alter	Organjahre	Immunsuppression	Rejektionen
1	männlich	44	1,8	CellCept/Decortin/Rapamune	3
2	männlich	55	1,8	CellCept/Urbason/Sandimmun	0
3	männlich	61	3,1	CellCept/Urbason/Prograf	3
4	weiblich	50	8,5	CellCept/Decortin/Prograf	0
5	weiblich	66	3,5	Prograf/Urbason/Myfortic/Rapamune	4
6	männlich	36	3,8	CellCept/Urbason/Prograf/Rapamune	2
7	weiblich	58	8,5	CellCept/Urbason/Sandimmun	0
8	weiblich	32	3,2	CellCept/Urbason/Prograf	0
9	männlich	43	5,8	CellCept/Urbason/Prograf	0
10	männlich	34	5,5	CellCept/Urbason/Prograf	2

Patienten mit Angabe von Geschlecht, Alter, Organjahre, Immunsuppressionsregime und Anzahl der stattgehabten Rejektionsepisoden.

Abbildung 9: Demographie der Transplantationspatienten.

Dargestellt sind die Kennziffern, Geschlecht, Alter, Zeit seit der Transplantation, Immunsuppressiva und Anzahl der bereits erlittenen Rejektionsepisoden der in dieser Studie eingeschlossenen Patienten.

3.1. Humorale Immunantworten nach Influenza-Impfung

Zunächst wurde die protektive Wirkung der Impfung untersucht. Es wurden IgG-Antikörpertiter gegen Influenza A und Influenza B bei den Patienten und Kontrollprobanden gemessen. Bei den Patienten kam es zwischen Tag 0 und Tag 28 zu einem statistisch signifikanten Anstieg der Anti-Influenza A Antikörperkonzentrationen (Wilcoxon; $p = 0,05$). Im Einzelnen entwickelten jedoch nur 5 von 10 Patienten (50%) einen als immunologisch protektiv angesehenen Antikörpertiter. 7 Tage nach der Impfung erreichten nur 2 Patienten (Patient 6 und 8) einen protektiven Antikörpertiter. Patient 6 entwickelte von allen Patienten die stärkste humorale Immunantwort, sowohl gegen Influenza A als auch gegen Influenza B. Patient 8 zeigte ebenfalls an Tag 7 protektive Antikörpertiter gegen Influenza A. Allerdings bestanden schon vor Impfung relativ hohe IgG-Titer und es zeigte sich keine weitere nennenswerte Steigerung. (Abb. 10) Im Falle der humoralen Immunantwort gegen Influenza B zeigte sich ebenfalls an Tag 28 ein signifikanter Anstieg der Anti-Influenza B Antikörper (Wilcoxon; $p=0,013$). Im Einzelnen entwickelten nur 2 von 10 Patienten (20%) protektive Antikörpertiter. Des Weiteren fanden sich bei 2 weiteren Patienten, an Tag 28 grenzwertig positive Titer. Patient 1 wies bereits vor der Impfung einen Antikörperschutz auf. Allerdings kam es im Verlauf zu keiner weiteren Steigerung (Abb.11). Von allen Patienten entwickelten nur ein Patient, Patient 6, innerhalb von 7 Tagen einen protektiven humoralen Impfschutz, sowohl für Influenza A als auch für Influenza B. (Abb.11) Die Patienten 2, 4, 7, 9 und 10 zeichneten sich als non-responder aus. Weiterhin kam es zwischen Tag 7 und Tag 28 sowohl bei Influenza A- als auch bei Influenza B-IgG zu einem signifikanten Anstieg. (Influenza A (Wilcoxon; $p=0,05$), und Influenza B (Wilcoxon; $p=0,011$) (Nicht dargestellt)). Vergleichend zeigte sich bei den Transplantationspatienten eine stärkere Impfantwort gegen Influenza A als gegen Influenza B.

Deskriptive Statistiken Influenza A-IgG Transplantierte (in Virotech Units)

	N	Mittelwert	Standard- abweichung	Minimum	Maximum	Perzentile		
						25.	50. (Median)	75.
Anti-Influenza A-IgG Tag 0	10	6,54	2,70	2,91	10,60	4,60	5,40	9,75
Anti-Influenza A-IgG Tag 7	10	7,86	4,47	3,64	18,40	4,64	6,70	9,39
Anti-Influenza A-IgG Tag 28	10	11,39	5,35	5,44	20,30	6,11	10,65	16,08

Tabelle 5 : Deskriptive Statistiken der Influenza A IgG Messungen bei den Patienten.

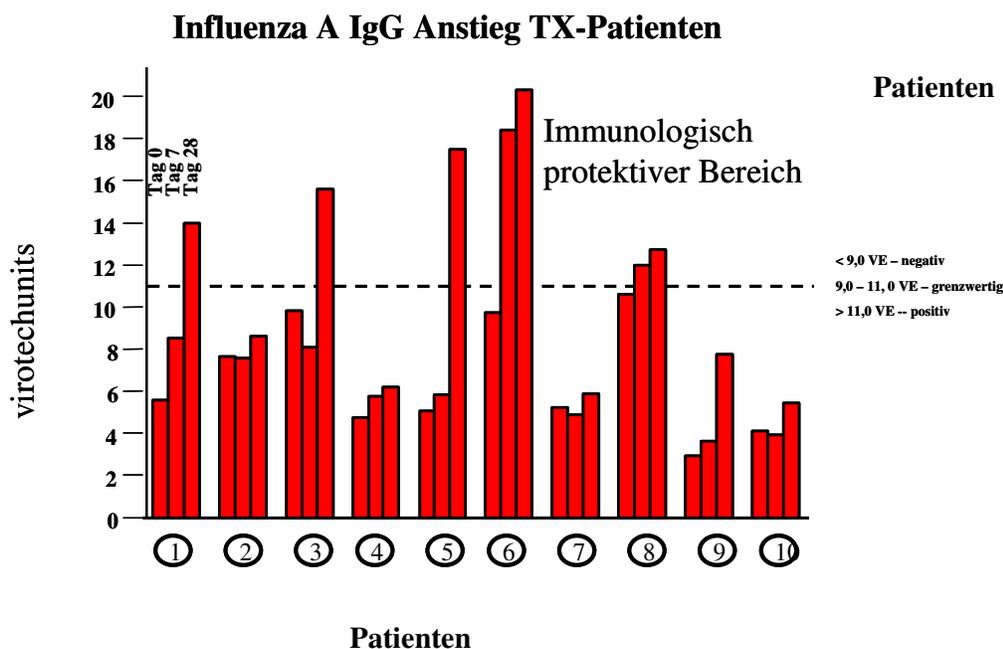


Abbildung 10: Anti-Influenza A IgG Anstieg bei nierentransplantierten Patienten. Dargestellt sind jeweils die Messwerte der einzelnen Patienten am Tag der Impfung, 7 Tage nach und 28 Tage nach der Impfung. An Tag 28 fanden sich bei insgesamt 5/10 Patienten protektive Antikörper gegen Influenza A. Bei 5/10 Patienten konnte kein bzw. nur ein geringer Anstieg verzeichnet werden.

Im Falle der humoralen Immunantwort gegen Influenza B zeigte sich ebenfalls an Tag 28 ein signifikanter Anstieg der Anti-Influenza B Antikörper (Wilcoxon; $p=0,013$). Im Einzelnen fanden sich bei 4 von 10 Patienten (40%) protektive Antikörpertiter (Abb. 11). Des Weiteren fanden sich bei 2 weiteren Patienten, am Tag 28 grenzwertig positive Titer. Die Patienten 1, 2, 4, 7 und 10 zeichneten sich als non-responder aus, wobei Patient 1 bereits vor der Impfung einen Antikörperschutz aufwies. Allerdings kam es im Verlauf zu keiner weiteren Steigerung. Von allen Patienten entwickelte nur Patient 6 innerhalb von 7 Tagen einen protektiven humoralen Impfschutz, sowohl für Influenza A als auch für Influenza B (Abb.11).

Deskriptive Statistiken Influenza B-IgG Transplantierte (in Virotech Units)

	N	Mittelwert	Standardabweichung	Minimum	Maximum	Perzentile		
						25.	50. (Median)	75.
Anti-Influenza B-IgG Tag 0	10	6,44	2,94	1,37	11,60	3,66	6,89	8,43
Anti-Influenza B-IgG Tag 7	10	7,45	3,93	1,44	14,40	3,33	7,61	9,83
Anti-Influenza B-IgG Tag 28	10	10,21	3,78	4,43	16,10	6,83	10,85	12,33

Tabelle 6: Deskriptive Statistiken der Influenza B IgG bei den Patienten.

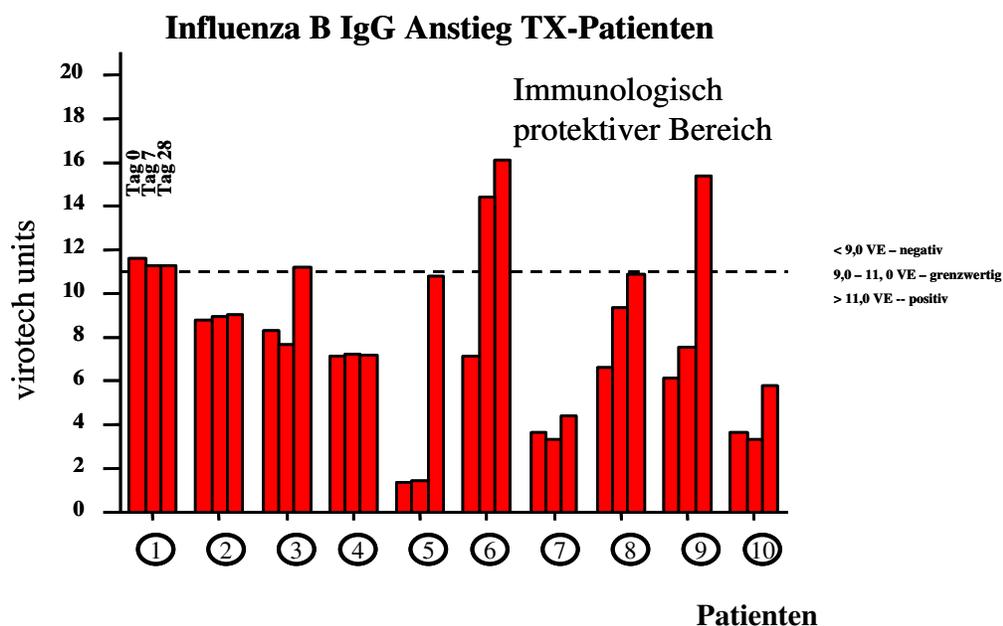


Abbildung 11: Anti-Influenza B IgG Konzentrationen bei nierentransplantierten Patienten. Dargestellt sind jeweils die Messwerte der einzelnen Patienten am Tag der Impfung, 7 Tage nach und 28 Tage nach der Impfung. An Tag 28 fanden sich bei insgesamt 4/10 Patienten protektive Antikörpertiter. 2/10 Patienten entwickelten einen grenzwertigen Impfschutz. Patient 1, 2 und 4 zeichnet sich als non-responder aus, wobei Patient 1 schon vor der Impfung protektive Antikörpertiter vorwies.

Bei den Kontrollprobanden fand sich bereits nach 7 Tagen bei 8 von 10 Probanden (80%) ein protektiver Antikörpertiter gegen Influenza A. Bei 6 von 10 Probanden (60%) kam es nach einer Woche zu protektiven humoralen Antworten gegenüber Influenza B. (Abb. 12 und 13). Bei 6 Probanden fanden sich bereits vor der Impfung schützende Antikörpertiter gegen Influenza A (Abb. 12). Bei 4 Probanden fanden wir bereits vor Impfung protektive Antikörpertiter gegen Influenza B. Statistisch kam es zu einem signifikanten Anstieg der Anti- Influenza A-IgG- (Wilcoxon; $p=0,047$) und Anti- Influenza B-IgG-Titer (Wilcoxon; $p=0,022$). Bei 6 Probanden bestand bereits vor der Impfung ein protektiver Antikörpertiter gegen Influenza A. Bei 4 Probanden lag vor Impfung protektiv Antikörpertiter gegen

Influenza B vor. Die Probanden 2, 3, 6 und 10 wiesen bereits vor der Impfung protektive Antikörpertiter gegen beide Virustypen auf (Abb.12 und 13).

Deskriptive Statistiken Influenza A- und B-IgG Kontrollprobanden (in Virotech Units)

	N	Mittelwert	Standardabweichung	Minimum	Maximum	Perzentile		
						25.	50. (Median)	75.
Anti Influenza A-IgG Tag 0	10	13,04	7,33	4,25	22,10	5,55	12,95	20,93
Anti Influenza A-IgG Tag 7	10	17,57	4,44	10,60	23,30	13,10	18,50	21,13
Anti Influenza B-IgG Tag 0	10	9,81	5,36	2,66	17,60	5,57	8,12	16,20
Anti Influenza B-IgG Tag 7	10	15,11	2,149	11,10	18,00	13,25	15,55	16,65

Tabelle 7: Deskriptive Statistiken der Influenza A- und B - IgG Messungen bei den Kontrollprobanden.

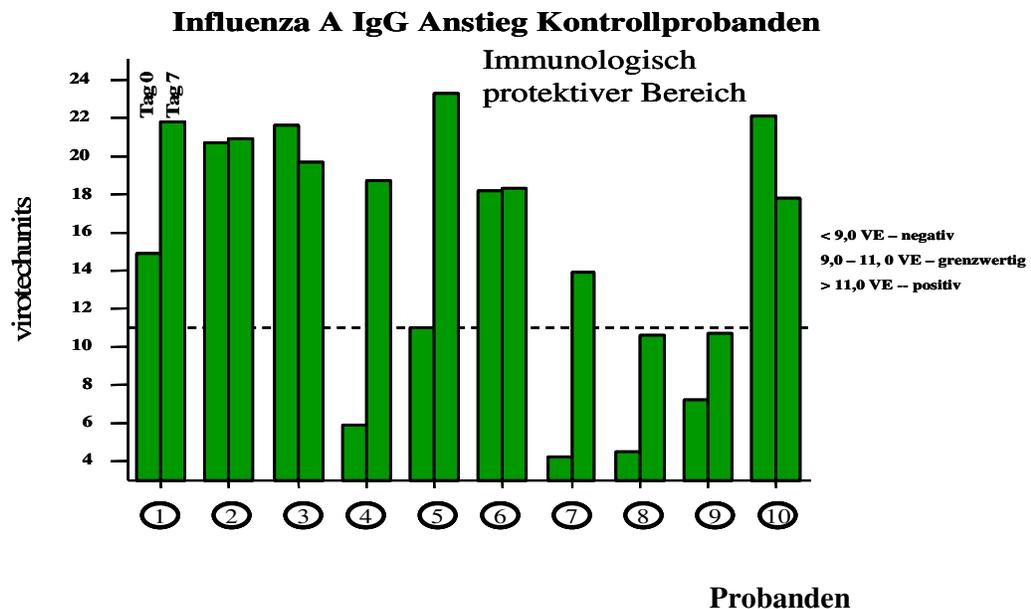
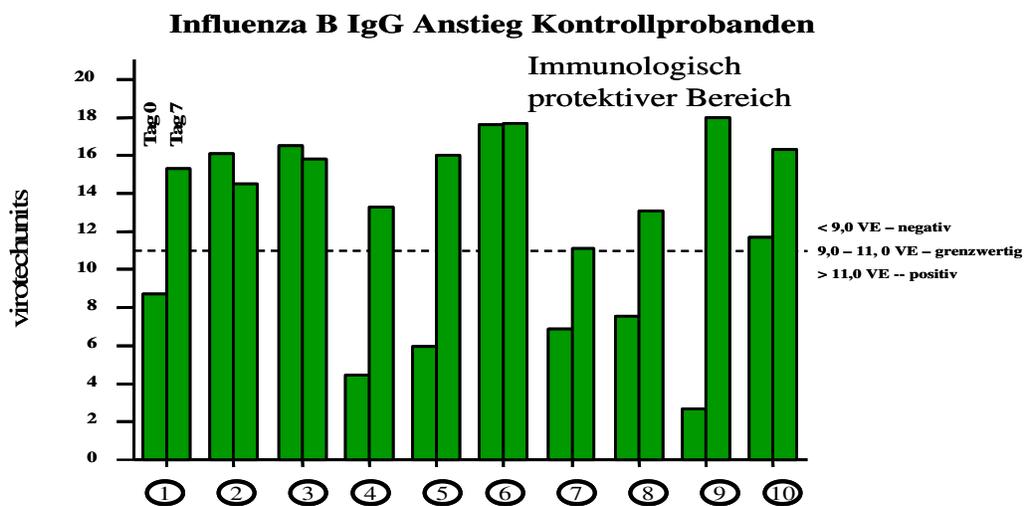


Abbildung 12: Anti-Influenza A IgG Anstieg bei den Kontrollprobanden. Diese Abbildung zeigt den Anti-Influenza A-IgG Anstieg bei den Kontrollprobanden. Dargestellt sind jeweils die Messwerte der einzelnen Probanden am Tag der Impfung und 7 Tage nach der Impfung. Für Anti-Influenza A-IgG ergab sich eine signifikante Erhöhung der Antikörpertiter (Wilcoxon; $p=0,047$).



Probanden

Abbildung 13: Anti-Influenza B IgG Anstieg bei den Kontrollprobanden. Diese Abbildung zeigt den Anti-Influenza A-IgG Anstieg bei den Kontrollprobanden. Dargestellt sind jeweils die Messwerte der einzelnen Probanden am Tag der Impfung und 7 Tage nach der Impfung. Für Anti-Influenza B-IgG ergibt sich eine signifikante Erhöhung der Antikörpertiter. Wilcoxon; $p=0,022$.

Beim Vergleich der beiden Gruppen fällt auf, dass die Antikörperproduktion in den ersten sieben Tagen nach Impfung bei den transplantierten Patienten zum Einen einer anderen, langsameren Kinetik unterliegt und zum Anderen schwächer ausfällt als bei den Kontrollprobanden. Ferner zeigten die Transplantationspatienten, verglichen mit den Kontrollprobanden, sowohl eine signifikant niedrigere Ausgangskonzentration von Anti-Influenza A IgG-Antikörpern sowohl vor als auch an Tag 7 nach der Impfung (Mann-Whitney U Test, $p=0,049$, $p=0,001$) (Abb.14). Bezüglich des Influenza B fand sich auch hier eine signifikant niedrigere Antikörperkonzentration als bei den Kontrollprobanden. (Mann-Whitney U Test, $p=0,001$) (Abb.15).

Influenza A IgG-Antikörper an Tag 0 und an Tag 7 nach Impfung

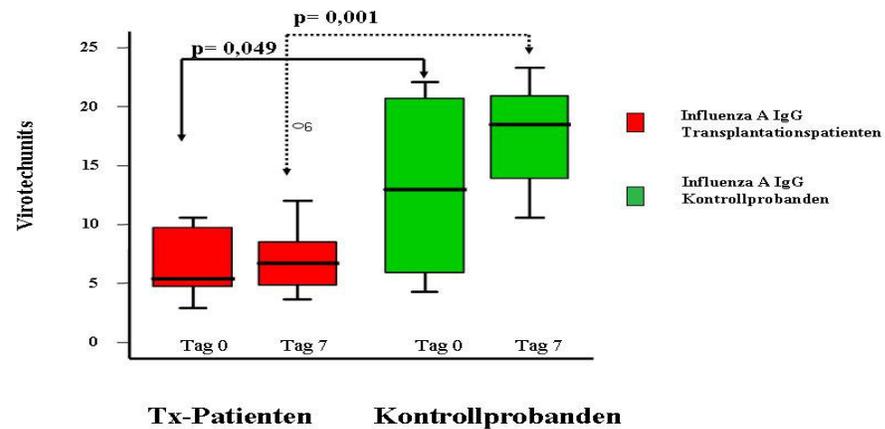


Abbildung 14: Anti-Influenza A Antikörperkonzentrationen Patienten und Kontrollprobanden im Vergleich. Diese Abbildung zeigt die Antikörperkonzentration der Patienten und der Kontrollprobanden am Tag der Impfung sowie 7 Tage nach der Impfung. Verglichen mit den Kontrollprobanden haben die Patienten sowohl vor Impfung (Mann-Whitney U Test, $p=0,049$) als auch an Tag 7 nach Impfung (Mann-Whitney U Test, $p=0,001$) eine signifikant niedrigere, gegen Influenza A gerichtete IgG-Konzentration.

Influenza B IgG-Antikörper an Tag 0 und an Tag 7 nach Impfung

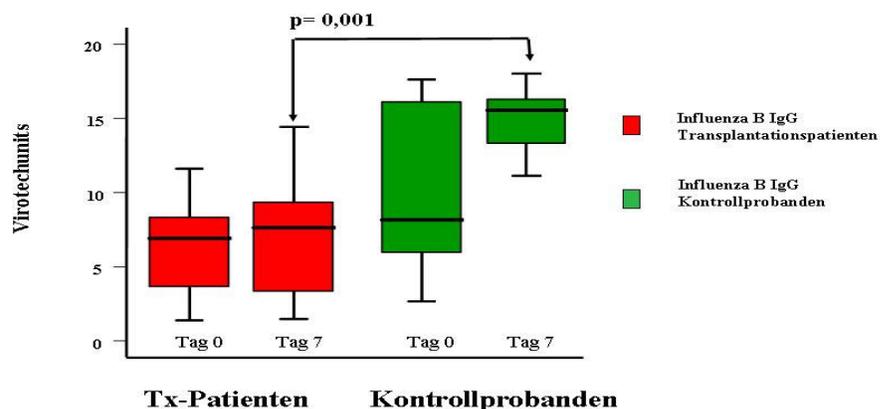


Abbildung 15: Anti- Influenza B Antikörperkonzentrationen Patienten und Kontrollprobanden im Vergleich. Diese Abbildung zeigt die Antikörpertiter der Patienten und der Kontrollprobanden am Tag der Impfung sowie 7 Tage nach der Impfung. Verglichen mit den Kontrollprobanden, entwickelten die Patienten an Tag 7 nach Impfung (Mann-Whitney U Test, $p = 0,001$) eine signifikant niedrigere, gegen Influenza B gerichtete IgG-Konzentration. Es konnte kein signifikanter Unterschied in der Ausgangskonzentration der Antikörper (Tag 0) zwischen den Gruppen nachgewiesen werden.

In einem weiteren Schritt wurden die Anstiege der Antikörperkonzentrationen der beiden Gruppen nach Impfung gegen Influenza A und Influenza B untersucht und miteinander verglichen. Von den Werten an Tag 7 wurden die Werte von Tag 0 subtrahiert und der Anstieg errechnet. Negative Werte oder Werte bis $< 1,0$ wurden gleich null gesetzt. Die beiden Gruppen vergleichend fiel bei den Transplantationspatienten ein signifikant geringerer Anstieg der gegen Influenza B gerichteten IgG Konzentration auf (Mann Whitney U Test, $p= 0,032$).

3.2. Zelluläre Influenza-spezifische Immunantworten nach Influenza-Impfung

3.2.1. Interferon- γ -Sekretion

Zwischen Tag 0 und Tag 7 nach Impfung kam es bei den Patienten zu einer signifikant gesteigerten Influenza-spezifischen IFN- γ -Sekretion (Wilcoxon; $p= 0,012$) (Abb.16).

Im Einzelnen kam es bei 7 von 10 Patienten (70%) zu einer erhöhten IFN- γ -Sekretion nach 24-stündiger Stimulation mit Influenza-Antigen nach Impfung. Bei 2 Patienten (1 und 2) an beiden Untersuchungstagen (Tag 0 und Tag 7) keine IFN- γ -Sekretion gemessen werden. Eine wiederholte Messung erbrachte keine Ergebnisse. Bei einem anderen Patienten (Patient10), kam es an Tag 7 zu einer starken Sekretion von IFN- γ , nachdem an Tag 0 kein IFN- γ gemessen werden konnte. Patient 6 zeigte vor allem an Tag 7 eine außerordentlich starke IFN- γ -Sekretion (>800 pg/ml Überstand).

Bei den Kontrollprobanden zeigte sich eine moderate, wenn auch statistisch nicht signifikante Erhöhung der Influenza-spezifischen Interferon- γ -Sekretion (Wilcoxon; $p>0,05$) (Abb.16). Im Einzelnen kam es bei 5 der 10 Probanden zu einer erhöhten IFN- γ -Sekretion 7 Tage nach Impfung. Allerdings gilt zu erwähnen, dass nur bei einer der 5 weiblichen Probanden 7 Tage nach der Impfung ein Anstieg der mit der IFN- γ Sekretion zu verzeichnen war. Demgegenüber zeigte sich bei 4 der 5 männlichen Probanden ein Sekretionsanstieg. Weiterhin fiel auf, dass bei manchen Probanden schon in den Kontrollansätzen sehr hohen IFN- γ Werte gemessen wurden. Proband 7 zeigte bereits am Tag der Impfung sowie an Tag 7 im Kontroll- und Stimulationsansatz außerordentlich hohe IFN- γ Konzentrationen (Abb. 16). Proband 5 zeigte bereits am Tag der Impfung nach Stimulation eine hohe IFN- γ Sekretion. Bei Proband 9 konnte an Tag 7 bereits im Kontrollansatz eine höhere IFN- γ Konzentration gemessen werden.

Zum Vergleich der beiden Gruppen fällt auf, dass die Kontrollprobanden im Vergleich zu den Transplantierten Patienten initial (Tag 0) eine signifikant stärkere IFN- γ -Antwort nach Stimulation aufwiesen (Mann-Whitney-U-Test, $p < 0,001$) (Abb.16). Aufgrund der bereits relativ hohen Influenza-spezifischen Antwort vor Impfung fällt der Anstieg durch Impfung bei den Probanden jedoch geringer aus als bei den Patienten. Folglich konnte an Tag 7 kein signifikanter Unterschied zwischen Patienten und Probanden ermittelt werden (Mann-Whitney-U-Test, $p > 0,05$).

Deskriptive Statistiken Interferon- γ -Sekretion Transplantierte in pg/ml

	N	Mittelwert	Standardabweichung	Minimum	Maximum	Perzentile		
						25.	50. (Median)	75.
Kontrolle Tag 0	10	0,30	0,94	0,00	3,00	0,00	0,00	0,00
Stimulation Tag 0	10	48,83	64,19	0,00	194,90	0,00	31,75	79,85
Kontrolle Tag 7	10	4,99	12,21	0,00	38,10	0,00	0,00	2,95
Stimulation Tag 7	10	264,56	280,42	0,00	863,30	5,85	204,65	374,28

Tabelle 8: Deskriptive Statistiken der Interferon- γ -Sekretion bei den Patienten.

Deskriptive Statistiken Interferon- γ -Sekretion Kontrollprobanden in pg/ml

	N	Mittelwert	Standardabweichung	Minimum	Maximum	Perzentile		
						25.	50. (Median)	75.
Kontrolle Tag 0	10	132,08	299,19	0,00	973,30	0,00	34,00	93,03
Stimulation Tag 0	10	553,78	465,40	177,50	1513,10	254,93	378,95	736,33
Kontrolle Tag 7	10	103,11	288,64	,00	918,40	0,00	0,00	28,18
Stimulation Tag 7	10	724,07	652,13	99,40	2046,50	104,80	593,50	1161,65

Tabelle 9: Deskriptive Statistiken der Interferon- γ -Sekretion bei den Kontrollprobanden.

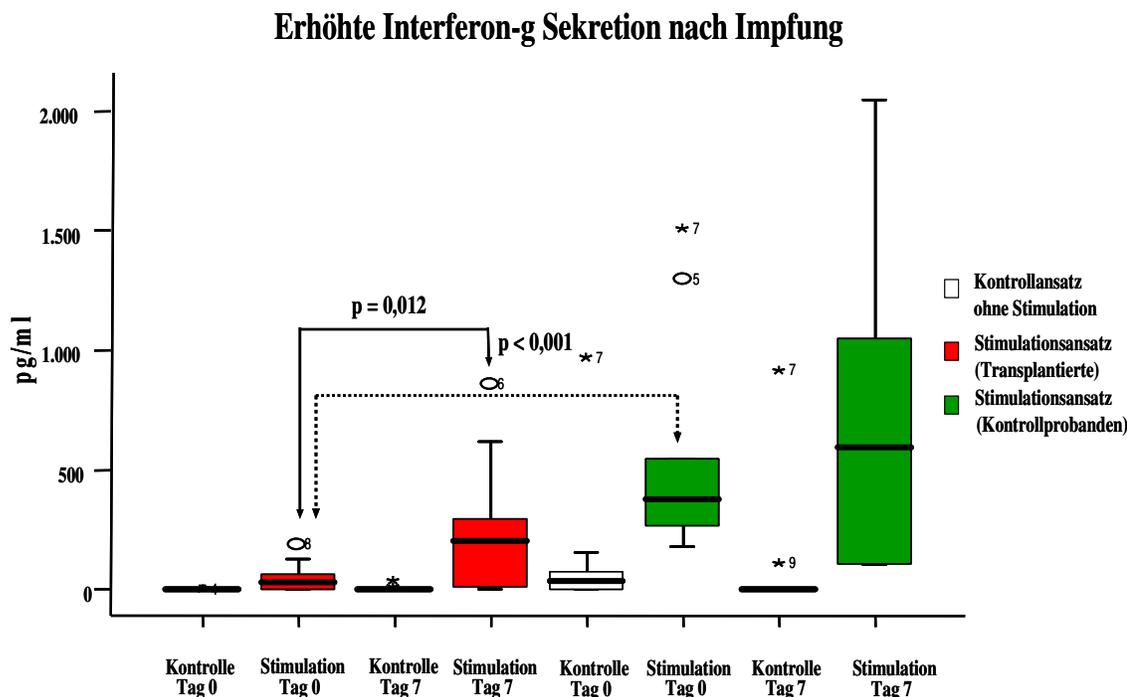


Abbildung 16: Erhöhte Influenza-spezifische Interferon- γ -Sekretion 7 Tage nach Influenza-Impfung (Transplantationspatienten und Kontrollprobanden). Bei den Patienten kam es zu einem signifikanten Anstieg (Wilcoxon, $p=0,012$). Bei den Probanden zeigte sich ein moderater jedoch statistisch nicht signifikanter Anstieg (Wilcoxon, $p>0,05$). Beim Vergleich der beiden Gruppen fällt auf, dass die Probanden initial (Tag 0) eine signifikant stärkere IFN- γ -Antwort nach Stimulation erzielen (Mann-Whitney-U-Test, $p<0,001$). Dargestellt sind jeweils die Messwerte aus den Kontrollen (ohne Stimulation) und den Stimulationsansätzen (Influenza-Antigene). Ausreißer sind im Text beschrieben und in der Abbildung mit einem Zeichen und der entsprechenden Patienten/Probanden-Nummer versehen und im Text beschrieben.

3.2.2. TNF- α -Sekretion

Zwischen Tag 0 und Tag 7 nach Impfung kam es bei den Patienten zu einem Anstieg in der TNF- α Sekretion nach Stimulation, wenngleich keine statistische Signifikanz ermittelt werden konnte (Wilcoxon; $p=0,059$) (Abb.17). Im Einzelnen kam es bei 8 von 10 Patienten (80%) zu einem TNF- α -Sekretionsanstieg nach 24 stündiger Stimulation mit Influenza-Antigen. Erstaunlicherweise wiesen 2 Patienten (Patient 1 und 2) an Tag 0 nach Stimulation keine messbaren TNF- α Werte. Allerdings entwickelte Patient 1 sieben Tage

nach der Impfung eine außergewöhnlich hohen TNF- α Antwort (>1800 pg/ml). Patient 3 entwickelte ebenfalls eine starke TNF- α Antwort (>1900 pg/ml). Bei Patienten 1 und 3 wurden bereits am ersten Untersuchungstag in den Kontrollansätzen eine starke TNF- α Sekretion gemessen (>400 pg/ml und >800 pg/ml) (Abb.17). In einer 2. Messung wurden diese Ergebnisse bestätigt. Bei den Kontrollprobanden zeigte sich eine moderate Steigerung der TNF- α Sekretion an Tag 7 nach der Impfung (Wilcoxon; $p > 0,05$) (Abb.17). Im Einzelnen entwickelten 6 von 10 Probanden (60%) an Tag 7 nach Impfung einer gesteigerte TNF- α Sekretion nach 24 stündiger Stimulation mit Influenza-Antigen. Interessanterweise kam es hierbei nur bei einer der 5 weiblichen Probanden (Probandin 1) und bei allen 5 männlichen Probanden zu einer Steigerung der TNF- α Sekretion. Proband 6 fiel an Tag 7 mit einer sehr starken TNF- α -Sekretion auf. (>1900 pg/ml) (Abb.17). Die beiden Gruppen miteinander vergleichend, fällt bei den nierentransplantierten Patienten eine stärkere wenn auch statistisch nicht signifikante TNF- α Sekretion nach Impfung auf (Mann-Whitney U Test, $p = 0,09$) (Abb.17).

Deskriptive Statistiken TNF- α Sekretion Transplantierte in pg/ml

	N	Mittelwert	Standardabweichung	Minimum	Maximum	Perzentile		
						25.	50. (Median)	75.
Kontrolle Tag 0	10	34,24	43,28	0,00	115,30	0,00	7,80	78,05
Stimulation Tag 0	10	61,88	82,20	0,00	212,40	1,80	21,80	123,25
Kontrolle Tag 7	10	171,68	281,80	10,30	899,70	14,83	53,90	197,55
Stimulation Tag 7	10	485,18	735,31	3,20	1924,40	57,13	173,90	697,35

Tabelle 10: Deskriptive Statistiken der TNF- α Sekretion bei den Patienten.

Deskriptive Statistiken TNF- α Sekretion Kontrollprobanden in pg/ml

	N	Mittelwert	Standardabweichung	Minimum	Maximum	Perzentile		
						25.	50. (Median)	75.
Kontrolle Tag 0	10	2,86	3,43	0,00	10,90	0,00	2,55	4,43
Stimulation Tag 0	10	19,72	17,08	5,90	66,00	9,93	16,65	20,03
Kontrolle Tag 7	10	8,72	13,41	0,00	41,50	0,00	1,00	15,58
Stimulation Tag 7	10	243,13	589,31	1,30	1913,10	10,28	53,30	140,30

Tabelle 11: Deskriptive Statistiken TNF- α Sekretion bei den Kontrollprobanden.

Erhöhte TNF-a Sekretion nach Impfung

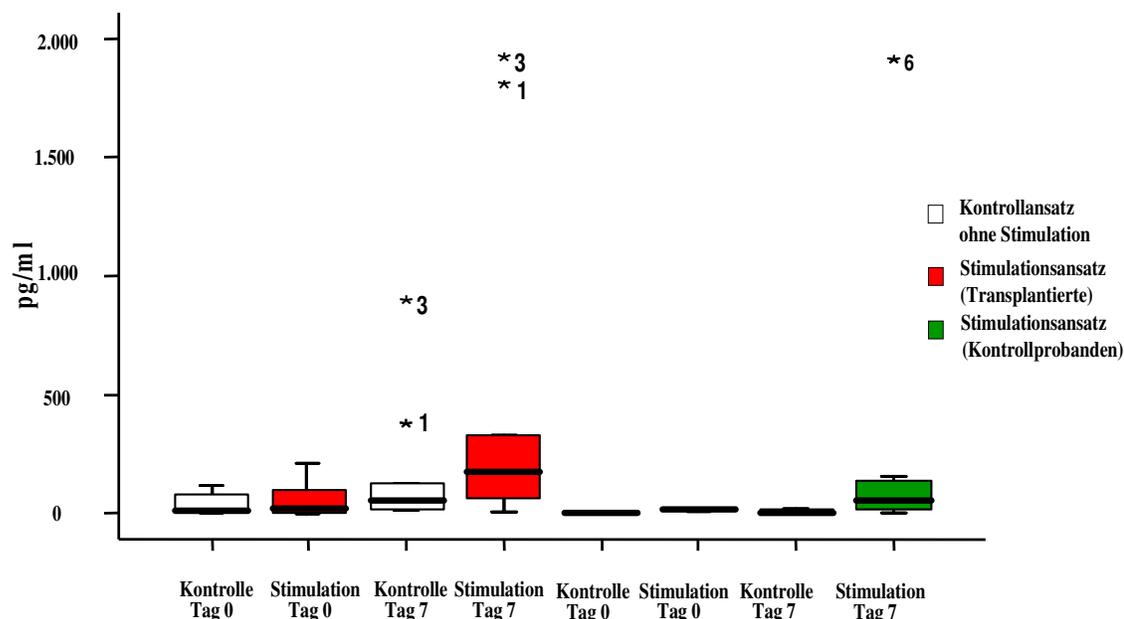


Abbildung 17: Erhöhte Influenza-spezifische TNF-a Sekretion 7 Tage nach Influenza-Impfung (Transplantationspatienten und Kontrollprobanden). Sowohl bei den Patienten als auch bei den Probanden kam es zu einer moderaten, statistisch nicht signifikanten Anstieg (Wilcoxon, $p > 0,05$). Die beiden Gruppen miteinander vergleichend, fällt bei den nierentransplantierten Patienten eine stärkere wenn auch nicht signifikante TNF- α Sekretion auf. Dargestellt sind jeweils die Messwerte aus den Kontrollen (ohne Stimulation) und den Stimulationsansätzen (Influenza-Antigene). Ausreißer sind im Text beschrieben und in der Abbildung mit einem * und der entsprechenden Patienten/Probanden-Nummer versehen und im Text beschrieben.

3.2.3. Interleukin-10-Sekretion

Zwischen Tag 0 und Tag 7 nach Impfung kam es bei den Patienten nach Stimulation zu einem signifikanten Anstieg in der Interleukin-10 Sekretion. (Wilcoxon; $p = 0,037$) (Abb.18). Im Einzelnen kam es hier bei 9 von 10 Patienten (90%) zu einem IL-10-Sekretionsanstieg nach 24 stündiger Stimulation mit Influenza-Antigen. Wiederum fiel auf, dass bei Patient 1 am Tag der Impfung nach Stimulation keine messbaren Werte bestimmt werden konnten. Dem gegenüber entwickelte dieser Patient an Tag 7 nach Stimulation die höchsten Interleukin-10 Konzentrationen in dieser Patientengruppe (>350 pg/ml) (Abb.18).

Bei Patient 3 konnte an Tag 0 und an Tag 7 eine starke IL-10 Sekretion, im Kontroll- sowie im Stimulationsansatz, gemessen werden. Ebenfalls hohe IL-10 Konzentrationen fanden sich bei Patient 7 im Stimulationsansatz an Tag 0. Bei den Kontrollprobanden zeigte sich ebenfalls eine signifikante Steigerung der Interleukin-10 Sekretion an Tag 7 nach der Impfung (Wilcoxon; $p=0,005$) (Abb.18).

Alle Probanden (100%) zeigten an Tag 7 nach Impfung eine gesteigerte IL-10-Sekretion nach 24 stündiger Stimulation mit Influenza-Antigen. Interessanterweise zeigte sich eine durchschnittlich höhere IL-10 Konzentration bei den männlichen Probanden (Mittelwert 44,94 pg/ml) als bei den weiblichen Probanden (Mittelwert 16,14 pg/ml).

Im Vergleich der beiden Gruppen, fand sich an Tag 7 nach Impfung bei den Transplantationspatienten einer stärkere, wenngleich statistisch nicht signifikante Steigerung der IL-10 Sekretion auf (Mann-Whitney U Test $p > 0,05$) (Abb.18).

Deskriptive Statistiken Interleukin-10-Sekretion Transplantierte in pg/ml

	N	Mittelwert	Standardabweichung	Minimum	Maximum	Perzentile		
						25.	50. (Median)	75.
Kontrolle Tag 0	10	5,71	7,99	0,00	25,20	0,00	3,35	9,13
Stimulation Tag 7	10	34,11	45,87	1,70	118,60	3,55	13,45	59,95
Kontrolle Tag 0	10	18,07	30,88	0,00	102,80	1,78	7,05	18,18
Stimulation Tag 7	10	90,53	106,75	12,60	357,10	28,60	36,10	151,43

Tabelle 12: Deskriptive Statistiken der Interleukin-10 Sekretion bei den Patienten.

Deskriptive Statistiken Interleukin-10 Sekretion Kontrollprobanden in pg/ml

	N	Mittelwert	Standardabweichung	Minimum	Maximum	Perzentile		
						25.	50. (Median)	75.
Kontrolle Tag 0	10	3,76	3,26	0,00	9,80	1,58	2,95	6,43
Stimulation Tag 0	10	5,01	3,56	0,00	12,40	2,10	5,95	6,55
Kontrolle Tag 0	10	2,70	2,38	0,00	6,10	,00	2,55	5,15
Stimulation Tag 7	10	30,54	23,39	3,10	69,00	8,58	28,70	49,03

Tabelle 13: Deskriptive Statistiken der Interleukin-10 Sekretion bei den Kontrollprobanden.

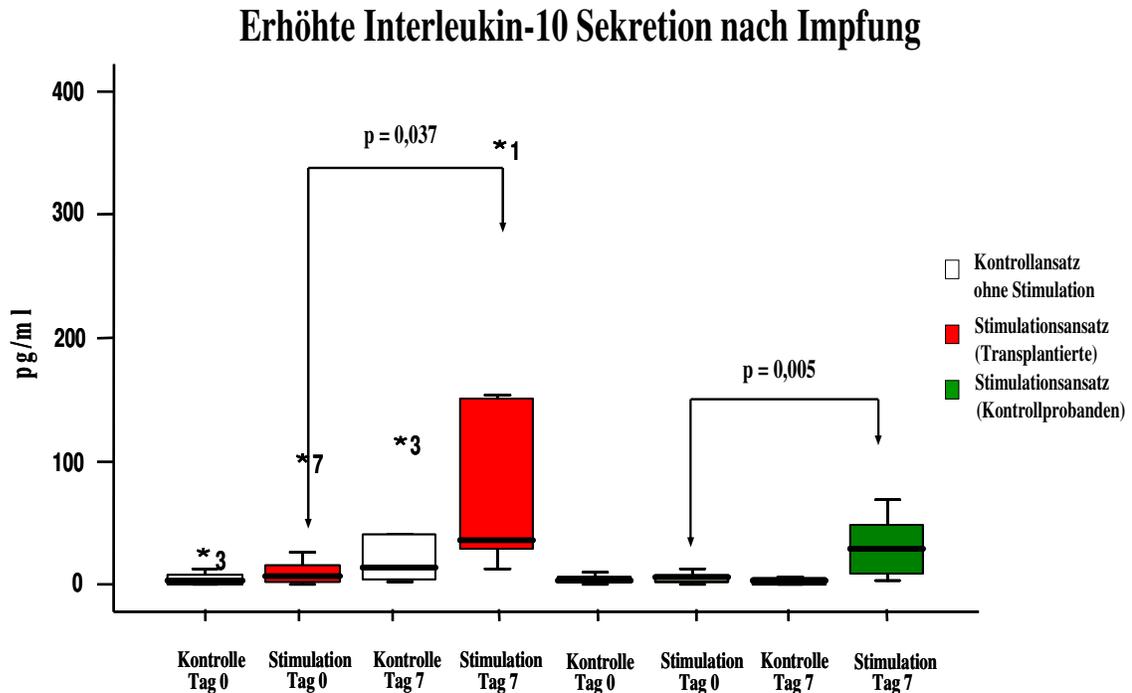


Abbildung 18: Erhöhte Influenza-spezifische Interleukin-10 Sekretion 7 Tage nach Influenza-Impfung (Transplantationspatienten und Kontrollprobanden). Bei den Patienten kam es zu einem signifikanten Anstieg der IL-10 Sekretion (Wilcoxon, $p=0,037$). Bei den Probanden zeigte sich ebenfalls ein signifikanter Anstieg (Wilcoxon, $p=0,005$). Dargestellt sind jeweils die Messwerte aus den Kontrollen (ohne Stimulation) und den Stimulationsansätzen (Influenza-Antigene). Ausreißer sind im Text beschrieben und in der Abbildung mit einem * und der entsprechenden Patienten/Probanden-Nummer versehen.

3.2.4. Interleukin-2-Sekretion

Interleukin-2 kann im Gegensatz zu den vorigen Zytokinen auch von naiven T-Zellen innerhalb von 24 Stunden gebildet werden. Andererseits ist IL-2 besonders sensitiv gegenüber Calcineurininhibitoren wie z.B. Tacrolimus®. Zwischen Tag 0 und Tag 7 nach Impfung kam es bei 5 von 10 Patienten (50%) zu einer Steigerung der IL-2 Sekretion nach 24-stündiger Stimulation mit Influenza-Antigen (Abb.19). Interessanterweise zeigte sich abermals bei den Patienten 1 und 2 wie auch bei Patient 9 an beiden Untersuchungstagen keine IL-2 Antwort.

Bei den Kontrollprobanden kam es zwischen Tag 0 und Tag 7 bei 7 von 10 Probanden (70%) zu einem Anstieg in der Interleukin-2-Sekretion nach 24-stündiger Stimulation mit Influenza-Antigen (Abb.19).

Im Vergleich der beiden Gruppen zeigte sich bei den Kontrollprobanden eine signifikant höhere Influenza-spezifische IL-2 Sekretion nach Stimulation. Dies gilt sowohl für Tag 0 (Mann-Whitney U Test, $p = 0,008$) als auch für Tag 7 nach der Impfung (Mann-Whitney U Test, $p=0,015$) (siehe Abb.19).

Deskriptive Statistiken Interleukin-2-Sekretion Transplantierte in pg/ml

	N	Mittelwert	Standardabweichung	Minimum	Maximum	Perzentile		
						25.	50. (Median)	75.
Kontrolle Tag 0	10	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
Stimulation Tag 0	10	10,71	11,77	0,00	33,20	0,00	6,25	19,03
Kontrolle Tag 7	10	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
Stimulation Tag 7	10	13,98	11,92	0,00	33,20	0,00	14,75	24,65

Tabelle 14: Deskriptive Statistiken der Interleukin-2-Sekretion bei den Patienten.

Deskriptive Statistiken Interleukin-2-Sekretion Kontrollprobanden in pg/ml

	N	Mittelwert	Standardabweichung	Minimum	Maximum	Perzentile		
						25.	50. (Median)	75.
Kontrolle Tag 0	10	2,61	3,27	0,00	8,90	0,00	1,60	4,35
Stimulation Tag 0	10	36,51	24,09	2,90	79,80	17,75	39,65	48,93
Kontrolle Tag 7	10	2,57	2,97	0,00	7,30	0,00	1,50	5,83
Stimulation Tag 7	10	103,27	139,57	8,20	434,40	14,18	50,75	129,63

Tabelle 15: Deskriptive Statistiken der Interleukin-2 Sekretion bei den Kontrollprobanden.

Erhöhte Interleukin-2 Sekretion nach Impfung

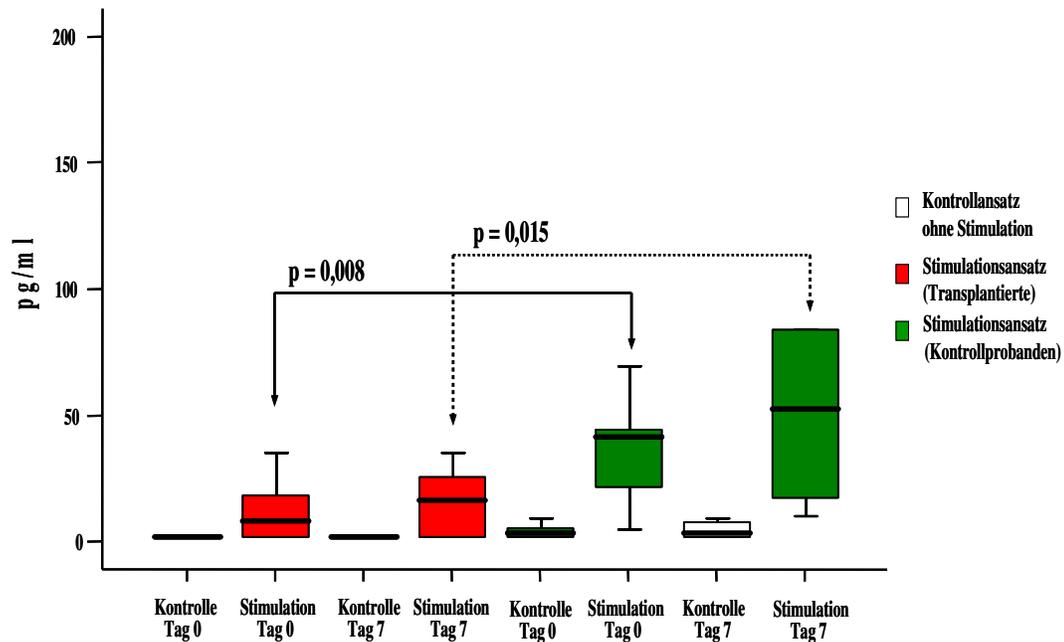


Abbildung 19: Erhöhte Influenza-spezifische Interleukin-2 Sekretion 7 Tage nach Influenza-Impfung (Transplantationspatienten und Kontrollprobanden). Sowohl bei den Patienten als auch bei den Kontrollprobanden kam es zu einem moderaten Anstieg. (Wilcoxon, $p > 0,05$). Des Weiteren fiel auf, dass die Kontrollprobanden sowohl an Tag 0 als auch an Tag 7 eine signifikant höhere IL-2 Sekretion nach Stimulation aufwiesen. (Mann-Whitney U Test $p = 0,008$ und $p = 0,015$). Dargestellt sind jeweils die Messwerte aus den Kontrollen (ohne Stimulation) und den Stimulationsansätzen (Influenza-Antigene).

3.3. Influenza-spezifische Memory-T-Zellfrequenzen nach Impfung

Zwischen Tag 0 und Tag 7 kam es bei den nierentransplantierten Patienten zu einem signifikanten Anstieg der Influenza-spezifischen T-Zellfrequenzen (Wilcoxon; $p = 0,022$) (Abb.20). Im Einzelnen kam es bei 8 von 10 Patienten zu einem Anstieg in den Influenza-spezifischen Memory-T-Zellfrequenzen. Bei den Kontrollprobanden zeigte sich ebenfalls ein signifikanter Anstieg der Influenza-spezifischen T Zellfrequenzen. (Wilcoxon; $p = 0,007$) (Abb.20).

Im Einzelnen kam es bei 9 der 10 Probanden (90%) zu einem Anstieg der T Zellfrequenzen nach 24-stündiger Stimulation mit Influenza-Antigen. Bei Proband 5 wurden an allen Untersuchungstagen sowohl im Kontroll- als auch im Stimulationsansatz teils sehr hohe Influenza-spezifische T-Zellfrequenzen gemessen. Proband 6 zeigte ebenfalls an Tag 0 bereits im Kontroll- und Stimulationsansatz hohe Influenza-spezifische T-Zellfrequenzen (Abb. 20).

**Deskriptive Statistiken Influenza-spezifische T Zellfrequenzen- Patienten
in IFN- γ -positiven Memory T-Zellen/100.000 T-Zellen**

	N	Mittelwert	Standardabweichung	Minimum	Maximum	Perzentile		
						25.	50. (Median)	75.
Kontrolle Tag 0	10	7,47	4,69	1,77	17,50	3,09	7,65	9,90
Stimulation Tag 0	10	32,86	18,06	6,28	65,24	18,45	29,70	49,10
Stimulation- Kontrolle Tag 0	10	25,39	17,83	2,79	59,13	10,12	24,54	39,62
Kontrolle Tag 7	10	18,85	18,05	5,24	56,68	5,50	11,28	34,04
Stimulation Tag 7	10	83,80	66,83	23,45	218,96	26,21	55,23	132,62
Stimulation- Kontrolle Tag 7	10	64,95	52,37	18,09	162,28	18,60	43,58	107,62

Tabelle 16: Deskriptive Statistiken der Influenza-spezifischen T-Zellfrequenzen bei den Patienten.

**Deskriptive Statistiken Influenza-spezifische T Zellfrequenzen- Kontrollprobanden
in IFN- γ -positiven Memory T-Zellen/100.000 T-Zellen**

	N	Mittelwert	Standardabweichung	Minimum	Maximum	Perzentile		
						25.	50. (Median)	75.
Kontrolle Tag 0	10	8,57	8,29	0,68	29,28	2,77	7,87	10,77
Stimulation Tag 0	10	50,73	46,86	6,16	164,57	16,18	42,52	66,93
Stimulation- Kontrolle Tag 0	10	42,16	40,19	5,48	135,29	10,19	34,62	62,06
Kontrolle Tag 7	10	3,46	5,97	0,00	20,09	0,69	1,58	3,40
Stimulation Tag 7	10	120,30	62,54	28,67	234,89	79,63	107,14	164,91
Stimulation- Kontrolle Tag 7	10	116,85	59,30	24,69	214,80	78,85	106,25	163,28

Tabelle 17: Deskriptive Statistiken der Influenza-spezifischen T-Zellfrequenzen bei den Kontrollprobanden.

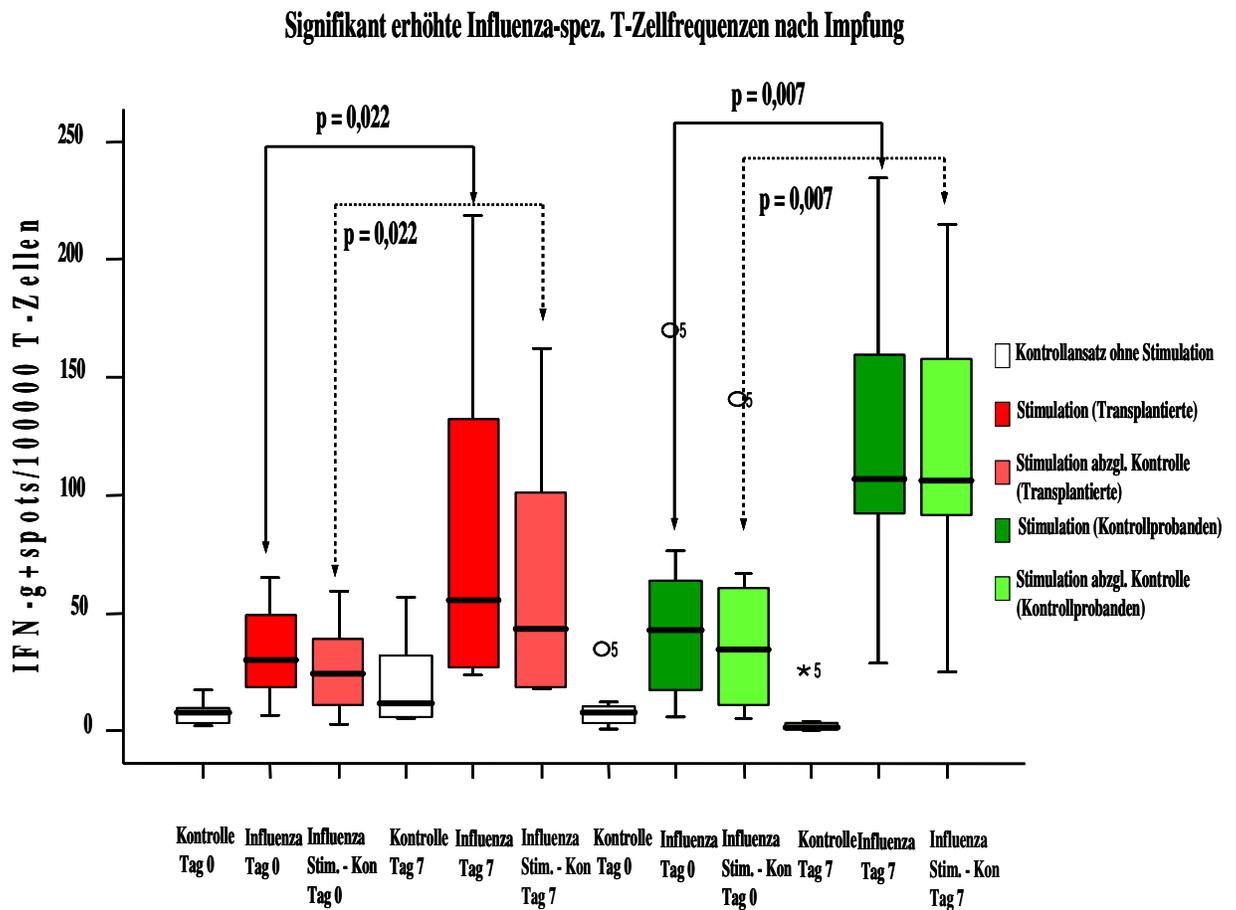


Abbildung 20: Signifikant erhöhte Influenza-spezifische Memory-T-Zellfrequenzen 7 Tage nach Influenza-Impfung (Transplantationspatienten und Kontrollprobanden). Bei den Patienten kam es zu einem signifikanten Anstieg der Influenza spezifischen memory T-Zellfrequenzen nach Impfung (Wilcoxon, $p=0,022$). Bei den Probanden zeigte sich ebenfalls ein signifikanter Anstieg der Influenza-spezifischen Memory-T-Zellfrequenzen (Wilcoxon, $p=0,007$). Dargestellt sind jeweils die Frequenzen aus den Kontrollen (ohne Stimulation), den Stimationsansätzen (Influenza-Antigene) sowie den Stimationsansätzen nach Abzug der Kontrollen. Wichtige Ausreißer wurden im Text beschrieben.

Die beiden Gruppen miteinander vergleichend fällt auf, dass die Kontrollprobanden höhere, wenngleich statistisch nicht signifikante, Influenza-spezifische T-Memory-Zellfrequenzen 7 Tage nach der Impfung entwickeln (Abb.20) (Mann-Whitney U Test, $p= 0,059$). Bei 3 Patienten wurden ähnlich hohe T-Zellfrequenzen wie bei Kontrollprobanden ermittelt.

3.4. Zeichen der systemischen Bystander-Aktivierung nach Impfung

3.4.1. Bystander-Aktivierung der T-Zellantwort

Zwischen Tag 0 und Tag 7 kam es bei 5 von 10 nierentransplantierten Patienten (50%) nicht nur zu einem Anstieg der Influenza-spezifischen T-Zellen (siehe 3.3) sondern auch zu einem Anstieg der Recall-Antigen-spezifischen T-Gedächtniszellfrequenzen (Wilcoxon; $p > 0,05$) (Abb.21). Bemerkenswerterweise zeigten auch diese 5 Patienten einen Anstieg in der monozytären HLA-DR-Expression. Bei den Kontrollprobanden zeigte sich ebenfalls ein signifikanter Anstieg der Recall-Antigen-spezifischen T Zellfrequenzen. (Wilcoxon; $p = 0,005$) (Abb.21). Im Einzelnen kam es bei allen Probanden (100%) zu einem Anstieg der T Zellfrequenzen nach 24-stündiger Stimulation mit Recall-Antigen. Interessanterweise konnten bei Proband 5 an beiden Untersuchungstagen, sowohl im Kontroll- als auch im Stimulationsansatz die höchsten Recallantigen-spezifische T-Zellfrequenzen gemessen werden. Vergleichend zeigten zwar wenige Transplantationspatienten eine Bystander-Aktivierung, dafür aber ausgeprägter, wobei dies vor allem durch höhere Basisfrequenzen bedingt ist. Bemerkenswerterweise fanden wir bei den Patienten eine, im Vergleich zu den Kontrollprobanden, höhere basale Recallantwort, welches jedoch keine statistische Signifikanz zeigte (Mann-Whitney U Test; $p = 0,059$) (Abb.21).

Deskriptive Statistiken Recall-spezifische T Zellfrequenzen Transplantierte
(in IFN- γ pos. T-Zellen/100.000 T-Zellen)

	N	Mittelwert	Standardabweichung	Minimum	Maximum	Perzentile		
						25.	50. (Median)	75.
Kontrolle Tag 0	10	7,47	4,69	1,77	17,50	3,09	7,65	9,90
Stimulation Tag 0	10	98,35	68,94	10,56	203,73	33,79	89,88	153,24
Stimulation- Kontrolle Tag 0	10	90,87	69,97	0,88	197,62	30,41	84,78	147,46
Kontrolle Tag 7	10	18,85	18,05	5,24	56,68	5,50	11,28	34,04
Stimulation Tag 7	10	99,69	55,04	30,29	190,61	44,88	111,62	140,63
Stimulation- Kontrolle Tag 7	10	80,85	45,13	21,54	150,34	32,21	92,93	111,01

Tabelle 18: Deskriptive Statistiken der Recallantigen-spezifischen T-Zellfrequenzen bei den Patienten.

Deskriptive Statistiken Recall-spezifische T-Zellfrequenzen Kontrollprobanden
(in IFN- γ pos. T-Zellen/100.000 T-Zellen)

	N	Mittelwert	Standardabweichung	Minimum	Maximum	Perzentile		
						25.	50. (Median)	75.
Kontrolle Tag 0	10	8,57	8,29	0,68	29,28	2,77	7,87	10,77
Stimulation Tag 0	10	46,07	78,41	3,42	266,38	11,65	19,25	39,54
Stimulation-Kontrolle Tag 0	10	37,50	71,21	0,79	237,10	7,02	10,61	33,99
Kontrolle Tag 7	10	3,46	5,97	0,00	20,09	0,69	1,58	3,40
Stimulation Tag 7	10	67,01	73,99	8,10	265,38	26,52	47,75	78,78
Stimulation-Kontrolle Tag 7	10	63,56	68,58	7,29	245,29	23,95	46,54	77,31

Tabelle 19: Deskriptive Statistiken der Recallantigen-spezifischen T-Zellfrequenzen bei den Kontrollprobanden.

Erhöhte Recall-Antigen-spez. T-Zellfrequenzen nach Impfung

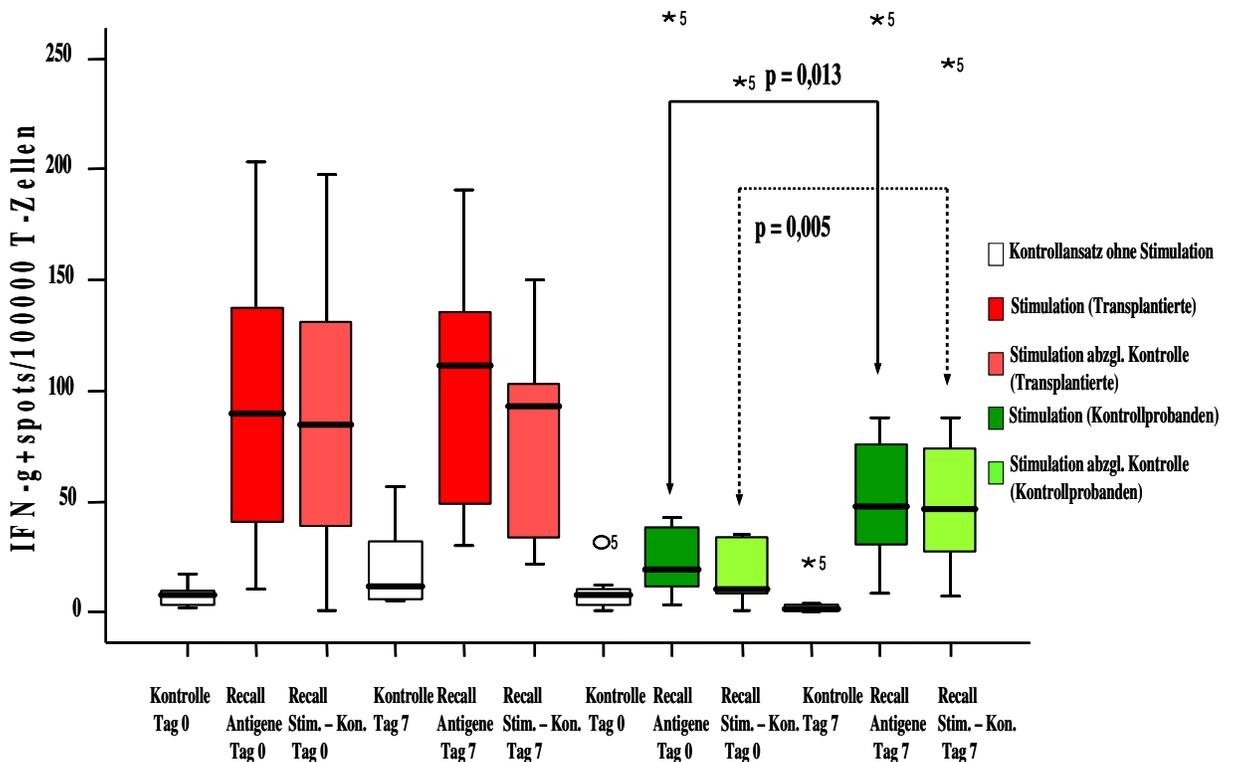


Abbildung 21: Erhöhte Recall-Antigen-spezifische Memory-T-Zellfrequenzen 7 Tage nach Influenzaimpfung (Transplantationspatienten und Kontrollprobanden). Bei den Patienten kam es zu einem moderaten jedoch statistisch nicht signifikanten Anstieg nach Impfung (Wilcoxon, $p > 0,05$). Bei den Probanden zeigte sich ein signifikanter Anstieg der Recall-Antigen-spezifischen Memory-T-Zellfrequenzen (Wilcoxon, $p = 0,013$). Dies zeigte sich ebenfalls auch nach der Subtraktion der Kontrollen von den Stimulationsansätzen (Wilcoxon, $p = 0,005$). Dargestellt sind jeweils die Frequenzen aus den Kontrollen ohne Stimulation), den Stimulationsansätzen (Recall-Antigene) sowie den Stimulationsansätzen nach Abzug der Kontrollen. Wichtige Ausreißer wurden im Text beschrieben.

3.4.2. Monozytäre HLA-DR Expression

Zwischen Tag 0 und Tag 7 nach der Impfung kam es bei den Patienten zu einem signifikanten Anstieg der monozytären HLA-DR Expression (Wilcoxon; $p=0,047$) (Abb.22). Im Einzelnen kam es hier bei 7 von 10 Patienten (70%) zu einem Anstieg. Interessanterweise kam es bei 4 Patienten (1, 2, 4 und 10) zu einem Anstieg von mehr als 40% gegenüber dem Impftag.

Deskriptive Statistiken monozytäre HLA-DR-Expression- Patienten
in Ab/Monozyt

	N	Mittelwert	Standardabweichung	Minimum	Maximum	Perzentile		
						25.	50. (Median)	75.
Tag 0	10	28480,84	10783,47	16472,06	46993,00	19740,63	26016,83	38498,18
Tag 7	10	34667,39	13220,62	20146,96	58219,93	23086,39	33357,90	41899,17
Tag 28	10	25408,53	12256,92	11654,44	53001,11	17456,86	20478,62	34444,33

Tabelle 20: Deskriptive Statistiken der monozytären HLA-DR Expression bei den Patienten und Kontrollprobanden

Monozytäre HLA-DR Expression nach Impfung

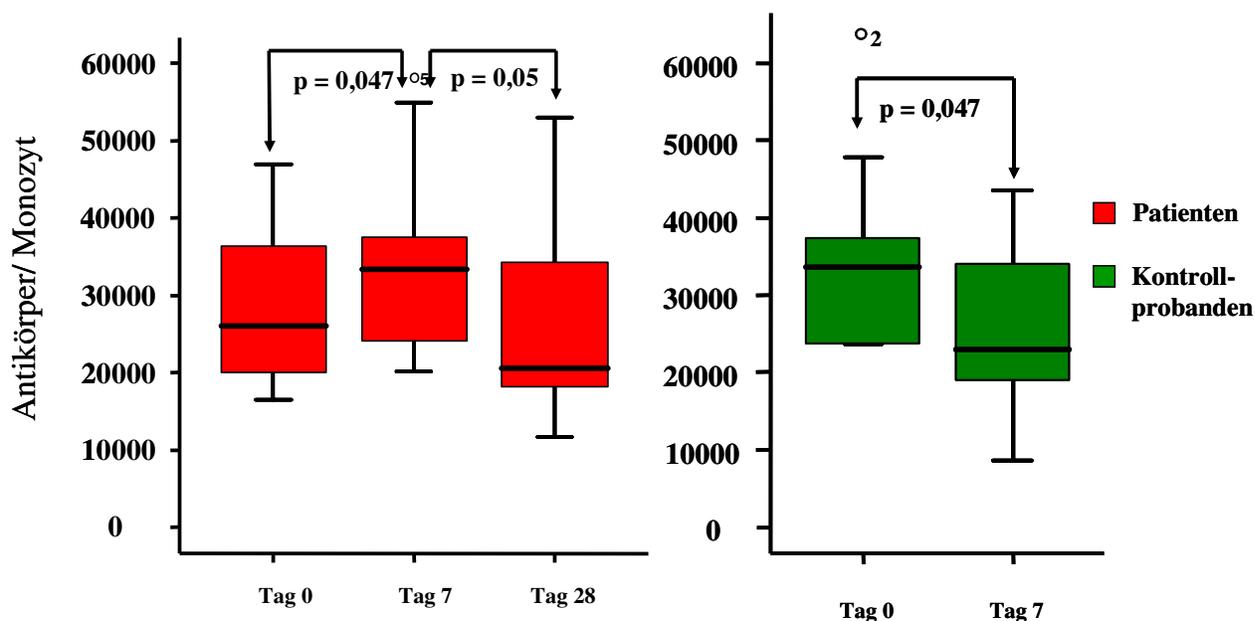


Abbildung 22: Monozytäre HLA-DR Expression nach Influenza-Impfung. Bei den Transplantationspatienten kommt es an Tag 7 nach Impfung zu einer signifikanten Steigerung (Wilcoxon, $p=0,047$). An Tag 28 kam es zu einer signifikanten Erniedrigung (Wilcoxon, $p=0,047$). Bei den Kontrollprobanden kam es an Tag 7 nach der Impfung zu einer signifikanten Erniedrigung der monozytären HLA-DR Expression (Wilcoxon, $p=0,047$).

Bemerkenswerterweise kam es dem gegenüber bei den Kontrollprobanden zu einer signifikanten Verminderung der monozytären HLA-DR Expression.

3.5. Konsequenzen im Transplantat

3.5.1. Realtime-RT-PCR aus den Urinproben der Patienten

Mit der real-time PCR konnten wir bei 8 der 10 Patienten einen mehr als 2-fachen Anstieg in der mRNA-Expression von den untersuchten Aktivierungsmarkern aus dem Urinsediment messen. In 6 von 10 Patienten fanden wir eine deutliche Induktion des in dieser Studie als Infiltrationsmarker verwendeten CD3-mRNA. Ferner fanden wir mRNA-Induktionen von verschiedenen Aktivierungsmarkern wie z.B. Granulysin in 5 von 10, von RANTES in 4 von 10, IP-10 in 2 von 10 und von Granzyme A in 2 von 10 Patienten. Bei einem Patienten fanden wir keine Induktion in keinem der untersuchten Zielgene (Abb.23).

mRNA-Expressionsanstiege im Urin der Patienten 7 Tage nach der Impfung

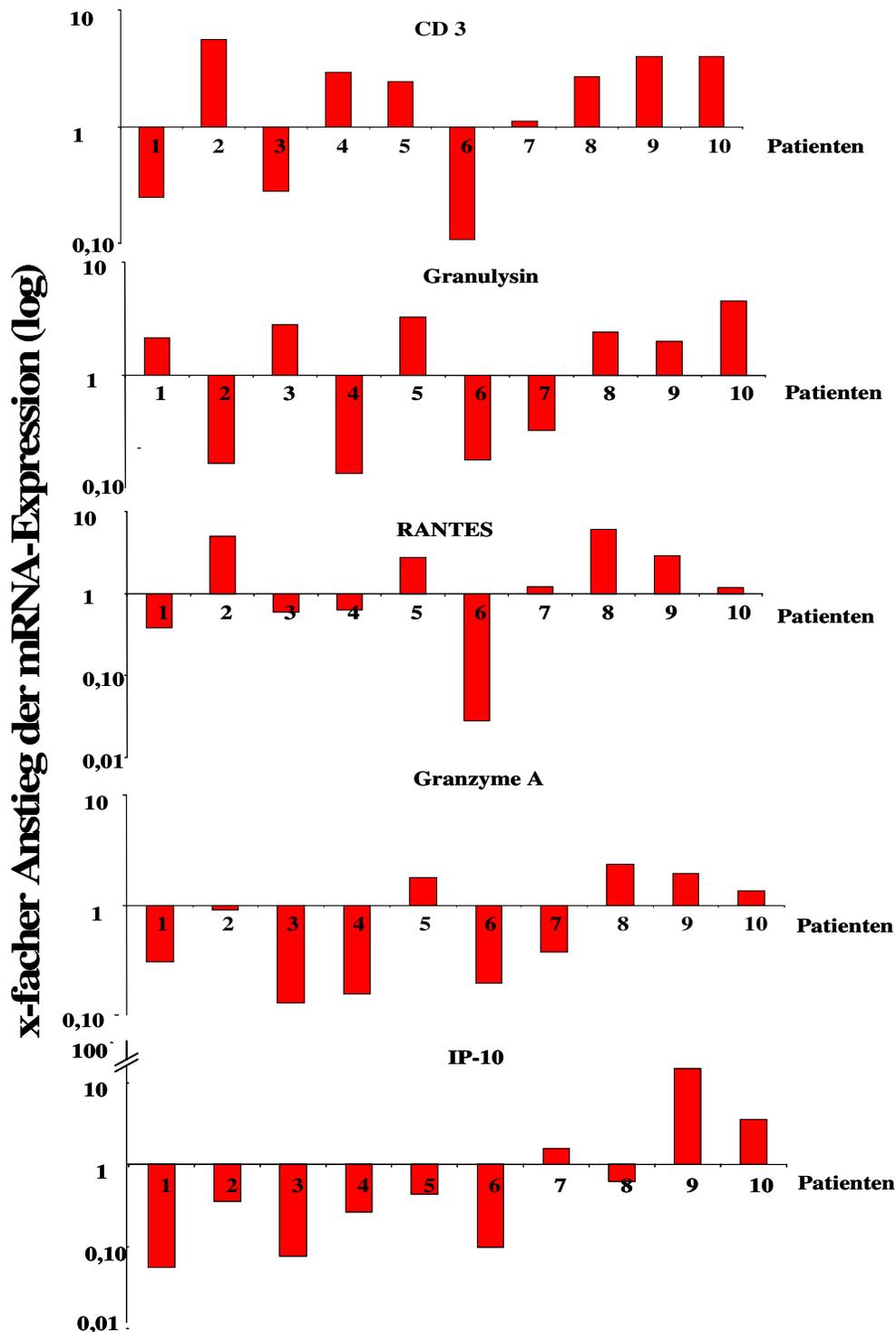


Abbildung 23: In dieser Abbildung sind die jeweiligen Expressionanstiege zwischen der Impfung und 7 Tage nach der Impfung dargestellt. Aus illustrativen Gründen wurden hier die Werte logarithmisch aufgetragen. Insgesamt kam es bei 8 von 10 Patienten zu einem \geq 2-fachen Anstieg in der mRNA Expression der untersuchten Parameter.

3.5.2. Serum-Kreatinin-Konzentrationen

Um eventuell mit der durch die Impfung herbeigeführte Immunaktivierung einhergehende Veränderungen der Transplantatsfunktion zu erfassen, wurden die Serum-Kreatinin-Konzentrationen der Patienten retrospektiv ermittelt. In der Studienphase wurden die Patienten an drei Tagen untersucht. Die Durchschnittswerte vor und nach der Impfung wurden aus der in der Charité Universitätsmedizin Berlin benutzten Datenbank TBase entnommen und berechnet.

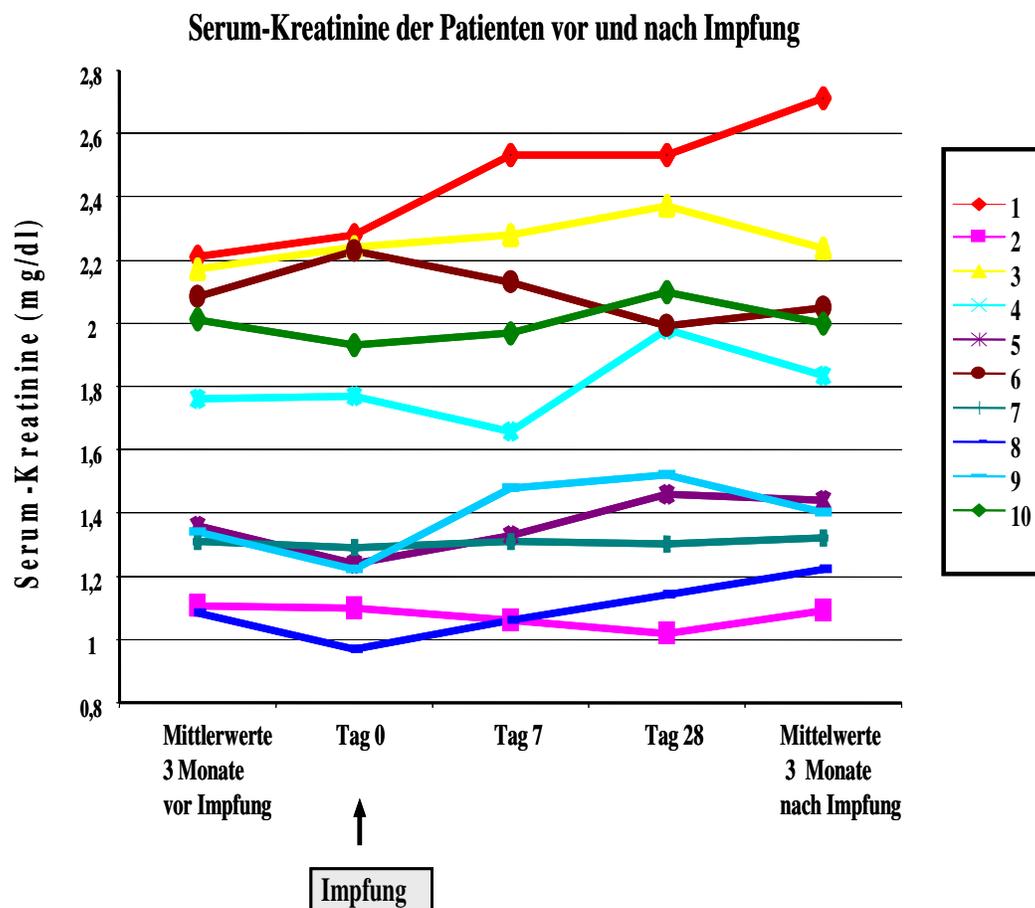


Abbildung 24: Serum-Kreatinin-Konzentrationen der Transplantationspatienten vor und nach Impfung. 7 Tage nach der Impfung kam es bei 7 der Patienten zu einem Serum-Kreatinin-Anstieg. Im Allgemeinen war dieser Anstieg sanft und kurzweilig. Bei 2 Patienten zeigte sich ein Anstieg um mehr als 10% im Vergleich zum 3-Monats-Durchschnitt vor Impfung. Bei Patient 1 kam es jedoch zu einer längeren Erhöhung der Kreatinin-Werte. Im Vergleich zum 3-Monats-Durchschnitt vor Impfung fand sich ein Anstieg von mehr als 22% im 3-Monats-Durchschnitt nach der Impfung. Dargestellt sind die Mittelwerte der einzelnen Patienten vor Impfung, der Wert am Tag der Impfung, 7 Tage, 28 Tage sowie die Mittelwerte im 3-Monats-Durchschnitt nach der Impfung.

Sieben Tage nach der Impfung zeigte sich bei 7 von 10 Patienten (70%) ein (absoluter) Anstieg des Serum-Kreatinins. Bei 2 Patienten (Patient 1 und Patient 9) kam es hier zu sogar zu einem Anstieg um mehr als 10% gegenüber dem Wert am Tag der Impfung. In den meistens Fällen war dieser Anstieg jedoch mild und vorübergehend. Allerdings kam es bei Patient 1, der bereits bei den anderen Untersuchungen durch teilweise starke und teilweise geringe bis nicht vorhandene Zytokinantworten auffiel, zu einem längeren Anstieg der Serum-Kreatinin-Werte. Die Werte erreichten ein Konzentrationsmaximum an Tag 14 nach Impfung und blieben auch an Tag 28 auf hohem Niveau. Es gilt zu erwähnen, dass dieser Patient bereits vor Impfung ein relativ hohes Kreatinin-Niveau aufwies (Abb.24). Im 3-Monatsdurchschnitt nach Impfung zeigte sich sogar einen Anstieg von mehr als 22%. Weiterhin ist es wichtig zu erwähnen, dass dieser Patient in den Jahren nach der Transplantation bereits 3 Rejektionsepisoden entwickelte, die jedoch alle auf eine eingeleitete Rejektionstherapie ansprachen. Ferner konnten keine Korrelation der beobachteten Funktionseinschränkungen weder mit Alter, Geschlecht, Immunsuppressives Regime oder in der Vergangenheit aufgetretene Rejektionsepisoden aufgezeigt werden.

4. Diskussion

Infektionen im Allgemeinen stellen heute nach wie vor eine der häufigsten und gefährlichsten Komplikationen bei Patienten mit Solidorgan- sowie Knochenmarktransplantationen in der Posttransplantationsphase dar. In dieser Patientengruppe gehen Infektionen mit einem hohen Maß an Morbidität und Mortalität einher. Neben bakteriellen, fungalen und in geringerem Ausmaß parasitären Infektionen, sind insbesondere die viralen Infektionen unter Transplantationspatienten eng mit Komplikationen vergesellschaftet. Aus diesem Grund ist es von großer Bedeutung, diese Patientengruppen vor allem durch Prophylaxe vor Infektionen zu schützen. Bei Influenzaviren ist die aktive Immunisierung mit einem Totimpfstoff die Methode der Wahl, die seit vielen Jahren durchgeführt wird (Harper et al., 2004). Die theoretische Möglichkeit einer Transplantatsschädigung durch eine allgemeine Immunaktivierung und unregelmäßig veröffentlichte Casereports (Wertheim et al., 2001, Blumberg et al., 1998, Roddy et al., 2005), in denen nach Impfung Abstoßungsreaktionen oder Autoimmunphänomene beschrieben wurden, hat in letzter Zeit zu einer gewissen Impfscheue unter Transplantationsmedizinern geführt. In der vorliegenden Arbeit untersuchten wir die Effekte der Influenza Impfung an einem Kollektiv von Nierentransplantierten Patienten und gesunden Kontrollprobanden auf spezifische und systemische Immunreaktionen. Wir konnten in der vorliegenden Arbeit erstmals zeigen, dass es unter Nierentransplantationspatienten in vielen Fällen nach Influenza-Impfung zu einer Bystander-Immunaktivierung kommen kann, die sich in einer erhöhten Immunaktivierung im Transplantat (vor allem CD3, Granulysin und RANTES, u.a.) widerspiegelt und in einigen Fällen zu einer Verschlechterung der Transplantatsfunktion führt. Dieser Zustand scheint im Allgemeinen nur von vorübergehendem Charakter und kehrt nach einer kurzen Zeit wieder auf das Ausgangsniveau zurück. Die Influenza-Impfung stellt die gegenwärtig effektivste Form der Prophylaxe von Influenza-Infektionen dar. Sie wird in den meisten Fällen gut vertragen und induziert einen immunologischen Schutz. Aufgrund der Möglichkeit einer adversen Reaktion erscheint es jedoch sinnvoll, Transplantationspatienten nach Immunisierungen einem Monitoring zuzuführen, um eventuelle Bystander-Aktivierung, frühzeitig aufzudecken und interventionell eingreifen zu können.

Zusammenfassend konnten wir die zu Beginn der Arbeit formulierten Fragestellungen wie folgt beantworten:

4.1. Lassen sich Influenza-spezifische humorale Immunantworten bei nierentransplantierten Patienten nach Impfung messen?

In der vorliegenden Arbeit konnten wir bei einem großen Anteil (50%) der Transplantationspatienten einen Anstieg der Influenza A-spezifischen Antikörper nachweisen, welcher allerdings, im Vergleich zu den Kontrollprobanden, signifikant geringer ausfällt (Abb.10-15). Darüber hinaus scheint die Antikörperproduktion bei den Patienten, einer deutlich langsameren Kinetik zu unterliegen, als bei Kontrollprobanden. Diese Ergebnisse bestätigen eine große Anzahl in der Vergangenheit durchgeführter Studien, die in nierentransplantierten Patienten geringere Impferfolge nachweisen konnten (Blumberg et al., 1996; Sanchez-Fructuoso et al., 2000, Cavdar et al., 2003). Diese Beobachtungen wurden auch bei Patienten mit anderen Organtransplantationen wie Lunge, Herz und Leber (Hayney et al., 2004; Dengler et al., 1998, Duchini et al., 2001) gemacht. Der Grund hierfür liegt in der chronisch immunsuppressiven Therapie, die für den Erhalt des Allotransplantats essentiell ist. In einigen Arbeiten konnte der Einfluss von verschiedenen Immunsuppressiva auf die Impfantwort gezeigt werden. So fand man in einer Studie eine Hemmung der humoralen Immunantwort durch Ciclosporin A, während Azathioprin keinen hemmenden Einfluss zeigte (Versluis et al., 1998). Andere beobachteten eine starke Hemmung der Immunantwort unter Mycophenolat mofetil (Smith et al., 1998). Wir konnten in unserer Studie jedoch keinen Zusammenhang zwischen dem immunsuppressiven Regime und der humoralen Immunantwort nach Influenza-Impfung aufzeigen. Unter den Transplantationspatienten fanden sich einige non-responder, die keinen oder nur einen unzureichenden Anstieg in der Antikörperkonzentration entwickelten. Ferner fiel auf, dass sowohl die Patienten als auch die Kontrollprobanden gegenüber Influenza A eine stärkere humorale Immunantwort generierten als gegen Influenza B. Dieses stimmt mit den Ergebnissen anderer Arbeiten überein (Dengler et al. 1998, Blumberg et al., 1996, Sanchez-Fructuoso et al., 2000). Interessanterweise fanden wir einen Patienten (Patient 6) der gegen beide Influenza Typen (A/B) eine gute Immunantwort, sowohl humoraler als auch zellulärer Art entwickelte. Ein Grund hierfür könnte eine Art „Resistenz“ oder Unempfindlichkeit gegen Immunsuppressiva sein. Es sind verschiedene Mechanismen bekannt, die zu einer verminderten Wirkung von Immunsuppressiva führen können.

So ist z.B. bekannt, dass das Enzym Thiopurinmethyltransferase (TPMT) für die Verstoffwechslung des wirksamen Metaboliten von Azathioprin, 6-Mercaptopurin, essentiell ist. In einem gewissen Teil der Bevölkerung liegt eine heterozygote Schädigung des Enzyms vor, welche zu Nebenwirkungen bei der Therapie mit Azathioprin führen kann. So kann eine gesteigerte Aktivität dazu führen, dass es zu einer Verminderung der Wirkung von Azathioprin kommen kann. Eine starke Aktivitätseinschränkung führt wiederum zu toxischen Nebenwirkungen wie z.B. Panzytopenie u.a. führen (Ford et al., 2004). Ein anderes Beispiel für Wirkungsminderung bei der Anwendung von Immunsuppressiva ist bei Tacrolimus beschrieben worden. In einer Studie konnte der Einfluss von Polymorphismen des p-Glycoproteins und des CYP3A5-Gens auf die Bioverfügbarkeit von Tacrolimus gezeigt werden (Tsuchiya et al., 2004). Cytochrom P 450 Enzyme spielen eine wesentliche Rolle im Metabolismus von diesem und anderen Medikamenten. Das p-glycoprotein, ein Ionenkanal und Produkt des MDR-1 Gens (multi drug resistance-gene) bedingt einen starken Efflux von exogenen Substanzen verschiedenster Stoffe aus der Zelle. Tacrolimus ist Substrat für beide Enzyme. Auch bei Ciclosporin A finden sich verschiedene Diese und andere Arbeiten zeigen auf, dass die Dosierung von Immunsuppressiva eine genaue und individuelle Einstellung erfordert. Allerdings scheint der Grund für die sehr gute humorale Antwort bei Patienten 6 nicht an den genannten Mechanismen zu liegen (Abb. 9 und 10). Offensichtlich scheint die Immunsuppression effektiv gewesen zu sein, zumindest hinsichtlich des Erhaltes des Transplantats. Der Patient lebte zum Zeitpunkt der Impfung bereits seit mehr als 3 Jahren mit einem Spenderorgan, wenngleich er in dieser Zeit zwei Rejektionsepisoden entwickelte. Die Hintergründe, die zu Unterschieden in der humoralen Immunantwort unter Transplantationspatienten führen, sind noch nicht ausreichend geklärt. Zum einen könnte es an einer „Unterimmunsuppression“ durch zu niedrige Dosierung und zum anderen auch an der unterschiedlichen interindividuellen pharmakogenetischen Ausstattung liegen. Zusammenfassend konnten wir in unserer Studie bei nierentransplantierten Patienten eine Influenza-spezifische humorale Immunantwort nachweisen. Diese fällt jedoch, im Vergleich zu den gesunden Kontrollprobanden, vermindert aus.

4.2. Lassen sich Influenza-spezifische zelluläre Immunantworten bei nierentransplantierten Patienten nach Impfung messen?

4.2.1. Zytokinsekretion aus Vollblutüberständen

Die in dieser Arbeit, nach unserem Kenntnisstand, erstmals untersuchte Zytokinantwort auf die Influenza Impfung unter nierentransplantierten Patienten, erbrachte eine starke TNF- α , IFN- γ sowie eine starke IL-10 Antwort (Abb.16-19). Dieses deutet auf eine balancierte Th-1/Th2-Zytokinantwort hin. Das Th1/Th2 Paradigma geht auf die Arbeiten von Mosmann und Mitarbeitern (Mosmann et al., 1986) zurück. In dieser tierexperimentellen Arbeit berichteten die Autoren von murinen T-(h)elfer-Zellen, welche in funktionellen Subpopulationen organisiert sind. Diese waren imstande verschiedene Zytokine zu sezernieren und verfügten über verschiedene Effektormechanismen. In folgenden Studien konnte unter diesen T-Zellen eine klare Dichotomie erkannt werden (Abbas et al., 1996). Hierbei zeichneten sich zwei T-Zell-Subpopulationen aus. Diese wurden Th1- und Th2-Zellen genannt und wurden vornehmlich anhand ihres Zytokinprofils unterschieden. Th1 Zellen sezernieren IFN- γ , TNF- α und IL-2, während die Th2 Zellen andererseits IL-4, IL-5, IL-13 und IL-10 sezernieren. Erstere spielen eine wichtige Rolle in der Immunantwort gegen Viren und intrazellulären Pathogenen und letztere mehr bei humoralen Immunantworten und gegen Parasiten (Abbas et al., 1996; Del Prete et al., 1994). In den folgenden Jahren wurde dieses Paradigma durch neue Erkenntnisse immer detaillierter fundiert. Eine weitere große Veränderung des Th1/Th2 Paradigmas wurde in den letzten Jahren eingeführt (von Herrath und Harrison, 2003). Wiederum im murinen Modell fand man gewisse Th Zellen, die nicht in der Lage waren IFN- γ und IL-4 zu sezernieren, d.h. keiner der oben beschriebenen Subpopulationen zugeordnet werden konnten. Vielmehr exprimierten sie TGF- β , IL-10 und CD25 (α -Kette des IL-2-Rezeptors). Diese regulatorische T-Zellen (Tregs) nehmen seitdem einen neuen Platz im Verständnis der Immunantworten ein und werden gegenwärtig sehr intensiv untersucht. Ihnen wird eine Vermittlerrolle im Th1/Th2 Dialog zugesprochen. Unter Umständen sind diese Zellen in der Lage übermäßige Immunreaktionen gegen fremde, wie auch Selbstantigene zu unterdrücken. In tierexperimentellen Ansätzen ist es durch adoptiven Transfer gelungen Autoimmunerkrankungen zu „heilen“ und Toleranz gegenüber allogenen Transplantaten zu induzieren (Jiang und Lechler, 2006).

Diese Tregs sind auch in Menschen nachgewiesen worden und man erhofft sich weiteren Wissenszuwachs und Verständnis über das Zusammenspielen dieser 3 Hauptsäulen der zellulären Immunität (Read et al., 2001). Die in unserer Studie aufgedeckte balancierte Th1/Th2 Immunantwort stellt ein Novum dar. Die Influenza-spezifische Zytokinantwort bei Transplantationspatienten ist bisher nicht ausreichend untersucht worden. Eine erst kürzlich im murinen Modell durchgeführte Studie untersuchte die unterschiedliche Zytokinantwort auf verschiedene Formulierungen der Influenza-Impfung und verglich sie mit der Antwort bei einer Influenzainfektion (Szyszko et al., 2006). In dieser Studie konnte gezeigt werden, dass verschiedene Formulierungen des Impfstoffes verschiedene Immunantworten induzieren. So induzierte eine whole-virus Impfung eine Th1 betonte Zytokinantwort, während die Impfung mit dem Spaltimpfstoff eine vornehmlich Th2 betonte Zytokinantwort hervorbrachte. Interessanterweise zeigten die Patienten im Vergleich zu den Kontrollprobanden eine stärkere IL-10 und TNF- α Sekretion. Demgegenüber zeigte sich bei ihnen, sehr wahrscheinlich aufgrund der immunsuppressiven Medikamente, eine geringere IL-2 und IFN- γ Sekretion. Die Beobachtung, dass einige Patienten wie auch Probanden teilweise mit sehr starken Zytokinsekretionen reagierten und andere wiederum keine messbare Zytokinsekretion erzielten und „anerg“ erschienen, bleibt unklar. Offensichtlich scheinen einige Individuen, sowohl gesunde Kontrollprobanden als auch Patienten unter chronisch immunsuppressiver Therapie, nach Impfung zu einer starken Aktivierung des zellulären und humoralen Immunsystems zu neigen.

4.2.2. Influenza-spezifische T-Memory-Zellfrequenzen

Wir konnten bei einem Großteil der Transplantationspatienten nach Influenza-Impfung bereits nach 7 Tagen eine Erhöhung der Influenza-spezifischen T-Zellen messen (Abb.20). Dieses steht im Einklang mit einer Studie von Lindemann et al. aus dem Jahr 2006. Hier konnten die Autoren erstmals eine Zunahme von Influenza-spezifischen T-Zellen nach Impfung bei Nierentransplantationspatienten nachweisen. Allerdings unterscheidet sich diese Studie von unserer Studie im Studiendesign und in den angewandten Methoden. Zunächst unterscheiden sich diese Arbeiten in den Untersuchungsstagen. Während wir an Tag 0, Tag 7 und Tag 28 die Patienten einbestellten, untersuchte die Gruppe die Patienten an Tag 0, Tag 7 und 1 Jahr nach der Impfung. Zum anderen entschieden wir uns bei dem ELISPOT-Assay für eine Inkubationszeit von 24 Stunden. In dieser Zeitspanne werden vor allem Memory-T-Zellen zur Proliferation und Produktion von IFN- γ angeregt. Lindemann und Mitarbeiter entschieden sich

für eine Inkubationszeit von 48 Stunden (Lindemann et al., 2006). Bei dieser Inkubationszeit ist es möglich, dass Effektorzellen gemessen wurden. Allerdings lagen die ermittelten Influenza-spezifischen T-Zellfrequenzen in der o.g. Studie bei 5 bzw. 25/100000 T-Zellen. IFN- γ hat (in vivo) eine Halbwertszeit von ca. 4 Stunden. Somit ist es möglich, dass die, im Vergleich zu unserer Studie niedrigen Influenza-spezifischen T-Zellen, in der Inkubationszeit von 48 h begründet liegen. Ein anderer Unterschied liegt an den Patientenkollektiven. Unsere Patienten wurden in den letzten Jahren regelmäßig gegen Influenza-Viren geimpft, welches dazu geführt haben könnte, dass sie im Vergleich zu den Patienten der anderen Studie, relativ hohe Influenza-spezifische Memory-T-Zellfrequenzen aufwiesen, die offenbar trotz chronischer Immunsuppression fortbestanden und bei der erneuten Stimulation durch die Impfung adäquat reagierten und proliferierten. Ein anderer plausibler Grund für die hohen spezifischen Memory-T-Zellfrequenzen könnte wiederum an der Impfzeit gelegen haben. Unsere Patienten wurden zwischen Februar und April 2004 geimpft. Es ist möglich, dass in den Wintermonaten 2003 es bei den Patienten durch Exposition mit Influenza-Viren zur „Boosterung“ gekommen ist, welches die gemessenen Frequenzen bedingte. Allerdings fanden wir nicht bei allen Patienten hohe Influenza-spezifische T-Zellfrequenzen. Auch fanden wir Patienten bei denen kein Anstieg sondern ein Absinken der T-Zellfrequenzen zu verzeichnen war. Wie erwartet, fiel die zelluläre Antwort auf die Impfung bei den Transplantationspatienten in den meisten Fällen geringer aus, als bei den Kontrollprobanden. Die Tatsache, dass wir in einigen Fällen eine ähnlich starke Antwort, wie bei den Kontrollprobanden finden konnten, weist auf die zunehmende Annahme hin, dass Memory T-Zellen gegen gängige Immunsuppressions-Regime in vielen Fällen weniger anfällig sind.

4.3. Lassen sich Bystander-Aktivierungen bei nierentransplantierten Patienten nach Impfung messen?

In unserer Arbeit konnten wir erstmals eine unspezifische Bystanderaktivierung von T-Zellen in Nierentransplantierten nach aktiver Immunisierung nachweisen. In einem großen Teil des Patientenkollektivs (50%, n=10) kam es nach Impfung neben einem Anstieg von spezifischen Memory-T-Zellen auch zu einem Anstieg von T-Zellen gegen einen Mix von verschiedenen Recallantigenen (Abb. 20 und Abb. 21). Interessanterweise konnten wir bei diesen Patienten auch parallel eine erhöhte monozytäre HLA-DR Expression nachweisen, welches auf eine systemische Immunaktivierung hindeutet. Die HLA-DR Expression ist, wie bereits eingangs beschrieben, ein guter Marker für die Aktivität des zellulären Immunsystems, da es als MHC-Molekül die Präsentationsfähigkeit von Antigenpräsentierenden Zellen (APC) fördert und den Weg für eine adäquate Immunantwort ebnet. Monozyten, als leicht zugängliche Antigenpräsentierende Zellen, eignen sich im klinischen Alltag gut als Aktivitätsmarker des Immunsystems. Interessanterweise konnte in einigen anderen Arbeiten nach Influenza- und Gelbfieber-Impfung eine milde systemische Immunaktivierung nachgewiesen werden (Verschurr et al., 2004, van der Beek et al., 2005, Tsai et al., 2005). Diese spiegelte sich vor allem in einer gesteigerten akuten Phase Antwort wider. Man beobachtete Anstiege von c-reaktives Protein, SAA Serumamyloid, IL-6 und Fibrinogen. Allerdings wurden in den erwähnten Arbeiten nur kleine Populationen (max. n= 25) gesunder Kontrollprobanden untersucht. In einer erst kürzlich erschienen Studie wurden die Effekte der Influenza-Impfung auf die akute Phase Antwort in gesunden Probanden und Patienten mit Carotis-Stenose untersucht. Hier fand man in beiden Gruppen erhöhte Parameter der akuten Phase nach Impfung (Carty et al., 2006). Diese und unsere Daten deuten darauf hin, dass die Influenza Impfung mit einer systemischen, wenngleich auch vorübergehenden Immunaktivierung einhergehen kann. In murinen Modellen aber auch im Menschen sind sowohl nach Infektionen als auch nach Impfungen das auftreten von Allo- und Autoimmunität nachweisen worden (Yang et al., 1986, Abu-Shakra et al., 2002, Di Genova et al., 2006). Abu-Shakra et al. untersuchten in einer Kohorte von SLE-Patienten (systemischer Lupus erythematoses) die Effekte der Influenza-Impfung auf die Induktion von Autoantikörpern. Hierzu wurden die Patienten zu drei Untersuchungsterminen einbestellt (Tag der Impfung, 6 Wochen und 12 Wochen nach Impfung). In einem Großteil der Fälle konnten nach der Impfung (bis zu 12 Wochen) verschiedene Autoantikörper detektiert werden, die zum Zeitpunkt der Impfung nicht vorlagen. In einer weiteren Studie konnten Roddick et al. dieses Phänomen bestätigen

(Roddick et al., 2005). Hier wurden die Effekte von 2 verschiedenen Immunisationsprotokollen in 2 verschiedenen Kollektiven untersucht: (a) an Malignomen erkrankte Menschen im Endstadium und b) gesunde Studenten. Diese wurden a) Lewis Y Antigen und b) gegen Hepatitis A/B geimpft und die humorale Antwort an verschiedenen Untersuchungstagen gemessen. Parallel hierzu wurden die entnommenen Lymphozyten mit T-Zelldepletierten PBMC's von unverwandten Spendern und per Zufall ausgesuchten Individuen stimuliert und mittels ELISPOT die Frequenzen alloreaktiver T-Zellen gemessen. In vielen Fällen konnte sowohl bei den Patienten als auch bei den Kontrollprobanden neben einer Erhöhung der alloreaktiven T-Zellfrequenzen auch ein Anstieg von Alloantikörpern nachgewiesen werden. Allerdings fand man in einigen Fällen keine Veränderung der Alloimmunität. Somit scheint die Wirkung der Immunstimulation heterogen und nicht vorrausagbar zu sein. In beiden oben beschriebenen Studien waren diese Beobachtungen von kurzer Dauer, wenngleich einige Studienteilnehmer über den gesamten Studienzeitraum und länger (bis zu 180 Tagen nach Impfung) erhöhte Parameter aufwiesen. In einer, in neuerer Zeit erschienen Studie von Di Genova et al., konnte ebenfalls nach Impfung neben einer spezifischen Antwort eine simultane unspezifische Antwort aufgezeigt werden (Di Genova et al., 2006). Gesunde Probanden wurden gegen Tetanus Toxin geimpft und in regelmäßigen Abständen (bis 20 Wochen nach Impfung) auf zelluläre und humorale Antworten gegen PPD und *Candida albicans* parallel untersucht. Wie in unserer Studie konnten auch hier in vielen Fällen neben der spezifischen Immunantwort parallel eine Bystanderaktivierung der T-Zellantwort beobachtet werden. Wir konnten in unserer Studie dieses Phänomen bei Nierentransplantationspatienten nach Influenza-Impfung beobachten. Offensichtlich verfügen Transplantationspatienten über einen großen Pool an Memory-T-Zellen, die gegen verschiedene Antigene reagieren können. Diese sind in vielen Fällen auch in der Lage, im Rahmen einer Bystanderaktivierung, trotz chronischer Immunsuppression, aktiviert zu werden und zu proliferieren. Die oben genannten Untersuchungen und die Ergebnisse unserer Studie deuten darauf hin, dass es in vielen Fällen im Rahmen einer spezifischen Stimulierung es zu einer zeitgleichen unspezifischen Aktivierung des Immunsystems kommen kann. Mögliche Gründe für diese Beobachtungen ergeben sich aus den folgenden Gesichtspunkten:

Zum einen besitzen Memory-T-Zellen, im Vergleich zu naiven T-Zellen, eine signifikant niedrigere Aktivierungsschwelle (Volk und Kern, 2001). Sie sind in der Lage schnell, binnen Stunden, Effektorphänotyp und- funktionen anzunehmen; selbst mit einer weitaus geringeren Menge an Antigen (Tanchot et al., 1997, Rogers et al., 2000, Veiga-Fernandez et al., 2000). Zum anderen ist bekannt, dass alle Individuen sowohl über autoreaktive als auch über

alloreaktive T-Zellen verfügen. Diese werden in den meisten Fällen durch verschiedene Mechanismen supprimiert und bewirken, nur im Falle eines Kontrollverlustes des Immunsystems, die Manifestation einer Autoimmunerkrankung oder der Entwicklung von Rejektionen. Kommt es im Rahmen einer Infektion oder Immunisierung zu einer Immunaktivierung, so ist es möglich, dass verschiedene Subpopulationen von Memory T-Zellen mit verschiedenen Spezifitäten, wie in unserer Studie gegen eine Mixtur von Recallantigenen, in diesem Milieu „konkomittierend“ aktiviert werden. Diese können anschließend gegen verschiedene Pathogene, aber auch gegen verschiedene Auto- oder Alloantigene reagieren. Di Genova et al. konnten zeigen, dass Memory T-Zellen in einer Umgebung von anderen Memory Zellen zytokinabhängig aktiviert werden können (Di Genova et al., 2006). Somit ist es möglich, dass die nach der Influenza-Impfung in den Lymphknoten induzierte Immunantwort, durchaus zu der besagten Bystanderaktivierung führen kann. Unsere Ergebnisse bei der Messung Recall-Antigen reaktiver T-Zellen unterstützen diese Theorie. In einem schematischen Modell wird im Folgenden die Theorie der Bystanderaktivierung dargestellt und erläutert (Abb.25).

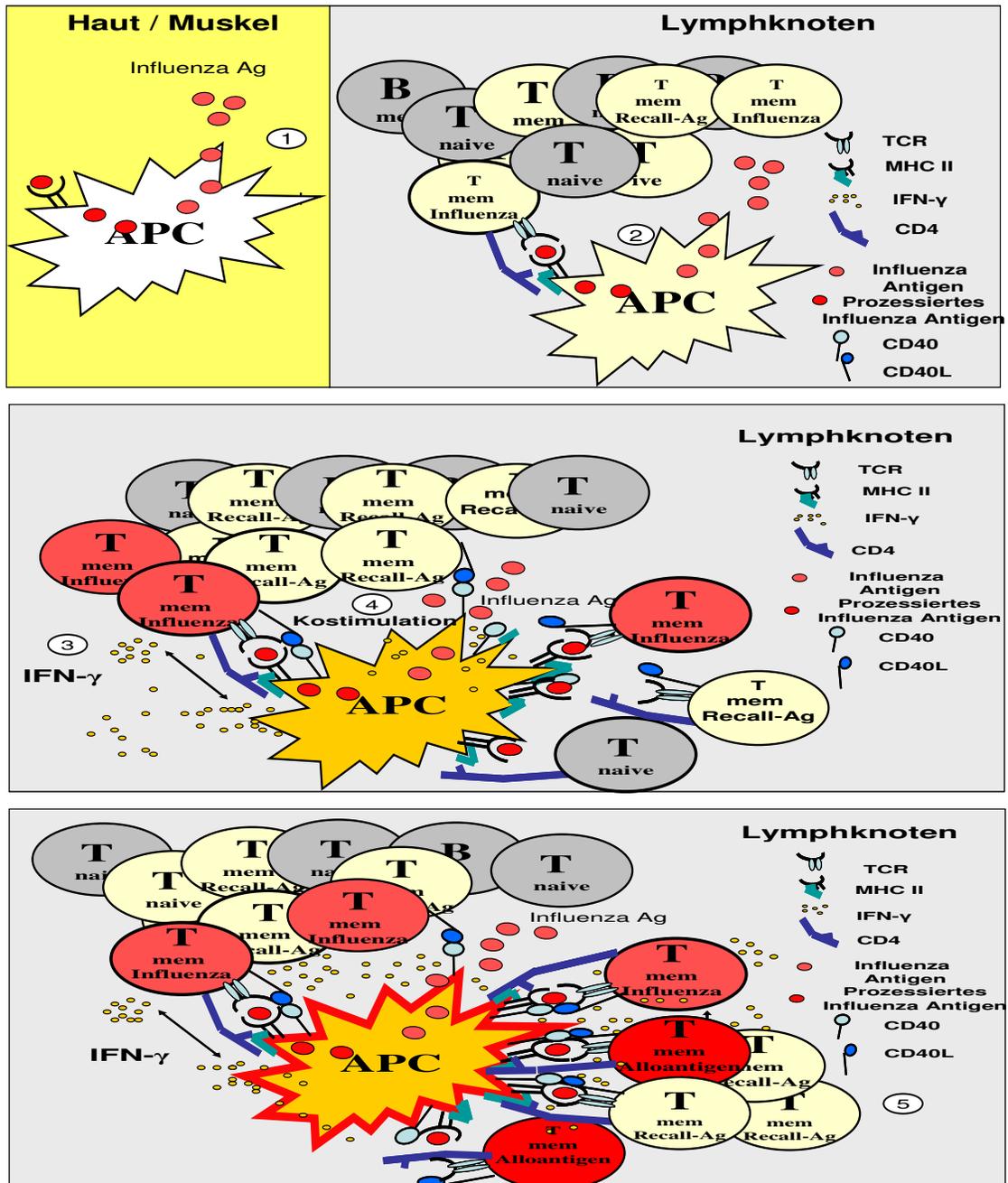


Abb. 25: Theorie der Bystanderaktivierung. Mit der Influenza-Impfung gelangen Influenza-Antigene durch die Haut/Muskel und treten mit Antigenpräsentierenden Zellen in Kontakt (1). Diese Zellen internalisieren, prozessieren die Antigene und transportieren sie in die nächst drainierenden Lymphknoten (2). In den Lymphknoten präsentieren sie schließlich Peptidstücke durch MHC Moleküle gegenüber in den Lymphknoten rekrutierter T-Lymphozyten. Diese erkennen ihr Antigen. Memory-T-Zellen sind in der Lage innerhalb kurzer Zeit mit einer IFN- γ -Antwort zu reagieren und induzieren die Hochregulierung von MHC und Kostimulatorischen Molekülen auf dem APC. Im Zuge dieser spezifischen Aktivierung können durch (3) IFN- γ Sekretion und (4) Kostimulation andere präexistente Gedächtniszellen anderer Spezifitäten „konkomittierend“ aktiviert werden (5). Somit kommt es zu einer so genannten Bystander-Aktivierung. Theoretisch kann es hierbei auch zu einer Aktivierung des Immunsystems gegen das Transplantat kommen.

In der Situation der Transplantationspatienten stellt sich die Frage, ob gängige immunsuppressive Therapien auch die Memory-T-Zellantwort unterdrücken bzw. hemmen können. In den letzten Jahren fanden sich immer mehr Hinweise darauf, dass die immunsuppressiven Regime die Immunantwort auf Gedächtniszellebene zumindest nicht gänzlich unterdrücken (Bingaman und Faber, 2004, Roddick et al., 2005, Hricik et al. 2003). Unsere Ergebnisse bestätigen diese Annahme. Die interessante Beobachtung, dass die Patienten höhere basale Recall-Antigen spezifische T-Zellfrequenzen im Vergleich zu den Kontrollprobanden aufwiesen (Abb.21), könnte womöglich daran liegen, dass die Patienten im Durchschnitt ein höheres Lebensalter aufwiesen und somit theoretisch im Laufe des Lebens einer größeren Exposition gegenüber verschiedenen genannten Pathogenen ausgesetzt waren. Allerdings kam es wiederum nur bei den Kontrollprobanden zu einem signifikanten Anstieg in der Bystander Antwort. Womöglich scheinen einige Patienten tatsächlich eine Bystanderaktivierung zu entwickeln und die Immunsuppression, zumindest auf Memory-Zell-Ebene, zu überwinden. Welche Mechanismen hinter dieser Beobachtung stehen, sind gegenwärtig nicht ausreichend geklärt. Zusammenfassend deuten unsere Daten darauf hin, dass es bei Transplantationspatienten im Rahmen einer spezifischen Immunantwort zu einer Bystanderaktivierung kommen kann.

4.4. Gibt es Konsequenzen für das Transplantat ?

Die in unserer Studie beobachtete Induktion der mRNA-Expression von verschiedenen Kandidatenmarkern, insbesondere CD3 und Granulysin, deutet auf eine Aktivierung des Transplantats nach der Influenza-Impfung hin (Abb.23). Während CD3 eine Infiltration des Transplantats durch Einwanderung von T-Zellen anzeigt, spiegelt die Induktion von Granulysin eine zytotoxische Aktivität wider. Zeitgleich zu den Beobachtungen im Urin konnten wir, wie oben beschrieben, in einen Großteil der Patienten eine Bystanderaktivierung der T-Zellantwort gegen verschiedene Recallantigene nachweisen. Des Weiteren fanden wir in vielen Fällen anhand der monozytären HLA-DR Expression eine Steigerung der Präsentationsfähigkeit des Immunsystems (Abb.22). Somit liegt die Annahme nahe, dass die Influenza-Impfung eine systemische Immunaktivierung induziert, die in manchen Individuen zu einer Reaktion im Transplantat führen kann. Zumindest auf transkriptioneller Ebene konnten wir dies in einem großen Teil der Patienten beobachten.

Allerdings gilt es zu erwähnen, dass die Beobachtungen nicht vorhersagbar waren und in den meisten Fällen nicht mit einem Anstieg der Serum-Kreatinin-Konzentrationen korrelierten. Die gesteigerte mRNA-Expression von Aktivierungsmarkern ist in der Vergangenheit in zahlreichen Arbeiten beobachtet worden. (Li et al., 2001, Tatapudi et al., 2004, Kotsch et al., 2004). In einigen Arbeiten konnte insbesondere dem Anstieg der Granulysin Expression ein prädiktiver Wert für Abstoßungsepisoden zugesprochen werden. In einer anderen Arbeit konnte eine gesteigerte IP-10 mRNA Expression eine ablaufende Rejektion anzeigen und zwar Tage bevor es zu einer Funktionsminderung kam und eine Biopsie indiziert war (Matz et al., 2006). Allerdings wurde die prädiktive und diagnostische Wertigkeit der mRNA Expressionsmessungen aus Urinsedimenten in einigen Arbeiten in Frage gestellt. So fanden Yannaraki et al. unter nierentransplantierten Patienten in Rejektionsepisoden zwar mRNA-Expressionsanstiege, jedoch konnten sie dieses auch in anderen klinischen Situationen wie Harnwegsinfektionen, CMV Infektionen und einer verzögerten Funktionsaufnahme des Organs nachweisen (Yannaraki et al., 2006). Andere konnten jedoch den Wert dieser Methode bestätigen (Galante et al., 2006). In einer Studie von Dadhania et al. konnte man eine klare Differenzierung zwischen Infektion und Rejektionen erkennen und den diagnostischen Wert dieser Methode bekräftigen (Dadhania et al., 2003). In unserer Studie sollte, anhand dieser Methode, immunologische Aktivierung im Transplantat erkannt werden. Unsere Ergebnisse zeigen, dass durch die semiquantitative mRNA-Expression aus Urinproben Veränderungen des Immunsystems gemessen werden können. Interessanterweise kam es bei manchen Patienten zu einer milden Einschränkung der Organfunktion, welche sich in einer Erhöhung der Serum-Kreatinin-Konzentration wider spiegelte (Abb.24). Diese war in den meisten Fällen vorübergehend und die Serum-Kreatinin-Konzentrationen kehrten noch in der Studienphase wieder auf das Ausgangsniveau zurück. Bei einem der eingeschlossenen Patienten (Patient 1) kam es im Verlauf jedoch sogar zu einem Anstieg um mehr als 20% nach der Impfung gegenüber dem Mittelwert der ermittelten Serum-Kreatinin-Werte der vorhergehenden drei Monate. Dieser Patient fiel im Allgemeinen durch eine sehr außergewöhnliche Immunantwort auf. Zwar reagierte er mit einer guten humoralen Antwort gegen Influenza A während gegen Influenza B keine humorale Antwort erzielt werden konnte. Aus den Vollblutüberständen konnte an Tag 0 kein IFN- γ gemessen werden. Jedoch fanden sich im gleichen Ansatz eine sehr hohe TNF- α und IL-10 Konzentration. Des Weiteren zeigte der Patient einen deutlichen monozytären HLA-DR-Anstieg und erhöhte Influenza- und Recall-Antigen-spezifische T-Zellfrequenzen.

Auch im Urin konnte eine Induktion Granulysin-mRNA nachgewiesen werden. Die Gründe für diese Immunantwort bleiben unklar. Es gilt zu erwähnen, dass keiner der in dieser Studie eingeschlossenen Patienten weder in der Studienphase noch bis zu 6 Monaten danach, Rejektionsepisoden entwickelten. Allerdings ist von dem genannten Patienten bekannt, dass er seit der Transplantation bereits drei Rejektionsepisoden erlitt. Zusammenfassend deuten die, in dieser Studie erhobenen Befunde darauf hin, dass die Influenza-Impfung bei nierentransplantierten Patienten neben der spezifischen zellulären- oder humoralen Immunantwort auch eine systemische Immunaktivierung auslösen kann, die in manchen Fällen zu Transkriptionsanstiegen von Aktivitätsmarkern münden und in wenigen Fällen zu einem Anstieg der Serum-Kreatinin-Konzentration führen kann. Dabei scheinen manche Patienten besonders anfällig für diese Art von Reaktion zu sein.

4.5. Gibt es Alternativen zur Impfung?

Neben der immunologischen Prophylaxe sind seit einigen Jahren Medikamente zur Prophylaxe und Therapie von Influenza-Infektionen zugelassen. Klinisch hat die medikamentöse Therapie den Effekt, den Krankheitsverlauf zu lindern, Sekundärkomplikationen zu verringern und die Krankheitsdauer zu verkürzen (Hayden et al., 1997, Nicholson et al., 2000). Das am meisten verwendete Medikament, Oseltamivir, welches als einziges sowohl zur Prophylaxe als auch zur Therapie zugelassen ist, lässt allerdings an Praktikabilität zu wünschen übrig. In einer Studie konnte gezeigt werden, dass die Effektivität des Medikaments abhängig vom Zeitpunkt der Initiation der Therapie ist. Eine deutliche Verkürzung der Krankheit konnte gezeigt werden, wenn die Therapie innerhalb von 12 Stunden nach auftreten der Influenza-like-Symptome eingeleitet wurde (Aoki et al., 2003). Im klinischen Alltag nur bedingt durchführbar erscheint. Im Jahr 2004 kam das amerikanische Advisory Committee on Immunization Practices (ACIP) zu dem Schluss, dass der Nutzen der antiviralen Therapie nur in gesunden Erwachsenen, bei einer Therapieeinleitung innerhalb von 2 Tagen nach einsetzen der spezifischen Symptome eingeleitet wurde, gezeigt werden konnte (Harper et al., 2004, ACIP). Generell ist die Studienlage bezüglich der Wirksamkeit und Sicherheit dieser antiviralen Therapie nicht gut untersucht. Der Großteil der Datenlage bezieht sich auf gesunde Probanden. Risikogruppen wie z.B. Transplantationspatienten wurden bisher nur unzureichend untersucht. Die wenigen veröffentlichten Studien, die sich mit Risikogruppen befassten, bezogen sich vornehmlich auf Patienten nach einer Kochenmarktransplantation (Medeiros et al., 2007, Vu et al. 2007, Nichols et al., 2004).

Ein anderes, gravierendes Problem liegt darin, dass es bei zu konsequenter und großzügiger Anwendung von diesen Medikamenten gerade im Falle des Influenza-Virus, über einen kurzen oder langen Zeitraum, zur Entstehung von resistenten Mutanten führen kann. Leider hat sich diese Befürchtung bereits bewahrheitet und entwickelt sich in rasanter Geschwindigkeit. Im letzten Jahrzehnt (1994/95 – 2004/05) kam es zu einem signifikanten Anstieg von resistenten Influenza A Stämmen gegen Amantadane (Bright et al., 2005). Diese tritt in vielen Fällen bereits 2 bis 3 Tage nach Beginn der Einnahme auf (Belshe et al., 1988). In einem erst kürzlich erschienenen Report des Center for Disease Control and Prevention (CDC) fanden die Autoren 193 (92%) resistente Stämme gegen Rimantadin von 209 Influenza A-Isolaten (H3N1). Des Weiteren fand sich eine Resistenz bei 2 von 8 Influenza A (H1N1) Stämmen (Smith et al., 2006, ACIP). Folglich wurde Rimantadine aus den Empfehlungen des CDC für Influenza-Infektion in den USA genommen. Auch bei Oseltamivir und Zanamivir werden zunehmend verminderte Empfindlichkeit bzw. Resistenzen beobachtet. In der neuesten Ausgabe des Journal of the American Medical Association konnten Hatakeyama et al. in einer Studie eine zunehmende Minderung der Empfindlichkeit auch bei Influenza B Viren feststellen (Hatakeyama et al., 2007). Die Entstehung von Resistenzen gegen antivirale Medikamente bei Influenza-Infektionen ist gerade deshalb von großem Interesse, da sie die einzigen zurzeit verfügbaren Medikamente bei Influenza-Infektionen sind. Besonders im Hinblick auf das neue aufgetretene und aus den Medien bekannte Influenza A (H5N1) Virus, ist dies ein wichtiger medizinischer Aspekt: Aufgrund der hohen Virulenz dieser Reassortment-Variante befürchten viele Experten eine schwere Pandemie mit verheerenden Folgen. Im Jahr 2005 sind bereits in einem Casereport von De Jonge et al. in 2 Fällen über Resistenzen gegenüber Oseltamivir berichtet worden. Beide Patienten starben nach wenigen Tagen. Per Antikörpertest war eine H5N1 Infektion nachgewiesen worden. (De Jonge et al., 2005). Somit ist die medikamentöse Grippetherapie keine echte Alternative zur aktiven Immunisierung. Sie stellt allenfalls in manchen Situationen eine günstige supportive Maßnahme zur Impfung, z.B. bei Ausbrüchen in Kliniken, Pflegeheimen oder anderen Langzeiteinrichtungen, dar. Das Advisory Committee on Immunization Practices (ACIP) empfiehlt, die medikamentöse antivirale Prophylaxe im Höhepunkt einer Grippe-Welle bei folgenden Risikogruppen anzuwenden (Harper et al., 2004):

- Personen, die einer Risikogruppe angehören und nach dem Beginn einer Influenza-Welle geimpft wurden. Es dauert bis zu 2 Wochen bis eine hinreichende Immunität erzielt werden kann.
- Personen die mit Risikopersonen in engem Kontakt stehen (z.B. Mitarbeiter des Gesundheitswesens)
- Personen die eine unter Immunkomprimittierung leiden und bei denen folglich ein vermindertes Ansprechen auf die Impfung erwartet wird, z.B. HIV und Transplantationspatienten.
- Anderen, zu Risikogruppen gehörigen Personen, die aus sonstigen Gründen (z.B. Allergien gegen Hühnereiweiß) sich einer aktiven Immunisierung nicht unterziehen können.

Zusammenfassend kann die Chemoprophylaxe mit den zurzeit erhältlichen Medikamenten eine konsequente regelmäßige Impfung nicht ersetzen. Sowohl bei Transplantationspatienten wie auch bei Kontrollprobanden konnten in vielen Fällen eine humorale und zelluläre Immunantwort gemessen werden, welches auf einen Impfschutz hindeutet.

4.6. Einschränkungen und Ausblicke

Die durchgeführte Studie wurde primär unter der Zielstellung konzipiert, um die Auswirkungen der Influenza-Impfung auf die spezifische und unspezifische Immunantwort von nierentransplantierten Patienten und gesunden Kontrollprobanden zu explorieren. Aus diesem Grund, wurde zunächst eine kleine Anzahl von Patienten und Probanden eingeschlossen. Für zukünftige, fokussiertere Studien ist es sicherlich sinnvoll, größere Patienten- und Probandenkollektive zu untersuchen, um die Aussagefähigkeit der Beobachtungen zu steigern.

Im Hinblick auf die Ergebnisse dieser Arbeit wäre es interessant in zukünftigen Studien zu untersuchen, in wiefern sich diese oder auch andere Impfungen (wie z.B. gegen Pneumokokken etc.) auf die Frequenzen alloreaktiver oder autoreaktiver T-Zellen auswirken. Interessant erscheint auch die Untersuchung der Wirkung von Impfungen auf die humorale, spezifische und unspezifische Antwort, insbesondere bezüglich Auto und Alloantikörper. Von großem Interesse wären ferner die Wirkungen der Impfung auf Frequenz regulatorischer T-Zellen zu untersuchen. Trotz diesen Einschränkungen konnten wir mit dieser Studie, neue und wichtige Aspekte der Impfung, insbesondere unter Transplantationspatienten, aufzeigen. Unserer Meinung nach sollten nierentransplantierte Patienten, die nach einer Influenza-Impfung mit einem Serum-Kreatinin-Anstieg von mehr als 10% reagieren, umgehend einem Immunmonitoring ähnlich wie den unserem zugeführt werden, um eventuelle Immunaktivierungen zu bestimmen und gegebenenfalls eine Therapie (z.B. in Form von Steroid-Boli) einzuleiten. Sinnvoll erscheint die Wahl von Parametern, die zum einen den generellen Immunaktivierungsgrad und zum anderen auch die spezifische, gegen das Allotransplantat gerichtete, Facette des Immunsystems erfasst. Auch wenn es gegenwärtig zu früh erscheint, um konkrete Aussagen zu treffen, gehen wir davon aus, dass in Zukunft die Kombination aus z.B. monozytärer HLA-DR Expression, zusammen mit Frequenzen allospezifischer T-Zellen und Serum-Kreatinin-Konzentration als Parameter eines solchen Immunmonitorings eingesetzt werden könnten.

5. ZUSAMMENFASSUNG

Die Influenza Infektion bei transplantierten wie auch anderen immunkompromittierten Patienten geht mit hoher Morbidität und Mortalität einher. Die alljährliche Influenza-Impfung stellt gegenwärtig die effektivste Prophylaxe in der Medizin gegen diese Viren dar. Dennoch sind einige Fälle von Nebenwirkungen von mehr oder mindergroßer Tragweite bis hin zu einer Assoziation mit Autoimmunerkrankungen in der Literatur beschrieben worden. Theoretisch kann die Impfung eine sog. Bystander-Aktivierung, eine unspezifische Aktivierung nach einem spezifischen Stimulus hervorrufen, die in vielen Fällen sogar gewünscht ist. Im Falle der Patienten mit einem Allo-Transplantat kann diese erweiterte Immunantwort jedoch zu einer systemischen Aktivierung führen, die unter Umständen im Sinne eine Alloreaktivität zu einer Funktionsverschlechterung oder gar zu einer Abstoßung des Organs führen kann. In unserer Studie wurden die Effekte der Influenza-Impfung bei 10 stabilen Nierentransplantierten und 10 gesunden Probanden auf spezifische und auf systemische Immunantworten hin untersucht. Erwartungsgemäß entwickelten nur 5 von 10 Patienten, jedoch alle (10/10) Probanden einen humoralen Schutz nach der Impfung. Jedoch wurden bei beiden Populationen signifikante Anstiege der Influenza-spezifischen IFN- γ Sekretion, der Memory-T-Zell Frequenz als auch einer gesteigerten Recall-Antigen Antwort gefunden. Interessanterweise fanden wir bei den Patienten einen signifikanten Anstieg der HLA-DR Expression nach Impfung, was auf eine systemische Aktivierung hindeutet. Ferner wurde bei 8/10 ein mehr als 2 facher Anstieg der CTL-mRNA-Expression gefunden. Korrespondierend wurde ein vorübergehender Anstieg der Serum Kreatinin-Werten bei 7 von 10 Patienten beobachtet. Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die Impfantwort bei transplantierten Patienten, im Vergleich zu gesunden Probanden, schwächer ausfällt. Dennoch entwickelten fast alle Patienten eine spezifische T Zellantwort, welches auf einen zellulären Schutz hindeutet. Des Weiteren wurde bei einem großen Anteil der Transplantierten eine Bystander Aktivierung gegen Recall Antigen als auch ein Anstieg der mRNA Expression von immunrelevanten Genen im Transplantat gemessen. Bemerkenswerterweise mündete diese Immunaktivierung bei einigen Patienten zu einer vorübergehenden Funktionsverschlechterung des Organs, welche jedoch nur bei einem Patienten deutlich ausfiel und über einen längeren Zeitraum bestand. Unsere Daten deuten darauf hin, die Influenza Impfung in manchen Individuen eine systemische Bystanderaktivierung induzieren kann, welche sich in erhöhten Serum-Kreatinin-

Konzentrationen widerspiegeln. Wenngleich die humorale und zelluläre Immunantwort auf die Impfung geringer ausgeprägt ist, als bei gesunden Kontrollprobanden, stellt die Influenza-Impfung ein gutes Werkzeug der modernen Medizin gegen Influenza Infektionen dar. Die medikamentöse Therapie stellt nur in einigen Situationen eine unterstützende Komponente in der Therapie und Prävention dar. Unserer Meinung nach, sollten nierentransplantierte Patienten, die nach einer Influenza-Impfung mit einem Anstieg der Serum-Kreatinin-Konzentration von mehr als 10% im Serumkreatinin reagieren, einer strengeren Überwachung zugeführt werden- immunologisch wie auch klinisch.

Literatur

Bücher, Dissertationen, Habilitationen:

Kayser FH, Bienz KA, Eckert J, Zinkernagel RM. Medizinische Mikrobiologie. 10. Auflage. Thieme 2001.

Kamradt T. Aktivierung und Differenzierung von T-Lymphozyten durch Infektion und Autoimmunität. Habilitationsschrift Humboldt Universität zu Berlin 29.05.2001.

Potter CW. Influenza. In: Zuckerman AJ, Pattison JR, Banatvala JE, editors. Principles and Practice of Clinical Virology. 5th ed. Chichester, England: John Wiley & Sons, 2005; 271-297.

Strohmeier JC. Gestörte Homöostase zwischen Inflammation und Antiinflammation bei Risikopatienten nach Herzchirurgie: Standardisiertes Immunmonitoring zur Prädiktion infektiöser Komplikationen. Dissertationsschrift Humboldt Universität zu Berlin 07.02.2006.

Peer Reviewed Fachzeitschriften:

Abu Shakra M, Press J, Sukenik S et al. Influenza virus vaccination of patients with SLE: effects on generation of auto antibodies. Clin Rheumatol 2002; 21: 369 – 372.

Abbas, AK, Murphy, KM und Sher, A. Functional diversity of helper T lymphocytes. Nature 1996; 383, 787 - 793.

Adams AB, Pearson TC, Larsen CP: Heterologous immunity. An overlooked barrier to tolerance. Immunol Rev 2003; 196: 147 – 160.

Aichele P, Bachmann MF, Hengartner H and Zinkernagel RM. Immunopathology or organ-specific autoimmunity as a consequence of virus infection. Immunol Rev 1996; 152: 21-45.

Aoki FY, Macleod MD, Paggiaro P et al. Early administration of oral Oseltamivir increases the benefits of influenza treatment. *J Antimicrob Chemother* 2003; 51: 123.

Aschan J, Ringden O, Ljungman P et al. Influenza B in transplant patients. *Scand J Infect Dis* 1989; 21: 349-350.

Baid S, Tolkoff-Rubin N, Saidman S et al. Acute humoral rejection in hepatitis C infected renal transplant recipient receiving antiviral therapy. *Am J Transplant* 2003; 3: 74-78.

Barnett LA, Fujinami RS: Molecular mimicry. A mechanism for autoimmune injury. *FASEB J* 1992; 6: 840-844.

Belshe R, Smith M, Hall C et al. Genetic basis of resistance to rimantadine emerging during treatment of Influenza virus infection. *J Virol* 1988; 62: 1508.

Belshe RB. The origins of pandemic influenza-lessons from the 1918 virus. *N Engl J Med* 2005; 353: 2209-11.

Bingaman AW, Faber D. Memory T Cells in Transplantation: Generation, Function and Potential Role in Rejection. *Am J Transplant* 2004; 4: 846-852.

Blumberg E, Fitzpatrick J, Stutman PC et al. Safety of Influenza Vaccine in Heart Transplant Recipients. *J Heart Lung Transplant* 1998; 17: 1075-1080.

Blumberg, E, Albano, T. Pruett, R. et al. The immunogenicity of Influenza virus vaccine in solid-organ transplant recipients. *Clin Infect Dis* 1996 22: 295-302.

Briggs JD, Timbury MC, Paton AM, Bell PR. Viral infection and renal transplant rejection. *Br Med J* 1972; 4 520-522.

Bright RA, Madina MJ, Xu X et al. Incidence of adamantane resistance among Influenza A (H3N2) viruses isolated worldwide from 1994 to 2005: a cause of concern. *Lancet* 2005; 366: 1175.

Burbach, G, Bienzle, U, Stark K et al. . Influenza vaccination in liver transplant recipients. *Transplantation* 1999 67: 753-755.

Carty CL, Heagerty P, Nakayama K et al. Inflammatory response after influenza vaccination in men with and without carotid artery disease. *Arterioscl Thromb Vasc Biol* 2006; 26: 2738-2744.

Cavdar C, Sayan M, Sifil A et al. . The comparison of antibody response to influenza vaccination in continuous ambulatory peritoneal dialysis, hemodialysis and renal transplantation patients. *Scand J Urol Nephrol*. 2003;37(1):71- 76.

Chan TM, Tse KC, Tang CS et al. Prospective study on Lamivudine-resistant hepatitis B in renal allograft recipients. *Am J Transpl* 2004; 4: 1103-1109.

Chung RT, Feng S, Delmonico FL. Approach to management of allograft recipients following the detection of hepatitis B virus in the prospective organ donor. *Am J Transpl* 2001; 1: 185-191.

Cox RJ, Brokstad KA und Ogra P. Influenza Virus: Immunity and Vaccination Strategies. Comparison of the Immune Response to Inactivated and Live, Attenuated Influenza Vaccines. *Scand J Immunol* 2003; 59: 1-15.

Dadhania D, Muthukumar T, Ding R et al. Molecular signatures of urinary cells distinguish acute rejection of renal allografts from urinary tract infection. *Transplantation*. 2003 May 27;75 (10): 1752- 1754.

De Jong MD, Tran TT, Truong HK et al. Oseltamivir resistance during treatment of influenza A (H5N1) infection. *N Engl J Med*. 2005 Dec 22; 353 (25): 2667-2672.

Dengler TJ, Strnad N, Bühring I et al. Differential immune response to influenza and pneumococcal vaccination in immunosuppressed patients after heart transplantation. *Transplantation*. 1998 Nov 27; 66 (10): 1340- 1347.

Del Prete G and Romagnani S. The role of Th1 and Th2 T Cells in human infectious disease. *Trends Microbiol* 1994, 2: 4-6.

Dickson RC, Everhart JE, Lake JR et al. Transmission of hepatitis B by transplantation of livers from donors positive for antibody to hepatitis core antigen. The National Institutes of Diabetes and Digestive and Kidney Diseases Liver Transplantation Database. *Gastroenterology* 1997; 11: 1668-1674.

Di Genova G, Roddick J, McNiholl F et al. Vaccination of human subjects expands both specific and bystander memory T cells but antibody production remains vaccine specific. *Blood* 2006; 107: 2806-2813.

Döcke WD, Höflich C, Davis et al. Monitoring temporary immunodepression by flow cytometric measurement of monocytic HLA-DR expression: a multicenter standardized study. *Clin Chem.* 2005 Dec;51(12): 2341- 2347.

Duchini A, Hendry RM, Redfield DC, Pockros PJ. Influenza infection in patients before and after liver transplantation. *Liver Transpl* 2000; 6: 531-542.

Duchini A, Goss J, Karpen S and Pockros PJ. Vaccinations for Adult Solid-Organ Transplant Recipients: Current Recommendations and Protocols. *Clin Microbiol Rev* 2003; 16: 357-364.

Duchini A, Hendry RM, Nyberg LM et al.. Immune response to influenza vaccine in adult liver transplant recipients. *Liver Transpl.* 2001 Apr; 7 (4): 311- 313.

Ehl S, Homboch J, Aichele G et al. Bystander Activation of Cytotoxic T Cells: Studies on the Mechanism and Evaluation of In Vivo Significance in a Transgenic Mouse Model. *J. Exp. Med., Apr* 1997; 185: 1241-1252.

Famularo G, Nicotra GC, Minisola G et al. Leukocytoclastic vasculitis after influenza vaccination. *J Clin Rheumatol* 2006; 12: 48-50.

Feng S, Buell JF, Chari RS, DiMaio JM, hanto DW. Tumors and Transplantation: the 2003 third annual ASTS state-of-the-art winter symposium.

Am J Transplant 2003; 3(12): 1481-1487.

Fishman JA, Rubin RH. Medical Progress: Infection in organ transplant recipients. N Engl J Med. 1998 Jun 11;338 (24): 1741-1751.

Fissell RB, Bragg-Gresham JL, Woods JD et al. Patterns of hepatitis C prevalence and seroconversion in hemodialysis units from three continents. The DOPPS. Kidney Int 2004; 65: 2335-2342.

Fujinami RS, von Herrath MG, Christen U and Whitton L. Molecular Mimicry, Bystander Activation, or Viral Persistence: Infections and Autoimmune Disease. Clin Microbiol Rev 2006. 80-94.

Ford L, Prout C, Gaffney D et al. Whose TPMT activity is it anyway? Ann Clin Biochem 2004. 41(Pt 6): 498-500.

Gabriel R, Selwyn S, Brown D, et al. Virus infections and acute renal transplant rejection. Nephron 1976; 16: 282-286.

Galante NZ, Camara NO, Kallas EG et al. Noninvasive immune monitoring assessed by flow cytometry and real time RT-PCR in urine of renal transplantation recipients. Transpl Immunol. 2006 Aug;16 (2): 73-80.

Hanson K and Alexander B. Strategies for the prevention of infection after solid organ transplantation. Expert Rev. Anti Infect. Ther. 2006; 4 (5): 837-852.

Harper SA, Fukuda K, Uyeki TM et al. Prevention and control of influenza: recommendations of the Advisory Committee on Immunization Practices (ACIP).

MMWR Recomm Rep 2004; 53:1.

Hatakeyama S, Sugaya N, Ito M et al. Emergence of influenza B viruses with reduced sensitivity to neuraminidase inhibitors. *JAMA*. 2007 Apr 4;297(13): 1435-1442.

Hayden FG, Osterhaus ADME, Treanor JJ et al. Efficacy and safety of neuraminidase inhibitor zanamivir in the treatment of influenza virus infections. *N Engl J Med* 1997; 337: 874.

Hayney MS, Welter DL, Francois M et al. Influenza vaccine antibody responses in lung transplant recipients. *Prog Transplant*. 2004 Dec; 14 (4): 346-351.

Heeger PS, Greenspan NS, Kuhlenschmidt S et al. Pretransplant frequency of donor-specific, IFN-gamma producing lymphocytes is a manifestation of immunologic memory and correlates with the risk of post transplant rejection episodes. *J Immunol* 1999; 163: 2267-2275.

Herroelen L, de Kayser J und Ebingeu G. Central nervous system demyelisation after immunization with recombinant Hepatitis B vaccine. *Lancet* 1991; 338: 1174-1175.

Holvast B, Huckriede A, Kallenberg C, Bijl M. Influenza vaccination in systemic lupus erythematosus: Safe and protective? *Autoimmun Rev*. 2007 Apr; 6 (5): 300 – 305.

Hosenpud J, Wagner CR. Enhanced lymphoproliferative responses to donor-specific aortic endothelial cells following influenza vaccination. *Transplant Immunol* 1993; 1: 83-85.

Hricik DE, Rodriguez V, Riley J et al. Enzyme linked immunosorbent spot (ELISPOT) assay for interferon-gamma independently predicts renal function in kidney transplant recipients. *Am J Transplant*. 2003 Jul; 3 (7):878 – 884.

Joon-Shik M and Souayah N. Guillain-Barré Syndrome Triggered by Influenza Vaccination in a Recipient of Liver Transplant on FK 506. *Liver Transplantation* 2006, 12: 1537-1539.

- Jiang S, Lechler RI.** CD4+CD25+ regulatory T-cell therapy for allergy, autoimmune disease and transplant rejection. *Inflamm Allergy Drug Targets.* 2006 Dec; 5 (4):239 - 242.
- Juurlink DN, Stukel TA, Kwong J et al.** Guillain-Barré syndrome after influenza vaccination in adults: a population-based study. *Arch Intern Med* 2006; 166 (20): 2217-2221.
- Keane WR, Heldermaun JH, Luby J, et al.** Epidemic renal transplant rejection associated with Influenza A Victoria. *Kidney Int* 1978; 14: 793.
- Kern WV, Wagner D, Hirsch H.-H.** Infektionen nach Organtransplantation. *Der Internist* 2005; 46: 630-642.
- Kotsch K, Mashreghi MF, Bold G et al.** Enhanced granulysin mRNA-Expression in urinary sediment in early and delayed acute renal allograft rejection. *Transplantation* 2004; 27; 77 (12): 1866-1875.
- Lamb RA, Krug RM.** Orthomyxoviridae: The viruses and their Replication. In: *Fields Virology* fourth edition, Lippincott, Philadelphia 2001: 1487-1531.
- Li B, Hartono C, Ding R et al.** Noninvasive Diagnosis Of Renal-Allograft rejection by measurement of messenger RNA for perforin and Granzyme B in urine. *N Engl J Med.* 2001 Mar 29; 344 (13): 947-954.
- Lindemann M, Witzke O, Lütke P et al.** ELISpot assay as a sensitive tool to detect cellular immunity following influenza vaccination in kidney transplant recipients. *Clin Immunol* 2006; 120 (3): 342-348.
- Livak KJ und Schmittgen TD.** Analysis of relative gene expression data using realtime quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta C(T)}$ Method. *Methods* 2001; 25 (4): 402- 408.
- Ljungman P, Anderson J, Achan J et al.** Influenza A in immunocompromised patients. *Clin Infect Dis* 1993; 17: 244-247.

Loinaz C, de Juares JR, Gonzalez EM, et al. Hepatitis B vaccination results in 140 liver transplant patients. *Hepatogastroenterol* 1997; 44: 235-238.

Lopez C, Simmons RL, Mauer SM, et al. Association of renal allograft rejection and virus infections. *Am J Med* 1974; 56: 280-829.

Matz M, Beyer J, Wunsch D et al. Early post-transplant urinary IP-10 expression after kidney transplantation is predictive of short- and long-term graft function. *Kidney International* 2006; 69, 1683–1690.

Mahmoud IM, Elhabashi AF, Elsayy E et al. The impact of hepatitis C viremia in renal graft and patient survival: A 9-year prospective study. *Am J Kidney Dis*, 2004; 43:131-139.

Marshall E. A shadow falls on Hepatitis B vaccination effort. *Science* 1998; 281: 630- 631.

McLaughlin K, Wu C, Fick G et al. Cytomegalovirus seromismatching increases the risk of acute renal allograft rejection. *Transplantation* 2002; 6: 813- 816.

Medeiros R, Rameix-Welti MA, Lorin V et al. Failure of zanamivir therapy for pneumonia in a bone-marrow transplant recipient infected by a zanamivir-sensitive influenza A (H1N1) virus. *Antivir Ther* 2007;12 (4): 571 - 576.

Monto AS, Gravenstein S, Elliott M et al. Clinical signs and symptoms predicting influenza infection. *Arch Intern Med* 2000; 160: 3243-3247.

Mosmann, T.R., Cherwinski, H., Bond, et al. Two types of murine helper T-cell clone. I. Definition according to profiles of lymphokine activities and secreted proteins. *J. Immunol* 1986. 136: 2348–2357.

Musana KA, Yale SH, Mazza JJ, Reed KD. Practical considerations to influenza vaccination. *Clin Med Res* 2004; 2: 256-259.

Nichols WG, Guthrie KA, Corey L, Boeckh M. Influenza infections after hematopoietic stem cell transplantation: risk factors, mortality, and the effect of antiviral therapy. *Clin Infect Dis*. 2004 Nov 1; 39 (9): 1300- 1306.

Nicholson KG, Wood JM, Zambon M. Influenza, *Lancet* 2003; 362: 1733-1745.

Nicholson KG, Aoki FY, Osterhaus ADME et al. Efficacy and safety of Oseltamivir in treatment of acute influenza: a randomised controlled trial. *Lancet* 2000; 335: 1845.

Nickeleit V, Singh HK, Mihatsch MJ. Polyomavirus nephropathy: morphology, pathophysiology and clinical management. *Curr Opin Nephrol Hypertens* 2003; 12: 599-605.

Opelz G, Henderson R. Incidence of non-Hodgkin lymphoma in kidney and heart transplant recipients. *Lancet* 1993; 342: 1512-1516.

Paya CV, Fungi JJ, Moleskin et al. Epstein-Barr virus-induced post transplant lymphoproliferative disorders. ASTS/ASTP EBV-PTLD Task Force and The Mayo Clinic Organized International Consensus Development Meeting. *Transplantation* 1999; 68: 1517-1525.

Payen D, Faivre V, Lukaszewicz V AC et al. Assessment of immunological status in the critically ill. *Minerva Anesthesiol* 2000; 66: 757.

Pigtail-Noble C, Cowherd R, Andiron G et al. Cytomegalovirus infection. An etiological factor for rejection? *Transplantation* 1993; 55: 851-857.

Riediger C, Berberat PO, Sauer P et al. Prophylaxis and treatment of recurrent viral hepatitis after liver transplantation. *Nephrol Dial Transplant*. 2007 Sep; 22 Suppl 8: 37- 46.

RKI Robert Koch Institut. Empfehlungen der STIKO. *Epidemiologisches Bulletin* Nr. 30/ 2006.

Roddy M, Clemente M, Poggio E et al. Heterogenous Alterations in Human Alloimmunity-Associated with Immunization . *Clin Transpl* 2005; 80 (3): 297-302.

Renders L, Schöcklmann H und Kunzendorf U. Infektionen unter immunsuppressiver Therapie nach Organtransplantation. *Der Internist* 2004; 45: 882-892.

Reinke P, Fietze E, Ode-Hakm S et al. Late-acute renal allograft rejection and symptomless cytomegalovirus infection . *Lancet* 1994; 344(8939-8940): 1737-1738

Rogers PR, Dubey C, Swain SL. Qualitative changes accompany memory T cell generation: faster, more effective responses at lower doses of antigen. *J. Immunol* 2000; 164: 2338–2346.

Rubin RH: The direct and indirect effects of infection in liver transplantation: Pathogenesis, impact and clinical management. *Curr Clin Top Infect Dis*, 2002; 22: pp 125-154.

Rubin RH and Young L. *Clinical Approach to Infection in the Compromised Host.* New York, Kluwer Academic/Plenum Publishers, 2002, 719.

Sanchez-Fructuoso AI, Prats D, Naranjo P et al. Influenza virus immunization effectivity in kidney transplant patients subjected to two different drug triple-drug therapy immunosuppression protocols: mycophenolate mofetil versus azathioprine. *Transplantation* 2000; 69: 436.

Segovia R, Sanchez-Fueyo A, Rimola A et al. Evidence of serious graft damage induced by de novo hepatitis B virus infection after liver transplantation. *Liver Transpl* 2001; 7: 106-112.

Saadoun D, Cacoub P, Mahoux D et al. Postvaccine vasculitis: a report of three cases. *Rev Med Interne* 2001; 22: 172-176.

Sagedal S, Nordal KP, Hartmann A et al. A prospective study of the natural course of cytomegalovirus infection and disease in renal allograft recipients. *Transplantation* 2000; 70: 1166-1174.

Sagedal S, Nordal KP, Hartmann A et al. The impact of cytomegalovirus infection and disease on rejection episodes in renal allograft recipients. *Am J Transplant* 2002; 2: 850-856.

Sarwal M, Chang S, Barry C, et al. Genomic analysis of renal allograft dysfunction using cDNA microarrays. *Transplant Proc* 2001; 33: 297.

Sarwal MM, Jani A, Chang S, et al. Granulysin expression is a marker for acute rejection and steroid resistance in human renal transplantation. *Hum Immunol* 2001; 62: pp 21.

Shoenfeld Y and Aron-Maor A. Vaccination and Autoimmunity-“Vaccinosis”: A Dangerous Liaison? *Journal of Autoimmunity* 2000; 14: pp 1-10

Shu KH, Lan JL, Wu MJ et al. Ultralow-dose alpha-interferon plus ribavirin for the treatment of active hepatitis C in renal transplant recipients. *Transplantation* 2004; 7: 1894- 1896.

Smith KG, Isbel NM, Catton MG et al. Suppression of the humoral immune response by mycophenolate mofetil. *Nephrol Dial Transplant*.1998 Jan; 13 (1): 160- 64.

Smith NM, Breese JS, Shay DK et al. Prevention and Control of Influenza: recommendations of the Advisory Committee on Immunization Practices (ACIP). *MMWR Recomm Rep* 2006 Jul 28;55(RR-10):1-42.

Stark K, Gunther M, Schonfeld C et al. Immunisations in solid-organ transplant recipients. *Lancet* 2002, 359: 957–965.

Szysko E, Brokstad K, Cox RJ et al. Impact of Influenza Vaccine Formulation with a Detailed Analysis of the Cytokine Response. *Scand J Immunol*. 2006 Nov; 64(5): 467-475.

Tanchot C, Lemonnier FA, Perarnau B et al. Differential requirements for survival and proliferation of CD8 naïve or memory T cells. *Science* 1997; 276 (5321): 2057.

Tatapudi RR, Muthukumar T, Dadhania D et al. Noninvasive detection of renal allograft inflammation by measurements of mRNA for IP-10 and CXCR3 in urine. *Kidney Int* 2004; 65: 2390–2397.

Tavadia S, Drummond A, Evans CD et al. Leucocytoclastic Vacuities and influenza vaccination. *Clin Exp Dermatology* 2003; 28: 154-156.

Taubenberger J, Reid AH, Lourens R et al. Characterization of the 1918 Influenza virus polymerase genes, *Nature* 2005; 437: 883- 889.

Taylor AL, Marcus R and Bradley JA. Post-transplant lymphoproliferative disorders (PTLD) after solid organ transplantation. *Crit Rev in Onc and Hem* 2005; 56: 155-167.

Tolkoff-Rubin NE and Rubin RH. *Viral Infections in Organs Transplantation, Transplantation Proceedings* 1998, 30: 2060- 2063.

Tsai MY, Hanson NQ, Straka RJ et al. Effect of influenza vaccine on markers of inflammation and lipid profile. *J Lab Clin Med.* 2005; 145 (6): 323-327.

Tsuchiya N, Satoh S, Tada H et al. Influence of CYP3A5 and MDR1 (ABCB1) polymorphisms on the pharmacokinetics of tacrolimus in renal transplant recipients. *Transplantation* 2004; 78 (8): 1182-1187.

Veiga-Fernandes H, Walter U, Bourgeois C et al. Response of naïve and memory CD8 β T cells to antigen stimulation in vivo. *Nat. Immunol* 2000; 1: 47-53.

Valujskikh A, Heeger PS. A closer look at cytokine secreting T lymphocytes. *Graft* 2000; 3: 250-259.

van der Beek MT, Visser LG, de Maat MP. Yellow fever vaccination as a model to study the response to stimulation of the inflammation system. *Vascul Pharmacol* 2002; 39 (3): 117-121.

Verschuur M, van der Beek MT, Tak HS. Interindividual variation in the response by fibrinogen, C-reactive protein and interleukin-6 to yellow fever vaccination. *Blood Coagul Fibrinolysis* 2004; 15 (5): 399-404.

Versluis DJ, Beyer WL, Masurel N et al. Impairment of the immune response to influenza vaccination in renal transplant recipients by cyclosporine, but not azathioprine. *Transplantation* 1986; 42 (4): 376-379.

Vilchez RA, McCurry K, Dauber J et al. Influenza Virus Infection in Solid Organ Transplant Recipients, *Am J Transplant* 2001; 2: 287-291

Volk HD, Reinke P, Döcke WD. Immunological monitoring of the inflammatory process: Which viables? When to assess? *Eur J Surg Suppl* 1999; 584: 70.

Volk HD und Kern F. Skripte begleitend zur Immunologievorlesung 1. klinisches Semester Humanmedizin. Institut für Medizinische Immunologie, Medizinische Fakultät der Humboldtuniversität zu Berlin 2002.

Von Herrath MG und Harrison LC. Antigen induced regulatory T cells in autoimmunity. *Nat Rev Immunol* 2003; (3): 223-232.

Vu D, Peck AJ, Nichols WG et al. Safety and tolerability of oseltamivir prophylaxis in hematopoietic stem cell transplant recipients: a retrospective case-control study. *Clin Infect Dis.* 2007 Jul 15; 45 (2): 187- 193.

Wai CT, Prabhakaran K, Wee A, Lee YM et al. Adefovir dipivoxil as the rescue therapy in lamivudine-resistant hepatitis B post liver transplant. *Transplant Proc* 2004; 36: 2313-2314.

Welsh RM und Selin LK. No one is naïve: the significance of heterologous immunity.
Nat Rev Immunol 2002; 2: 417- 426.

Wertheim MS, Keel M, Cook SD and Tole TM. Corneal transplant rejection following influenza vaccination. Br J Ophthalmol 2006; 90: 925.

Yang H, Welsh RM. Introduction of alloreactive cytotoxic T cells by acute virus infection of mice. J Immunol. 1986; 136 (4): 1186 -1193.

Yannaraki M, Rebibou JM, Ducloux D et al. Urinary cytotoxic molecular markers for a noninvasive diagnosis in acute renal transplant rejection. Transpl Int 2006; 19 (9): 759-768.

Danksagung

Herrn Prof. Dr. med. Hans-Dieter Volk möchte ich an dieser Stelle für die Übergabe des Themas, seiner immer wieder ermunternden Art, seine kritischen Diskussionen sowie seine Großzügigkeit und die mir gewährte forschersische Freiheit danken.

Frau Prof. Dr. med. Petra Reinke danke ich für die stetige Unterstützung, die interessanten Diskussionen und hilfreichen Anregungen bis zur Fertigstellung dieser Arbeit.

Des Weiteren möchte ich mich bei den Mitarbeitern des Instituts für Medizinische Immunologie und den Mitarbeitern der Nierentransplantationsambulanz des Rudolf-Virchow-Klinikums bedanken. Insbesondere bedanke ich mich bei meinen Betreuern Frau Dr. rer. nat. Katja Kotsch und Herrn Dr. med. Christian Meisel für die kritischen Diskussionen und Unterstützung bei der Auswertung der erhobenen Daten. Frau Christa Liebenthal sowie Frau Kristin Neuhaus danke ich für die exzellente Einarbeitung in die angewandten Methoden sowie für die Messungen Zytokinkonzentrationen aus den Vollblutüberständen. Ferner gilt mein Dank dem Institut für Virologie für die Messungen der Antikörperkonzentrationen.

Allen Doktoranden- und Diplomanden-Kollegen danke ich für die angenehme Zeit im Labor. Meinen Freunden danke ich sehr für die moralische Unterstützung in schwierigen Zeiten.

Nicht zuletzt gilt mein tiefster Dank meinen Eltern, die mir ein Leben frei von Sorgen, ermöglicht und mich zu jeder Zeit bedingungslos und mit voller Hingabe gefördert und unterstützt haben. Ihnen gilt mein ewiger Dank.

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

Veröffentlichungen und Kongressbeiträge

Teile der vorliegenden Arbeit wurden von 2005 und 2006 auf verschiedenen nationalen- wie auch internationalen Kongressen und meetings präsentiert. Der Titel der eingereichten Arbeit lautet: „Influenza Vaccination in Renal Transplant Patients: Benefit or Risk?“

ATC American Transplant Congress 2005 Seattle, WA USA,

Mai 2005

- Posterpreis

14. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Transplantationsmedizin,

Travemünde, Deutschland September 2005

- Posterpreisvortrag

(Eingereichtes Poster unter den besten sechs aller eingereichten Arbeiten)

European Students Conference 2005, Berlin , Oktober 2005

-Posterbeitrag

FASEB Summer Research Conferences 2006

Federation of American Societies for Experimental Biology

Snowmass Village, Colorado USA,

Juni 2006

-Posterpreis

Selbstständigkeitserklärung

Ich, Ali Yahyazadeh, erkläre, dass ich die vorgelegte Dissertationsschrift mit dem Thema: „Die immunologischen Effekte der Influenza-Vakzinierung nach allogener Nierentransplantation.“ 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.

.

Ali Yahyazadeh

Berlin, den 26.März 2008