

Aus der Medizinischen Klinik mit Schwerpunkt Nephrologie, CCM
der Medizinischen Fakultät Charité – Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

Wirkung von Tacrolimus auf die Synthese von TGF- β 1 und die
Expression der TGF- β 1-Rezeptoren T β RI und T β RII in der Me-
sangiumzelle

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

vorgelegt der Medizinischen Fakultät
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Jan Erich Kreutzkamp

aus Freiburg im Breisgau

Datum der Promotion: 22.06.2014

Inhaltsverzeichnis

1	Abstract	6
1.1	Deutsche Version.....	6
1.2	Englische Version	7
2	Einleitung.....	9
2.1	Terminale Niereninsuffizienz.....	9
2.1.1	Definition und Klassifikation	9
2.1.2	Inzidenz, Prävalenz.....	9
2.1.3	Ätiologie und Pathogenese	10
2.1.4	Pathophysiologie.....	11
2.1.5	Therapie.....	11
2.1.5.1	Hämodialyse	12
2.1.5.2	Peritonealdialyse.....	13
2.1.5.3	Nierentransplantation.....	13
2.1.5.4	Vergleich Dialyse/Transplantation.....	14
2.2	Chronische Transplantatnephropathie	15
2.2.1	Definition	15
2.2.2	Ätiologie	16
2.2.3	Pathophysiologie.....	17
2.3	Transforming Growth Factor- β (TGF- β).....	18
2.3.1	TGF- β 1	19
2.3.2	Signalkaskade.....	19
2.3.3	Biologische Funktionen.....	21
2.3.4	Die Rolle von TGF- β bei der Entwicklung einer CAN/CAI	22

2.4	Immunsuppressive Therapie nach Nierentransplantation	23
2.4.1	Übersicht.....	23
2.4.2	Calcineurin-Inhibitoren (CNI).....	24
2.4.2.1	Calcium-Calmodulin-Calcineurin-NFAT-Signalkaskade	25
2.4.2.2	Wirkmechanismus der Calcineurin-Inhibitoren.....	26
2.4.3	Tacrolimus / FK 506.....	27
2.4.4	Die Rolle von Tacrolimus bei der Entwicklung einer CAN/CAI.....	28
3	Herleitung der Aufgabenstellung	29
4	Materialien	31
4.1	Zellen, Materialien und Nährmedien für die Zellkultur.....	31
4.2	Geräte.....	31
4.3	Computerprogramme.....	32
4.4	Glas- und Plastikwaren	32
4.5	Fertigprodukte und Wirkstoffe	32
4.6	Lösungen und Puffer.....	33
4.7	Chemikalien	34
4.8	Primer, Enzyme, Substrate	35
4.9	Antikörper, Antigene, Marker, Markerleitern und Proteine	36
5	Methoden.....	37
5.1	Mesangiumzellkultur	37
5.1.1	Kultivierung und Passagieren der Mesangiumzellen	37
5.1.2	Versuchsbedingungen und Durchführung.....	38
5.2	Kompetitive reverse Transkription-Polymerasekettenreaktion	39
5.2.1	Allgemeines Prinzip	39

5.2.2	RNA-Extraktion und -Quantifizierung	40
5.2.3	Reverse Transkription	40
5.2.4	Herstellung der kompetitiven Referenzstandards	41
5.2.4.1	Anforderungen an die Referenzstandards	41
5.2.4.2	Umwandlung der WT-RNA in WT-cDNA.....	41
5.2.4.3	Primerkonstruktion	41
5.2.4.4	PCR mit T7-Primern.....	43
5.2.4.5	Extraktion, Transkription und Reverse Transkription	44
5.2.5	Kompetitive PCR.....	45
5.3	TGF- β 1-ELISA	47
5.3.1	Allgemeines Prinzip	47
5.3.2	Probenaufbereitung	48
5.3.3	ELISA.....	48
5.3.4	Auswertung	49
5.4	T β RI/T β RII - Western Blot.....	50
5.4.1	Allgemeines Prinzip	50
5.4.2	Probenaufbereitung	50
5.4.3	Proteinmessung	50
5.4.4	SDS-Gelelektrophorese	51
5.4.4.1	Konstruktion des Lämmli-Gels	51
5.4.4.2	Elektrophorese.....	51
5.4.5	Blot.....	52
5.4.6	Immundetektion	52
5.5	Statistische Auswertung.....	53
6	Ergebnisse.....	54
6.1	Vorbemerkungen zu den Zellkulturversuchen.....	54

6.2	Wirkung von Tacrolimus auf die TGF- β 1-Synthese	54
6.2.1	TGF- β 1-mRNA-Expression.....	54
6.2.1.1	Exemplarische Auswertung.....	54
6.2.1.2	Übersicht TGF- β 1-mRNA.....	57
6.2.2	Übersicht TGF- β 1-Protein im Zellkulturüberstand.....	59
6.3	Wirkung von Tacrolimus auf die Expression von T β RI und T β RII.....	61
6.3.1	Übersicht T β RI- und T β RII-mRNA	61
6.3.2	Übersicht T β RI- und T β RII-Protein in der Mesangiumzelle.....	63
6.4	Unterschiede in der TGF- β 1-Synthese	66
7	Diskussion.....	68
7.1	Zellkulturversuche.....	68
7.2	Wirkung von Tacrolimus auf die TGF- β 1-Synthese	68
7.3	Wirkung von Tacrolimus auf die Expression von T β RI und T β RII.....	69
7.4	Unterschiedliches Ansprechen von Mesangiumzellen auf Tacrolimus.....	69
7.5	Vergleich mit Cyclosporin A	71
8	Abkürzungsverzeichnis.....	74
9	Literaturverzeichnis.....	79
10	Eidesstattliche Versicherung.....	87
11	Lebenslauf.....	89
12	Publikationsliste	91
13	Danksagung	92

1 Abstract

1.1 Deutsche Version

Einleitung: Aufgrund des demographischen Wandels und der steigenden Prävalenz von Diabetes mellitus und vaskulären Erkrankungen werden immer mehr Patienten mit der Diagnose einer terminalen Niereninsuffizienz behandelt. Es hat sich gezeigt, dass die Nierentransplantation im Vergleich zu Hämodialyse und Peritonealdialyse die beste Therapieoption ist, da sie den beiden Dialyseverfahren sowohl in Bezug auf die Lebenserwartung als auch in Bezug auf die Lebensqualität überlegen ist. Die weitere Verlängerung des Transplantatüberlebens bleibt ein wichtiges Ziel der aktuellen Forschung. Die chronische Transplantatschädigung mit resultierender Fibrosierung des Organs ist eine der Hauptursachen des vorzeitigen Transplantatverlustes. Hierfür ist die immunsuppressive Erhaltungstherapie mit Calcineurin-Inhibitoren zumindest teilweise mitverantwortlich. In zahlreichen Untersuchungen an Transplantatnieren und an Eigennieren wurde der profibrotische Effekt von Transforming Growth Factor- β 1 (TGF- β 1) belegt. In der vorliegenden Arbeit wurde der Einfluss von Tacrolimus auf die Synthese von TGF- β 1 und der beiden Rezeptoren Typ I-Rezeptor (T β RI) und Typ II-Rezeptor (T β RII) an Mesangiumzellen untersucht.

Methodik: Verschiedene Kulturen von Mesangiumzellen aus Sprague-Dawley-Ratten wurden in Anwesenheit von 10, 50 oder 100 ng/ml Tacrolimus bzw. ohne Tacrolimus über unterschiedliche Zeiträume inkubiert. Die Messung der mRNA von TGF- β 1, T β RI und T β RII erfolgte durch kompetitive reverse Transkription-Polymerasekettenreaktion (rT-PCR). Das TGF- β 1-Protein im Zellkulturüberstand wurde mittels Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA) bestimmt. Die Proteine T β RI und T β RII in Mesangiumzellen wurden mittels Western Blot gemessen.

Ergebnisse: Im Vergleich zur Inkubation ohne Tacrolimus zeigte sich nach 72stündiger Inkubation mit Tacrolimus eine vermehrte Expression von TGF- β 1-mRNA in einigen Mesangiumzellkulturen (10 ng/ml: 1,86-fach, 50 ng/ml: 1,70-fach, 100 ng/ml: 1,48-fach vs. 0 ng/ml Tacrolimus). Übereinstimmend fand sich eine vermehrte Produktion von TGF- β 1-Protein in den Kulturüberständen nach 96 Stunden Inkubation mit Tacrolimus (0 ng/ml Tacrolimus: 380,91 ng/ml, 10 ng/ml: 591,30 ng/ml, 50 ng/ml: 573,64 ng/ml, 100 ng/ml: 625,87 ng/ml). Der Effekt war nicht dosisabhängig und nicht in allen Mesan-

giumzellkulturen reproduzierbar. Im Gegensatz dazu kam es nach Inkubation der Mesangiumzellen mit Tacrolimus weder auf mRNA- noch auf Protein-Ebene zu einer vermehrten Synthese der beiden Zielrezeptoren T β RI und T β RII.

Schlussfolgerung: Zusammenfassend konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass kultivierte Mesangiumzellen von Sprague-Dawley-Ratten bei Inkubation mit Tacrolimus vermehrt TGF- β 1 synthetisieren. Dieser Effekt war jedoch nicht bei allen Mesangiumzellkulturen zu beobachten. Genetische Polymorphismen könnten eine mögliche Erklärung für dieses Phänomen sein. Die durch Tacrolimus induzierte Zunahme der TGF- β 1-Synthese von Mesangiumzellen könnte bei der Fibrosierung der Transplantatniere im Rahmen der chronischen Transplantatschädigung eine Rolle spielen.

1.2 Englische Version

Introduction: Due to demographic changes and the increasing prevalence of diabetes mellitus and vascular diseases the number of patients with end stage renal disease is increasing. Renal transplantation is the best therapeutic option compared to hemodialysis and peritoneal dialysis, as it was shown to be superior to both dialysis modalities concerning life expectancy and the quality of life. Further improvement of renal allograft survival remains an important goal of current research. Chronic allograft injury with resulting organ fibrosis is one of the main causes of premature graft loss. At least in part maintenance immunosuppression with calcineurin-inhibitors is responsible for this phenomenon. In numerous studies investigating transplanted kidneys and native kidneys the profibrotic effect of transforming growth factor- β 1 (TGF- β 1) has been shown. In this dissertation, the effect of tacrolimus on the synthesis of TGF- β 1 and its receptors type I (T β RI) and type II (T β RII) was investigated in cultured mesangial cells.

Methods: Different mesangial cell cultures derived from Sprague-Dawley rats were incubated in the presence of 10, 50, 100 ng/ml tacrolimus or in the absence of tacrolimus over different periods of time. TGF- β 1-, T β RI- and T β RII-mRNA were measured by competitive reverse transcription polymerase chain reaction (rT-PCR). TGF- β 1-protein in cell culture supernatants was measured by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). T β RI- and T β RII-protein in mesangial cells were measured by Western blot.

Results: Compared to incubation in the absence of tacrolimus, an increased expression of TGF- β 1-mRNA was found in some mesangial cell cultures following 72 hours of incubation in the presence of tacrolimus (10 ng/ml: 1,86-fold, 50 ng/ml: 1,70-fold, 100 ng/ml:

1,48-fold). In agreement, an increased production of TGF- β 1-protein was observed in cell culture supernatants after 96 hours of incubation with tacrolimus (0 ng/ml tacrolimus: 380,91 ng/ml, 10 ng/ml: 591,30 ng/ml, 50 ng/ml: 573,64 ng/ml, 100 ng/ml: 625,87 ng/ml). The effect was not dose-dependent and could not be reproduced in all mesangial cell cultures. In contrast, incubation of mesangial cells with tacrolimus had no effect on T β RI- and T β RII-synthesis, neither at the mRNA level nor at the protein level.

Conclusion: In summary, this dissertation shows that incubation of cultured rat mesangial cells from Sprague-Dawley rats with tacrolimus increase TGF- β 1 synthesis. However, the effect was not reproducible in all mesangial cell cultures. Genetic polymorphisms may be a possible explanation for this phenomenon. Tacrolimus-induced increase of mesangial TGF- β 1-synthesis may play a role in renal allograft fibrosis in the course of chronic allograft injury.

2 Einleitung

2.1 Terminale Niereninsuffizienz

2.1.1 Definition und Klassifikation

Die Definition einer chronischen Niereninsuffizienz ist erfüllt, wenn entweder ein über mindestens drei Monate bestehender struktureller oder funktioneller Nierenschaden oder eine über mindestens drei Monate bestehende Reduktion der glomerulären Filtrationsrate (GFR) auf weniger als $60 \text{ ml/min/1,73 m}^2$ vorliegt. Ein struktureller oder funktioneller Nierenschaden liegt vor, wenn histopathologische Veränderungen der Nierenstruktur, Marker des Nierenschadens wie eine Proteinurie oder Veränderungen der Nieren in bildgebenden Verfahren nachweisbar sind [1].

Die Stadieneinteilung der chronischen Niereninsuffizienz erfolgt nach den K/DOQI-Guidelines (Richtlinien der Kidney Dialysis Outcomes Quality Initiative). Die dem Stadium V entsprechende terminale Niereninsuffizienz ist definiert durch eine GFR $< 15 \text{ ml/min/1,73 m}^2$ [1].

Stadium	Nierenschaden mit	GFR (ml/min/1,73 m ²)
I	normaler GFR	≥ 90
II	gering erniedrigter GFR	60 - 89
III	moderat erniedrigter GFR	30 - 59
IV	stark erniedrigter GFR	15 - 29
V	Nierenversagen	< 15

Tabelle 1: Stadien der chronischen Niereninsuffizienz nach den K/DOQI-Richtlinien [1].

2.1.2 Inzidenz, Prävalenz

Im Stadium der terminalen Niereninsuffizienz ist die Einleitung einer dauerhaften Nierenersatztherapie indiziert. Im Jahre 2006 wurde in Deutschland bei 17.548 Patienten eine chronische Nierenersatztherapie begonnen. Insgesamt befanden sich 91.718 Patienten in einer chronischen Nierenersatztherapie, was einer Inzidenz von 213 pro eine Million Einwohner und einer Prävalenz von 1.114 pro eine Million Einwohner entspricht.

Für die chronische Nierenersatztherapie stehen drei etablierte Verfahren zur Verfügung: Hämodialyse, Peritonealdialyse und Nierentransplantation. In Deutschland erhielten zum Stichtag 31.12.2006 von den in chronischer Nierenersatztherapie befindlichen Patienten 69 % eine Hämodialysebehandlung, 3,5 % eine Peritonealdialysebehandlung und 27,5 % befanden sich in der Nachsorge mit einem funktionierenden Nierentransplantat [2]. Aktuellere Daten liegen nicht vor, da die Tätigkeit von QuaSi-Niere über diesen Zeitraum hinaus nicht fortgeführt wurde.

In den letzten Jahren kam es zu einem stetigen Anstieg von Inzidenz und Prävalenz der terminalen Niereninsuffizienz bedingt durch den demographischen Wandel der Bevölkerungsstruktur und die steigende Prävalenz von Diabetes mellitus und vaskulären Erkrankungen [2].

2.1.3 Ätiologie und Pathogenese

Die drei Hauptursachen der terminalen Niereninsuffizienz sind die diabetische Nephropathie, die vaskuläre Nephropathie sowie die Gruppe der Glomerulopathien [2].

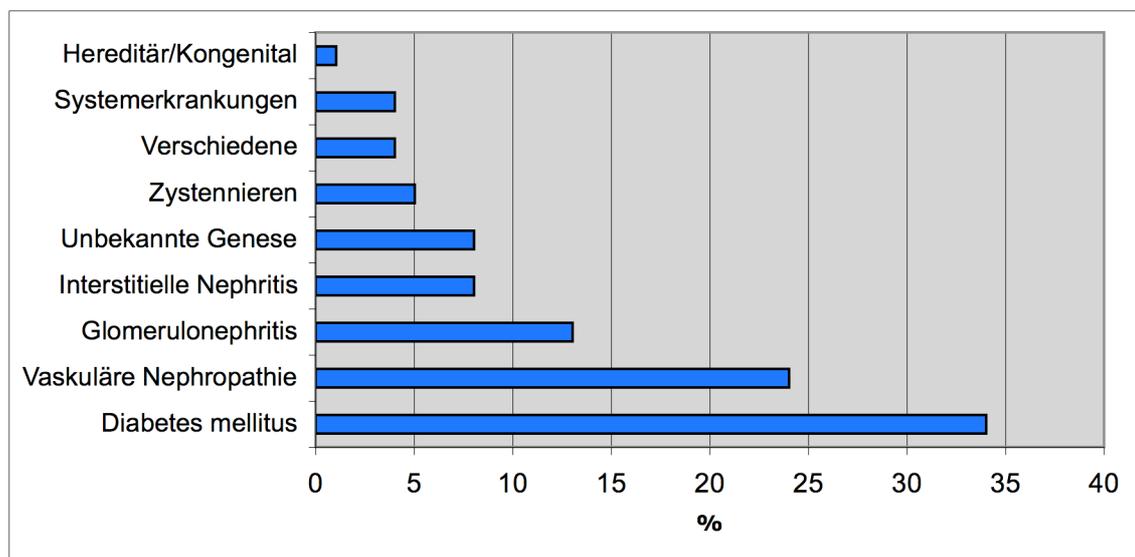


Abbildung 1: Prozentuale Darstellung der Ursachen der terminalen Niereninsuffizienz zu Beginn einer chronischen Nierenersatztherapie in Deutschland im Jahre 2006 [2].

Das progrediente Wesen der chronischen Niereninsuffizienz wird u. a. durch die Hyperfiltrationstheorie erklärt [3]. Nach dem Untergang einzelner Nephrone kommt es zur kompensatorischen Erhöhung der Filtrationsleistung der vitalen Nephrone. Dadurch bleibt die Gesamtnierenfunktion vorübergehend erhalten. Langfristig kommt es dadurch

jedoch zur Schädigung und Sklerosierung der vitalen Nephrone und zum weiteren Funktionsverlust. Histopathologisch kommt es zur Glomerulosklerose und zur interstiellen Fibrose [3, 4].

2.1.4 Pathophysiologie

Durch die fortschreitende Niereninsuffizienz kommt es zu einer verminderten Exkretion von Stoffwechselabbauprodukten, Störungen im Säure-Basen-Haushalt, einer gestörten Ausscheidung von Elektrolyten und Wasser sowie zu einer Beeinträchtigung der endokrinen Funktionen der Niere. Daraus entwickeln sich sekundär Probleme wie arterielle Hypertonie, Hyperkaliämie, Hypokalzämie, Hyperphosphatämie, metabolische Azidose, renale Anämie, Vitamin D-Mangel, sekundärer Hyperparathyreoidismus und renale Osteopathie. Mit fortschreitender Urämie kommt es zu Blutungsneigung, peripheren und zentralen neurologischen Störungen, dermatologischen Erkrankungen sowie zu Entzündungen der serösen Häute (z. B. Perikarditis) und der Schleimhäute (z. B. Gastritis) [4].

2.1.5 Therapie

An erster Stelle steht die Diagnostik hinsichtlich einer therapierbaren Grunderkrankung. In vielen Fällen impliziert dies die Durchführung einer Nierenpunktion. Soweit sich hieraus eine spezifische Therapieoption ergibt, steht diese im Vordergrund.

Neben der Grunderkrankung müssen Faktoren, die eine Progression der chronischen Niereninsuffizienz fördern, therapiert werden. Der systemische Blutdruck muss normalisiert werden. Hierfür sollten vorzugsweise Antihypertensiva eingesetzt werden, die auch den intraglomerulären Filtrationsdruck senken wie ACE-Hemmer oder Angiotensin-Rezeptor-Blocker. Nephrotoxische Medikamente sollten strikt vermieden werden. Röntgenkontrastmittel dürfen nur restriktiv und mit adäquater Vorbereitung angewendet werden. Eine Korrektur von Fettstoffwechselstörungen und eine Nikotinkarenz sind anzustreben [5].

Im Falle einer progredienten Verschlechterung der Nierenfunktion müssen die Therapie der oben genannten Komplikationen sowie die Aufklärung über die verschiedenen Formen der Nierenersatztherapie und die daraus resultierenden vorbereitenden Maßnahmen erfolgen. Eine Nierenersatztherapie sollte im Stadium V der chronischen Niereninsuffizienz begonnen werden [5]. Nach den K/DOQI-Richtlinien sollte die Entscheidung

zur Einleitung einer Dialysetherapie in Abhängigkeit von der wöchentlichen Harnstoff-Clearance (K^*t/V_{HST}) getroffen werden. Bei Unterschreitung einer wöchentlichen Harnstoff-Clearance von 2,0 besteht die Indikation zur dauerhaften Nierenersatztherapie [6]. Bei stabilem Körpergewicht, adäquat ernährtem Patienten ohne Vorliegen relevanter Ödeme, einem Serum-Albumin im Normbereich und fehlenden klinischen Zeichen der Urämie ist ein Zuwarten möglich [5, 6].

2.1.5.1 Hämodialyse

Unter dem Oberbegriff "Hämodialyse" werden verschiedene Therapieformen zusammengefasst. Die Hämodialyse im engeren Sinne basiert auf dem Prinzip der Diffusion durch eine semipermeable Membran. Durch den Konzentrationsgradienten zwischen Blutkreislauf und Dialyseflüssigkeit kommt es zum Übertritt der Urämietoxine (z. B. Kreatinin und Harnstoff) vom Blut in die Dialyseflüssigkeit. Außerdem passen sich die Elektrolytkonzentrationen im Blut an das Dialysat an (z. B. Natrium, Kalium, Phosphat und Kalzium) [7].

Das zweite Grundprinzip ist die Hämofiltration. Die Entgiftung erfolgt nach dem Prinzip der Konvektion, wobei gelöste Teilchen den Kreislauf mit dem Filtrat (Plasmawasser) verlassen und durch eine Substitutionslösung ersetzt werden. Im Filtrat befinden sich Urämietoxine und Elektrolyte. Das Substitut ist toxischfrei und enthält Elektrolyte in variierbarer Konzentration. Der Entzug von Wasser bei der Hämodialyse und der Hämofiltration erfolgt durch Ultrafiltration über einen Druckgradienten. Auch in den ca. zwei bis drei Litern Ultrafiltrat pro Dialysebehandlung sind Urämietoxine enthalten. Für die Gesamtentgiftung ist diese Menge jedoch ohne Bedeutung. Zum Ausgleich der metabolischen Azidose ist im Dialysat die Puffersubstanz Bikarbonat in höherer Konzentration als im Blut enthalten [7].

Kombinationen der beiden Grundprinzipien Hämodialyse und Hämofiltration führen zu verschiedenen Verfahren (HD - Hämodialyse, HF - Hämofiltration, HDF - Hämodiafiltration), die kontinuierlich (vor allem auf Intensivstationen) oder intermittierend (vor allem im ambulanten Bereich) angewendet werden.

In einer systematischen Meta-Analyse von 20 Studien mit insgesamt 657 ambulant behandelten Patienten wurde hinsichtlich Mortalität und Morbidität kein signifikanter Unterschied zwischen diesen drei Verfahren gefunden [8].

2.1.5.2 Peritonealdialyse

Das Prinzip der Peritonealdialyse beruht auf der Nutzung des Peritoneums als Dialysemembran. Die Bauchhöhle wird über einen permanent implantierten Kunststoffkatheter mit Dialyseflüssigkeit gefüllt. Nach einer vom jeweiligen Verfahren abhängigen Verweilzeit, während der die Austauschvorgänge zwischen den Kapillaren des Peritoneums und der Dialyseflüssigkeit stattfinden, wird die Dialyseflüssigkeit erneuert. Der Entzug von Flüssigkeit (Ultrafiltration) erfolgt durch den Zusatz von osmotisch wirksamer Glukose oder Polyglukose zum Dialysat. Als Puffer werden Bikarbonat und Laktat benutzt. Die Peritonealdialyse kann manuell als kontinuierlich ambulante Peritonealdialyse (CAPD) durchgeführt werden oder als maschinell kontrolliertes Verfahren, das als automatische Peritonealdialyse (APD) bezeichnet wird. Da die Peritonealdialyse ein Heimdialyseverfahren ist, bedarf sie einer höheren Motivation und Mitarbeit des Patienten als die Hämodialyse im Zentrum. Kontraindikationen für die Peritonealdialyse sind unter anderem chronisch entzündliche Darmerkrankungen, ein Verwachsungsbauch, ein künstlicher Darmausgang und schwere körperliche oder geistige Behinderungen, die eine Durchführung des Verfahrens bei Fehlen einer entsprechenden Hilfsperson unmöglich machen [9].

Patienten an Peritonealdialyse haben insbesondere nach mehrjähriger Therapie eine höhere Lebensqualität im Vergleich zu Patienten an Hämodialyse im Zentrum [10]. Patienten an Peritonealdialyse haben eine ähnliche Lebenserwartung wie Patienten an Hämodialyse [11].

2.1.5.3 Nierentransplantation

Bereits Anfang des 20. Jahrhunderts erfolgten Versuche Nierentransplantationen durchzuführen. Chirurgisch war das auch möglich. Durch andere, zu dieser Zeit nicht bekannte Faktoren kam es aber zum Versagen der transplantierten Organe. Die erste Nierentransplantation mit einem langfristigen Transplantatüberleben von über einem Jahr gelang J. Hartwell Harrison, John P. Merrill und Joseph E. Murray am Peter Bent Hospital in Boston am 23. Dezember 1954 bei eineiigen Zwillingen [12, 13]. Aufgrund der Erkenntnis, dass immunologische Vorgänge bei der Abstoßung transplantierte Organe eine wesentliche Rolle spielen, versuchte man zunächst durch Behandlung der Empfänger mit Röntgenstrahlen Abstoßungsreaktionen zu verhindern. Der entscheidende Durchbruch in der Transplantationsmedizin gelang durch die Einführung

von Azathioprin, das in Kombination mit hochdosierten Kortikosteroiden als immunsuppressive Therapie erstmals Anfang der 60er Jahre bei Transplantation eingesetzt wurde [14]. In den Folgejahren kam es zu einer sprunghaften Zunahme der Nierentransplantationen. Heutzutage ist die Nierentransplantation ein Standardverfahren [13].

Ein Hauptproblem ist nach wie vor das vorzeitige Transplantatversagen. Hierbei wird zwischen akuten und chronischen Rejektionen sowie dem nicht-immunologisch bedingten Transplantatversagen unterschieden. Durch die Einführung moderner Immunsuppressiva, verbesserter Operationstechniken und die Beherrschung von relevanten Komplikationen sowie intensive Nachbetreuung der Patienten konnte insbesondere die Rate der akuten Rejektionen massiv gesenkt werden. Hariharan et al. zeigten anhand von Daten der in den USA zwischen 1988 und 1996 erfolgten Transplantationen einen Anstieg des 1-Jahres-Transplantat-Überlebens bei Lebendspenden von 89 auf 94 % und bei postmortalen Nierenspenden von 76 auf 88 % [15].

Die damit verbundene Hoffnung auf eine Verbesserung des Langzeit-Transplantatüberlebens wurde von Meier-Kriesche et al. durch Nachbeobachtung dieser Patienten relativiert. Tatsächlich konnte ein Anstieg des mittleren Transplantatüberlebens um ca. zwei Jahre nachgewiesen werden. Diese Verbesserung war aber vor allem auf ein verlängertes Transplantatüberleben nach Re-Transplantation und Verbesserungen in der Frühphase nach erfolgter Transplantation zurückzuführen. Nach dem ersten Jahr kam es bei erstransplantierten Patienten nur noch zu einer geringen Verlängerung des Transplantatüberlebens [16].

Im Jahre 2011 fanden in Deutschland 2.850 Nierentransplantationen statt, davon waren 795 (27,9 %) Lebendnierenspenden. In den vergangenen zehn Jahren nahm die Anzahl an Nierentransplantationen zu, in den letzten Jahren v. a. die Anzahl der Lebendnierentransplantationen. Die Anzahl der Patienten auf der aktiven Warteliste hat in den vergangenen zehn Jahren um fast 2000 Patienten abgenommen, unter anderem verursacht durch die zunehmende Anzahl an Transplantationen aber auch dadurch, dass jährlich 300 bis 400 auf der Warteliste stehende Patienten versterben [17, 18].

2.1.5.4 Vergleich Dialyse/Transplantation

Beim Vergleich der Mortalität zwischen Dialysepatienten und transplantierten Patienten muss der Selektionsfehler beachtet werden. Patienten, die eine Transplantation erhal-

ten, haben bereits vor der Intervention eine höhere Lebenserwartung als Patienten, die für eine Transplantation nicht geeignet sind. Wolfe et al. haben unter Ausschluss dieses Selektionsfehlers in einer großen Longitudinalstudie mit 46.164 auf der Warteliste zur Transplantation befindlichen Patienten gezeigt, dass transplantierte Patienten nach einem kurzen interventionsbedingten Anstieg der Mortalität einen deutlichen Überlebensvorteil gegenüber Dialysepatienten besitzen [19].

Die bessere Lebensqualität nach erfolgter Nierentransplantation im Vergleich zu Dialysepatienten wurde in mehreren Studien nachgewiesen [20]. Liem et al. bestätigten dies in einer Metaanalyse mit insgesamt 36.582 Patienten mit der Einschränkung, dass ein Teil des Effektes durch das an Dialyse befindliche "kränkere" Patientenkollektiv erklärt ist [21].

Hinsichtlich Lebenserwartung und Lebensqualität ist die Nierentransplantation für die in Frage kommenden Patienten also die optimale Therapie. Deshalb muss eine Verkürzung der Wartezeit auf ein Spenderorgan angestrebt werden. Die Ressourcen hinsichtlich einer Erhöhung der Anzahl der Organspender scheinen derzeit in Deutschland weitestgehend ausgeschöpft zu sein. Nicht zuletzt deshalb muss die Verlängerung des Transplantatüberlebens weiterhin ein Forschungsschwerpunkt in der Transplantationsmedizin sein.

2.2 Chronische Transplantatnephropathie

2.2.1 Definition

Das 10-Jahresüberleben transplantierter Nieren lag in den letzten Jahren in Abhängigkeit von der Herkunft der Spenderniere (postmortale Spenderniere oder Lebendspenderniere) zwischen 50 und 70 % [22]. Für das chronische Transplantatversagen wurde ursprünglich der Begriff chronische Rejektion verwendet, da man von einer anhaltenden Immunreaktion als Ursache ausging. Im Laufe der Jahre wurde jedoch klar, dass auch nicht-immunologische Prozesse für den chronischen Funktionsverlust einer Transplantatnieren maßgeblich mitverantwortlich sind. Im Jahre 1997 wurde daher der Begriff chronische Rejektion durch den Begriff chronische Transplantatnephropathie (CAN: chronic allograft nephropathy) ersetzt. Gleichzeitig wurden histopathologische Kriterien zur Einteilung in unterschiedliche Schweregrade festgelegt [23].

Grad	Histologische Veränderungen
I	Geringgradige interstitielle Fibrose und tubuläre Atrophie ohne (a) oder mit (b) spezifische(n) Veränderungen für eine chronische Abstoßung
II	Mittelgradige interstitielle Fibrose und tubuläre Atrophie ohne (a) oder mit (b) spezifische(n) Veränderungen für eine chronische Abstoßung
III	Hochgradige interstitielle Fibrose und Tubulusuntergang ohne (a) oder mit (b) spezifische(n) Veränderungen für eine chronische Abstoßung

Tabelle 2: Ursprüngliche Banff 97-Klassifikation der chronischen Transplantatnephropathie [23].

Im Laufe der Jahre wurde in vielen Publikationen der Eindruck erweckt, es handele sich bei dem Begriff CAN um eine spezifische Erkrankung. Da dieser aber nur unspezifisch die chronische Vernarbung der Transplantatniere ohne Hinweis auf die bestehende Ursache beschreiben sollte, wurde bei der Banff 05-Konferenz stattdessen der Begriff chronische Transplantatschädigung (CAI: chronic allograft injury) neu eingeführt und versucht, die einzelnen Ursachen der chronischen Transplantatschädigung histopathologisch besser zu definieren. Außerdem kam es zur Wiedereinführung des Begriffs chronische Rejektion für die immunologisch bedingte chronische Abstoßungsreaktion im engeren Sinne [24, 25].

2.2.2 Ätiologie

Wiederholte Abstoßungsreaktionen sind ein wesentlicher Risikofaktor für die Entwicklung einer chronischen Rejektion [26]. Ein weiterer Risikofaktor sind subklinische Rejektionen, die durch Messungen der Nierenfunktionsparameter nicht erfasst werden, aber in Protokollbiopsien, d.h. Biopsien ohne klinischen Anlass, als auffällige histologische Veränderungen (SCR: subclinical rejection) gefunden werden [27].

Histopathologisch kann die chronische Rejektion in eine chronische T-Zell vermittelte Rejektion, die durch eine chronische Transplantat-Arteriopathie mit Intimafibrose, mononukleären Infiltraten und Bildung einer Neo-Intima gekennzeichnet ist, und eine chronisch humorale, also durch Antikörper vermittelte Rejektion unterteilt werden. Für die Diagnose einer chronisch humoralen Rejektion müssen histopathologische Kriterien (Doppelkonturen an der glomerulären Basalmembran und/oder Aufsplitterung der Ba-

salmembran der peritubulären Kapillaren und/oder interstitielle Fibrose mit Tubulusatrophie und/oder arterielle Intimafibrose), immunhistochemische Kriterien (Ablagerung des Komplementproduktes C4d in den peritubulären Kapillaren) und der Nachweis donor-spezifischer Antikörper im Empfängerserum erfüllt sein [24, 25]. In den letzten Jahren hat sich herauskristallisiert, dass insbesondere die chronisch humorale Rejektion einen großen Einfluss auf das Langzeit-Transplantatüberleben hat [28].

Neben diesen immunologischen Faktoren wurden weitere Risikofaktoren für die Entwicklung einer chronischen Transplantatschädigung identifiziert. Dabei handelt es sich auf der einen Seite um Faktoren wie das Alter des Spenders [29], Vorerkrankungen des Empfängers wie Hyperlipidämie und arterielle Hypertonie [26] sowie Infektionen des Empfängers nach Transplantation wie die Zytomegalievirusinfektion [30]. Auf der anderen Seite spielen als methodische Faktoren der Ischämie-Reperfusionsschaden und die immunsuppressive Behandlung insbesondere mit Calcineurin-Inhibitoren eine Rolle [31, 32].

Für einige dieser Faktoren bzw. Erkrankungen wurden histologische Kriterien in die Banff-Klassifikation aufgenommen. Beispielsweise finden sich im Falle einer Virusinfektion Einschlusskörperchen in der Histologie, Immunhistologie oder Elektronenmikroskopie [24]. Auf die histologischen Kriterien der Calcineurininhibitor-Nephrotoxizität wird im Kapitel 2.4.4 detailliert eingegangen.

2.2.3 Pathophysiologie

Trotz zunehmender Kenntnis über einzelne Schritte der im Vordergrund stehenden Fibrosierung sind die genauen pathophysiologischen Mechanismen der Entwicklung einer CAI nur teilweise geklärt. Im Verlauf kommt es zu folgenden Prozessen, deren Endpunkt die Fibrose und damit der Verlust der Funktionsfähigkeit der transplantierten Niere ist [22]:

- Aktivierung des Gefäßendothels mit nachfolgender Organdysfunktion durch Koagulation, Gefäßlecks und Vasokonstruktion sowie Freisetzung proinflammatorischer Zytokine, Chemokine und Wachstumsfaktoren
- Immigration und Infiltration von neutrophilen Granulozyten, Monozyten, Makrophagen und T-Lymphozyten

- Gefäßmuskelzellen werden migrationsfähig, Mesangiumzellen werden aktiviert und Fibroblasten transformieren zu Myofibroblasten

Das Resultat ist eine Veränderung der extrazellulären Matrix (ECM) mit Zunahme von Glykoproteinen und Proteoglykanen sowie Veränderungen in der Kollagenzusammensetzung. Eine wichtige Rolle in der Regulation der Zusammensetzung der ECM spielen Matrixmetalloproteinasen, deren eigene Inhibitoren (TIMPs: tissue inhibitor of metalloproteinases), eine Genfamilie von Metalloproteinase-Disintegrinen (die als ADAMs bezeichnet wird) und die Urokinase-Plasmin-Kaskade [22].

Der histologische Schweregrad der chronischen Transplantatschädigung ist unabhängig von der Höhe des Serum-Kreatinins ein Prädiktor für das Transplantatüberleben [33]. Klinisch manifestiert sich die chronische Transplantatschädigung durch einen fortschreitenden Rückgang der Nierenfunktion mit stetigem Anstieg des Serum-Kreatinins und/oder eine neu auftretende oder zunehmende Proteinurie und/oder eine Neuentwicklung oder Verschlechterung eines vorbestehenden arteriellen Hypertonus. Endpunkt ist der irreversible Funktionsverlustverlust der Transplantatniere [22].

2.3 Transforming Growth Factor- β (TGF- β)

TGF- β ist der Prototyp einer Superfamilie von Zytokinen, die als strukturelle Gemeinsamkeit zum einen in der aktiven Form als Dimer vorliegen und zum anderen β -Stränge besitzen, die untereinander über drei Disulfidbrücken als "cystine knot" verbunden sind [34]. Erstmals beschrieben wurde es 1980 aufgrund der Fähigkeit, verschiedene isolierte Gewebetypen von Mäusen, unter anderem Fibroblasten aus der Niere, zum Wachstum zu stimulieren [35].

Bei Säugetieren wurden bereits über 30 Mitglieder der TGF- β -Superfamilie identifiziert. Neben den drei Isoformen TGF- β 1, TGF- β 2 und TGF- β 3 gehören das Protein "nodal", zehn "bone morphogenetic proteins" (BMPs), vier Activine und elf Wachstums- und Differenzierungshormone sowie das Anti-Müller-Hormon dazu. Neben der Regulation verschiedener Zellfunktionen wie Zellwachstum, Adhäsion, Migration, Differenzierung und Apoptose im adulten Organismus spielen Mitglieder der Familie eine Rolle bei der Embryonalentwicklung [36].

2.3.1 TGF- β 1

Von den drei Isoformen des TGF- β im menschlichen Organismus ist TGF- β 1 nach derzeitigem Stand die wichtigste Isoform und wird von den drei Isoformen in der Niere am höchsten exprimiert. Das humane TGF- β 1 wird auf Chromosom 19q13.1 kodiert. TGF- β 1 wird mit einer Prädomäne, die als "latency associated protein" (LAP) bezeichnet wird, synthetisiert und liegt dadurch als inaktive Form vor. Nach der Sekretion kommt es extrazellulär zum Anlagern an ein Matrixprotein, das "latent TGF- β binding protein" (LTBP). Gemeinsam wird dieser inaktive Komplex (LAP-TGF β 1-LTBP) als "large latent complex" (LLC) bezeichnet. Diese Komplexbildung ist ein Ansatzpunkt zur Regulation der biologischen Aktivität von TGF- β 1. Durch Anlagerung von Proteasen an einer definierten Stelle der Prädomäne LAP kommt es zur Konformationsänderung des Komplexes und damit zur Abspaltung und Aktivierung des TGF- β 1. Als Aktivatoren hat man bisher Thrombospondin, Plasmin und Cathepsin D identifiziert. Die genaue Regulation ist noch nicht geklärt. Das aktive TGF- β 1 ist ein Dimer aus zwei 12,5 kDa schweren biologisch aktiven Untereinheiten, die durch Disulfidbrücken zusammengehalten werden [37, 38].

2.3.2 Signalkaskade

Bindung von TGF- β an Rezeptoren der Zelloberfläche:

Für die Übertragung von Signalen der TGF- β -Superfamilie in die Zelle spielen hauptsächlich zwei Rezeptorklassen eine Rolle. Es sind bisher sieben Typ I- und fünf Typ II-Rezeptoren bekannt, wobei für die Signalübertragung von TGF- β 1 der Typ I-Rezeptor ALK 5 (T β RI) und der Typ II-Rezeptor T β RII von entscheidender Bedeutung sind. Sowohl die Typ I- als auch die Typ II-Rezeptoren sind transmembranäre Glykoproteine und besitzen die Funktion einer Serin-Threonin-Kinase. Die Mitglieder beider Rezeptorklassen bestehen jeweils aus ca. 500 Aminosäuren mit einer extrazellulären N-terminalen Bindungsdomäne, einem transmembranären Anteil und einer intrazellulären C-terminalen Serin-Threonin-Kinase-Domäne [39].

Aktiviertes TGF- β 1 bindet an T β RII, wodurch es zur Interaktion mit T β RI kommt. Die T β RII-Kinase phosphoryliert Serine und Threonine in der intrazellulären Region von T β RI, wodurch das katalytische Zentrum von T β RI aktiviert wird und seinerseits zur Phosphorylierung bereit ist [36]. Unterstützt wird dieser Prozess durch den TGF- β -

Rezeptor III, auch Betaglykan genannt, der keine eigene Signalfunktion besitzt aber bei der Bindung von TGF- β 1 an T β RII als Kofaktor fungiert [39].

Intrazelluläre Informationsverarbeitung durch SMADs:

1995 wurden in der *Drosophila melanogaster* erstmals intrazelluläre Mediatoren der TGF- β -Signalkaskade entdeckt. Man bezeichnet sie als "Mother against decapentaplegic" (MAD)-Proteine [40]. In der Folge wurden orthologe Proteine in humanen Zellen nachgewiesen, die als SMAD-Proteine bezeichnet werden. Die Einteilung der SMADs erfolgt in drei Gruppen: R-SMADs interagieren direkt mit den Rezeptoren der TGF- β -Superfamilie, Co-SMADs fungieren als Kofaktoren und I-SMADs wirken inhibitorisch auf die Signalkaskade.

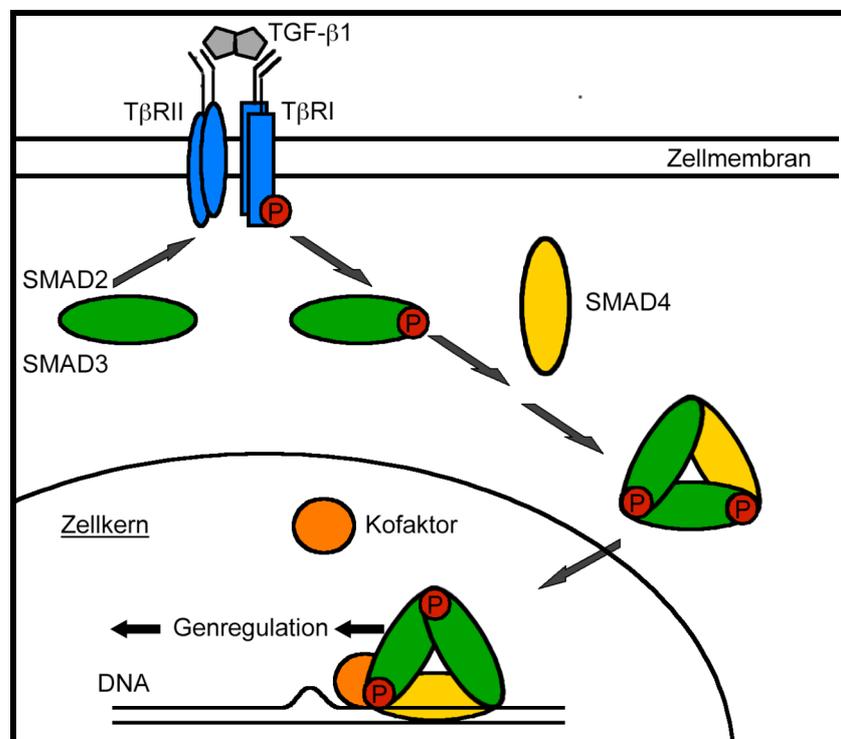


Abbildung 2: TGF- β 1-Signaltransduktion: Durch Bindung von TGF- β 1 an seinen Rezeptor T β RII erfolgt die Aktivierung des Rezeptors T β RI. Dies führt zur Phosphorylierung von SMAD 2/3, anschließender Komplexbildung mit SMAD 4 und Translokation in den Zellkern. Durch Bindung an die DNA mit Hilfe eines Kofaktors erfolgt die Regulation der Transkription der Zielgene [36].

Die SMAD-Proteine bestehen aus ca. 500 Aminosäuren und besitzen als strukturelle Gemeinsamkeit die N-terminale MH1-Domäne und die C-terminale MH2-Domäne. Zwischen diesen beiden Domänen befindet sich die Linkerregion, in der durch Phosphorylierung regulierend in die Signalverarbeitung eingegriffen werden kann. Für die Signalverarbeitung von TGF- β sind SMAD2, SMAD3 und SMAD4 von entscheidender Bedeu-

tung. Die beiden R-SMADs SMAD2 und SMAD3 binden über ihre MH2-Domäne an den aktivierten T β RI und werden am C-terminalen Ende phosphoryliert. Dadurch werden sie in die Lage versetzt, eine Komplexbildung mit dem Co-SMAD SMAD4 einzugehen. Dieser Komplex transloziert in den Zellkern, bindet an die DNA und reguliert die Transkription von Zielgenen [41].

Es sind mittlerweile über 100 genetische Antworten nach Stimulation mit TGF- β in verschiedenen Zellen bekannt. Für die Interaktion mit der DNA ist insbesondere die MH1-Domäne von SMAD4 verantwortlich. Über die MH2-Region findet neben der Kommunikation mit T β RI die Interaktion mit weiteren SMADs, Transkriptionsfaktoren und Koaktivatoren statt [36, 41].

Die Regulation der einzelnen Schritte der SMAD-Signalkaskade und die Interaktion mit anderen Signalkaskaden sind aktuell Bestandteil der Arbeit vieler Forschungsgruppen und werden an dieser Stelle nicht weiter detailliert aufgeschlüsselt.

2.3.3 Biologische Funktionen

Die Aufgaben von TGF- β im menschlichen Organismus sind vielfältig. Die drei bedeutendsten Effekte sind die Wachstumsinhibierung verschiedener Zellreihen, die Stimulation der Produktion von extrazellulären Matrixproteinen und die Immunsuppression bzw. -modulation.

Ein Schwerpunkt der bisherigen Forschung ist die Wachstumshemmung von epithelialen, endothelialen, hämatopoetischen und neuralen Zellen in der G1-Phase des Zellzyklus [42]. Darüber hinaus kann TGF- β auch die Apoptose von Zellen induzieren [43]. Aufgrund der tumorsuppressiven Eigenschaften ist es nicht überraschend, dass in Zellen aus Pankreas- und Kolonkarzinomen Mutationen gefunden wurden, die die TGF- β -Signaltransduktion betreffen. Diese Mutationen zeigten sich sowohl auf Rezeptorebene als auch auf der Ebene der SMAD-Proteine [44].

Die Hauptfunktion von TGF- β im Immunsystem ist die Aufrechterhaltung einer immunologischen Toleranz durch Regulation von Proliferation, Differenzierung und Überleben der Lymphozyten. Da TGF- β als ein wichtiger Faktor in der Regulation des Immunsystems betrachtet wird, ist die Untersuchung seiner Wirkung auf die verschiedenen Zellreihen des Immunsystems Bestandteil der Arbeit vieler Forschungsgruppen. Li et al. haben 2006 die bisher bekannten Wirkmechanismen in einer Übersichtsarbeit zusammengefasst [45]. TGF- β wirkt demnach durch eine SMAD3-vermittelte Blockade der

Interleukin-2 (IL-2)-Transkription hemmend auf die Proliferation von T-Zellen und spielt unabhängig davon auch eine Rolle bei der Differenzierung von T-Zellen und ihren Funktionen. Auf B-Zellen wirkt TGF- β ebenfalls modulierend, wobei u. a. die Proliferation von B-Zellen gehemmt wird [46]. Natürliche Killerzellen werden in ihrer zytolytischen Aktivität und der IFN- γ -Produktion abgeschwächt [47]. Die modulierende Wirkung von TGF- β lässt sich am Beispiel der Makrophagen besonders gut verdeutlichen. Während ruhende Makrophagen stimuliert werden, werden aktivierte Makrophagen gehemmt [48]. Die Funktion von TGF- β im Immunsystem ist somit komplex und nach wie vor im Detail nicht komplett entschlüsselt. Insbesondere durch die Bedeutung bei der Lymphozytenregulation scheint TGF- β eine kritische Rolle bei der Entwicklung verschiedener Autoimmunerkrankungen zu spielen [45, 49, 50].

Die Stimulation der extrazellulären Matrixproduktion ist eine herausragende Funktion von TGF- β . Sie erfolgt auf mehreren Ebenen. Zum einen stimuliert TGF- β direkt die Produktion von Kollagenen, Fibronectin und Proteoglykanen in Fibroblasten, Myoblasten und verschiedenen Epithelzellen. Zum anderen kommt es zur vermehrten Bildung von Integrinen, die bei der Vernetzung der ECM wichtig sind, zur verminderten Bildung von Proteasen, die Matrixproteine abbauen, und zur Stimulation von Proteaseinhibitoren wie PAI-1 [51, 52]. Border et al. konnten zeigen, dass es in Mesangiumzellen unter Einwirkung von TGF- β zur vermehrten Produktion von Proteoglykanen kommt [53].

2.3.4 Die Rolle von TGF- β bei der Entwicklung einer CAN/CAI

Im Verlauf von chronischen Nierenerkrankungen kommt es zur pathologischen Akkumulation von extrazellulärer Matrix und zur Fibrosierung der Niere. TGF- β wird dabei neben weiteren Faktoren eine zentrale Rolle zugesprochen [54]. In vitro wurde nachgewiesen, dass TGF- β als Einzelfaktor Mesangiumzellen und interstitielle Fibroblasten stimulieren sowie Epithelzellen zur Transformation in Myofibroblasten anregen kann (EMT: Epithelial-to-Mesenchymal Transdifferentiation) [54, 55]. Daneben scheinen durch TGF- β ausgelöste Apoptosevorgänge mitverantwortlich zu sein. Durch diese Prozesse kommt es zur tubulointerstitiellen Fibrose und Glomerulosklerose mit einem letztendlich resultierenden Nephronenuntergang [55].

Der nahe liegende Verdacht, dass TGF- β auch eine wesentliche Rolle bei der Entwicklung einer chronischen Transplantatnephropathie (CAN/CAI) spielt, konnte in zahlrei-

chen Studien untermauert werden. Sharma et al. fanden 1996 eine signifikante Erhöhung der TGF- β -mRNA in Nierenbiopsien von Patienten, die eine chronische Transplantatnephropathie entwickelt hatten [56]. Harris et al. fanden 2007 eine signifikante Korrelation zwischen erhöhten TGF- β -Plasmaspiegeln in den ersten zwei Jahren nach erfolgter Transplantation und der Entwicklung einer CAN [57].

2.4 Immunsuppressive Therapie nach Nierentransplantation

2.4.1 Übersicht

In der immunsuppressiven Erhaltungstherapie nach Nierentransplantation kommen im Wesentlichen vier Wirkstoffklassen zum Einsatz.

Die erste Klasse bilden die Glukokortikoide, die ihre immunsuppressive Wirkung über mehrere Mechanismen entfalten, in dem sie nach erfolgter Penetration durch die Zellmembran und Bindung an zytoplasmatische Rezeptoren mit spezifischen DNA-Sequenzen interagieren. Sie üben ihre Wirkung auf viele verschiedene Zellen aus, unter anderem auf Makrophagen, T-Zellen und Endothelzellen [58].

Die zweite Klasse besteht aus den antiproliferativen Substanzen Azathioprin und Mycophenolsäure (MPA). Das seit 1962 eingesetzte Azathioprin spielt heute bei Neueinleitung einer immunsuppressiven Therapie nach Nierentransplantation praktisch keine Rolle mehr. Die Hauptwirkung von MPA beruht auf einer Hemmung der Inosinmonophosphat-Dehydrogenase, einem Schlüsselenzym der de novo-Purin-Biosynthese, wodurch die Synthese von Guanosinmonophosphat (GMP) inhibiert wird. Da der "salvage pathway" zur Produktion von Purinbasen aus den Abbauprodukten derselben in Lymphozyten praktisch nicht zur Verfügung steht, kommt es zu einem Mangel an GMP und damit durch Inhibition der RNA- und DNA-Synthese zur antiproliferativen Wirkung auf Lymphozyten [59].

Die dritte Klasse bilden die Calcineurin-Inhibitoren mit ihren Prototypen Cyclosporin A und Tacrolimus, auf die in Kapitel 2.4.2 gesondert eingegangen wird.

Das zuerst eingeführte Präparat der vierten Wirkstoffklasse, der mTOR-Inhibitoren, ist Sirolimus, auch Rapamycin genannt, das seit 2001 als Immunsuppressivum für die Nierentransplantation zugelassen ist. Inzwischen ist auch Everolimus zur Prophylaxe von Abstoßungsreaktionen nach Nierentransplantation zugelassen. Die Vertreter dieser Klasse binden an das Immunophilin FK-Binding Protein (FKBP). Der entstandene Kom-

plex bindet an das zytoplasmatische Protein mTOR (mammalian target of rapamycin) und unterbindet dadurch die T-Zell-Stimulation durch IL-2. Es kommt zum Verharren der T-Lymphozyten in der späten G1-Phase des Zellzyklus [60, 61].

In der Induktionstherapie (Verhinderung der akuten Rejektion perioperativ) werden darüber hinaus depletierende und nicht-depletierende mono- und polyklonale Antikörper gegen Lymphozyten und deren Rezeptoren eingesetzt.

2.4.2 Calcineurin-Inhibitoren (CNI)

Ca. 90 % aller nierentransplantierten Patienten werden im Rahmen der immunsuppressiven Erhaltungstherapie mit einem Calcineurininhibitor behandelt. Der zuerst entdeckte Prototyp dieser Substanzklasse ist das Cyclosporin A. Es ist ein lipophiles Polypeptidantibiotikum, das von dem Pilz *Tolypocladium inflatum* Gams gebildet wird. Das in den frühen 80er Jahren eingeführte Cyclosporin A wurde schnell zur Standardmedikation und zeigte bereits 1992 eine Verbesserung der 5-Jahres-Transplantatüberlebensrate um über 10 % [62]. Auf das 1984 entdeckte und seit 1994 in der Transplantationsmedizin zugelassene Tacrolimus wird in Kapitel 2.4.3 gesondert eingegangen.

Die Präferenz für Tacrolimus oder Cyclosporin A ist regional unterschiedlich, wobei insbesondere in den USA der Anteil an Patienten, die initial mit Tacrolimus behandelt werden, von 1994 bis 2011 von 6,7 % auf 86 % angestiegen ist (Tabelle 3).

	USA (2011)	Australien (2007)	Neuseeland (2007)
Cyclosporin A	3 %	48 %	74 %
Tacrolimus	86 %	49 %	26 %

Tabelle 3: Darstellung des Anteils an Patienten, die in der Initialtherapie nach erfolgter Nierentransplantation mit Cyclosporin A oder Tacrolimus behandelt wurden [63, 64].

2.4.2.1 Calcium-Calmodulin-Calcineurin-NFAT-Signalkaskade

Im Rahmen der Abstoßungsreaktion gegen ein Transplantat kommt es zur antigenspezifischen Aktivierung von T-Lymphozyten über den T-Zell-Rezeptor, wodurch unter anderem die Phospholipase C aktiviert wird (Abbildung 3). Eine Kostimulation über den Rezeptor CD28 unterstützt diesen Prozess [65]. Die Phospholipase C bildet aus Phosphatidylinositol-4,5-Diphosphat (PIP₂) die Sekundärbotenstoffe Diacylglycerol (DAG) und Inositol-1,4,5-Triphosphat (IP₃). Die Bindung von IP₃ an spezifische Rezeptoren am Endoplasmatischen Retikulum führt zur Entleerung der intrazellulären Kalziumspeicher ins Zytosol. Die Erhöhung der zytoplasmatischen Kalziumkonzentration bewirkt, dass zusätzlich Kalzium-abhängige transmembranäre Kalziumkanäle (CRAC: Ca²⁺ release activated Ca²⁺ channel) geöffnet werden und die intrazelluläre Kalziumkonzentration weiter steigt [66, 67].

Aufgrund der erhöhten Kalziumkonzentration kommt es zur Anlagerung von Kalziumionen an Calmodulin, das dadurch eine Konformationsänderung erfährt. Das veränderte Calmodulin bindet an die Serin-Threonin-Phosphatase Calcineurin (CN). Das so aktivierte Calcineurin dephosphoryliert den Transkriptionsfaktor NFAT (nuclear factor of activated T-cells), der dann in den Zellkern transloziert und die Transkription spezifischer Gene ermöglicht. Calcineurin ist das Schlüsselenzym dieser Signalkaskade. Die Inhibition dieses Enzyms verhindert die T-Zellaktivierung [68].

NFAT spielt bei der Regulation der Expression vieler immunregulatorischer Gene eine Rolle. Eine besondere Bedeutung kommt dabei der Initiierung der IL-2-Transkription zu. Die de novo-Synthese des Zytokins IL-2 bildet das schnellste Ergebnis einer effektiven T-Zellaktivierung nach antigenspezifischer Stimulation. IL-2 ist ein essentieller Faktor für T-Zell-abhängige Prozesse wie Proliferation, Differenzierung, Apoptose und Toleranz [69].

2.4.2.2 Wirkmechanismus der Calcineurin-Inhibitoren

Trotz ihrer strukturellen Unterschiede bewirken sowohl Cyclosporin A als auch Tacrolimus eine Unterbrechung der zuvor beschriebenen Signaltransduktion (Abbildung 3). Beide gehen Komplexe mit je einem Immunophilin ein und binden dadurch hochaffin an Calcineurin. Cyclosporin bindet an Cyclophilin (Cyp), Tacrolimus an das FK 506 bindende Protein (FKBP). Durch diese Bindung wird Calcineurin sterisch blockiert und ist nicht mehr in der Lage, seine Substrate zu dephosphorylieren. Bei den Immunophilinen handelt es sich um Peptidyl-Prolin-cis-trans-Isomerasen (PPIasen) [68, 70].

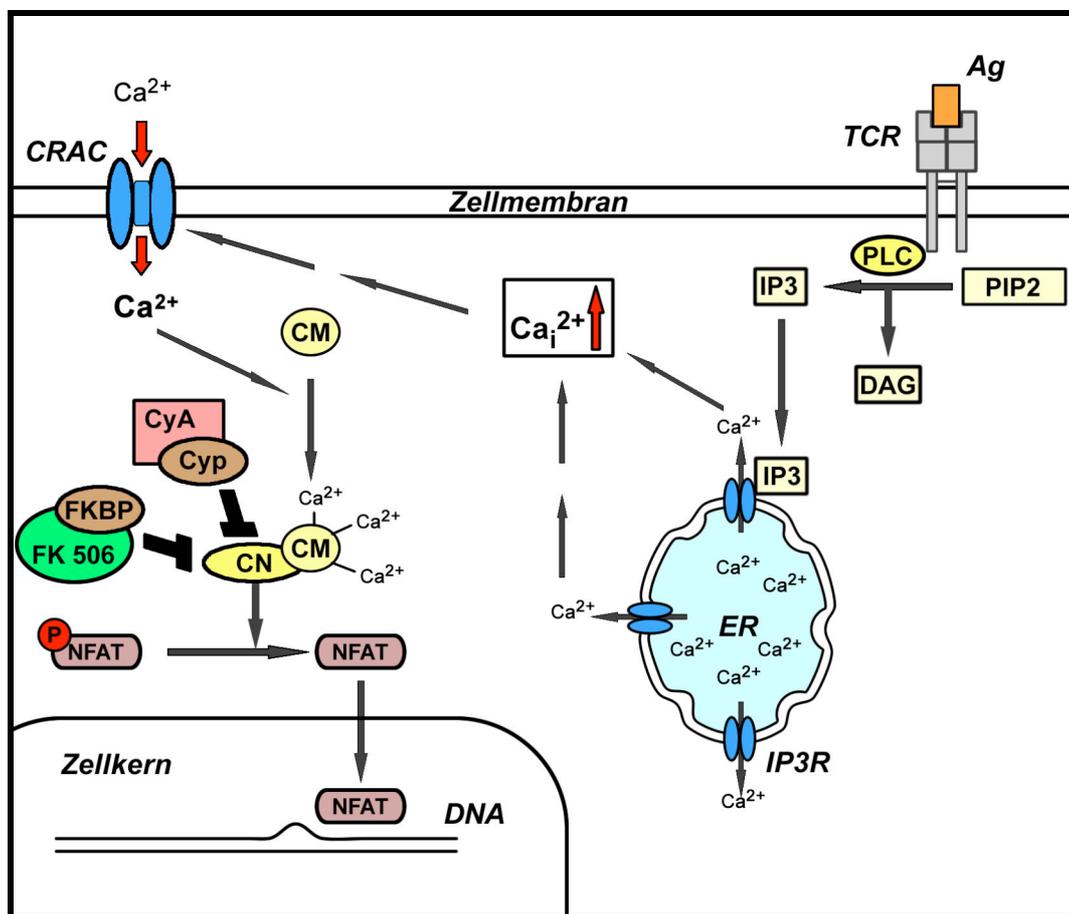


Abbildung 3: Wirkmechanismus der Calcineurin-Inhibitoren über Hemmung von Calcineurin (CN) als Schlüsselenzym der antigenspezifischen T-Zellaktivierung. FK 506 (Tacrolimus) bildet einen Komplex mit dem FK-Binding Protein (FKBP) und Cyclosporin A (CyA) mit Cyclophilin (Cyp). Durch Blockierung der Phosphatase CN bewirken die Calcineurin-Inhibitoren, dass der Transkriptionsfaktor NFAT nicht dephosphoryliert wird und damit nicht in den Zellkern translozieren kann. Die durch eine Antigen (Ag)-spezifische T-Zellaktivierung über den T-Zell-Rezeptor (TCR) ausgelöste Signalkaskade mit Erhöhung der intrazellulären Kalziumkonzentration und Aktivierung von CN über Calmodulin (CM) wird somit unterbrochen [68].

2.4.3 Tacrolimus / FK 506

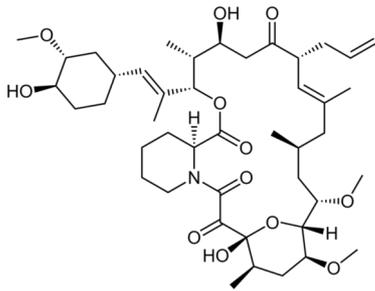


Abbildung 4: Strukturformel Tacrolimus

Tacrolimus ist ein 23-gliedriges Makrolidantibiotikum, das erstmals 1984 in Japan aus dem Pilzstamm *Streptomyces tsukabaensis* isoliert wurde. Durch seinen oben beschriebenen Wirkmechanismus ist es ein potentes Immunsuppressivum, das seit 1994 in der Transplantationsmedizin zugelassen ist, aber auch bei der Behandlung von Autoimmunerkrankungen eingesetzt wird. Aufgrund seiner lipophilen Eigenschaften mit nahezu nicht vorhandener Wasserlöslichkeit ist die orale Absorption niedrig, und die orale Bioverfügbarkeit variiert zwischen 5 % und 95 %. Tacrolimus wird über das Cytochrom P 450-System der Leber metabolisiert und besitzt ca. 15 Metabolite, wobei insbesondere M-II eine noch nahezu identische pharmakologische Aktivität aufweist. Da Tacrolimus im Blut an Erythrozyten bindet, liegen gemessene Vollblutkonzentrationen ca. 20fach über der Plasmakonzentration. Die Ausscheidung von Tacrolimus und seiner Metabolite erfolgt zu über 90 % biliär. Aufgrund dieser pharmakologischen Eigenschaften ist zum einen ein Monitoring der Medikamentenspiegel unerlässlich und zum anderen eine Dosisanpassung bei gleichzeitiger Gabe von Medikamenten, die über das Cytochrom P 450-System metabolisiert werden, notwendig [71, 72, 73].

Im Rahmen von Medikamentenspiegelkontrollen hat sich eine gute Korrelation zwischen Talspiegel, Effektivität und Toxizität gezeigt [73]. Deshalb werden im klinischen Alltag die Talspiegel bestimmt. In einer bereits 1996 von Laskow et al. veröffentlichten Studie wurde nachgewiesen, dass der optimale Vollblutspiegel in Bezug auf Wirksamkeit und auftretende Nebenwirkungen zwischen 5-15 ng/ml liegt [74]. Da die Nebenwirkungen meist dosisabhängig auftreten, wird nach der Initialtherapie eine Dosisreduktion mit Zielspiegeln von 5-8 ng/ml angestrebt.

Wichtige Nebenwirkungen sind neben der Nephrotoxizität u.a. die Entwicklung eines Diabetes mellitus, das Auftreten eines arteriellen Hypertonus, neurologische Symptome wie Tremor und Schlaflosigkeit, gastrointestinale Symptome wie Diarrhö und Übelkeit, Elektrolytstörungen wie Hyperkaliämie und Hypomagnesiämie sowie Haarausfall und Juckreiz [72].

2.4.4 Die Rolle von Tacrolimus bei der Entwicklung einer CAN/CAI

Durch die Einführung des Cyclosporin A als Prototyp der Calcineurin-Inhibitoren konnte wie vorbeschrieben eine drastische Senkung der Rate an akuten Rejektionen erreicht werden. In der Folge zeigten sich aber auch erhebliche mit der Therapie einhergehende Nebenwirkungen wie zum Beispiel die akute und die chronische Nephrotoxizität. Die akute Nephrotoxizität ist prinzipiell beherrschbar, da sie funktionell, dosisabhängig und reversibel ist. Die chronische, irreversible Nephrotoxizität mit sichtbaren pathologischen Veränderungen wurde sowohl in Transplantatnieren als auch in den Eigennieren von Herz-, Lungen- [75] oder Leber- transplantierten Patienten beschrieben [76]. Die primär unter Cyclosporin A-Therapie entdeckten histologischen Veränderungen konnten im Verlauf auch bei Patienten nachgewiesen werden, die mit Tacrolimus behandelt wurden [32], so dass der Begriff CNI-Nephrotoxizität geprägt wurde. Die typischen histopathologischen Veränderungen der chronischen CNI-Nephrotoxizität sind Arteriohyalinose, Tubulusatrophie mit streifenförmiger interstitieller Fibrose und Glomerulosklerose [24, 77, 78].

Die Behandlung mit Tacrolimus stellt somit einen eigenständigen Risikofaktor für die Entwicklung einer chronischen Transplantatnierenschädigung dar. Aufgrund dieser potentiell nephrotoxischen Eigenschaft werden die Calcineurin-Inhibitoren auch als Achillesferse der modernen immunsuppressiven Therapie bezeichnet [77].

3 Herleitung der Aufgabenstellung

Die Calcineurin-Inhibitoren Cyclosporin A und Tacrolimus sind trotz der Entwicklung neuerer Immunsuppressiva weiterhin fester Bestandteil der immunsuppressiven Erhaltungstherapie bei ca. 90 % aller nierentransplantierten Patienten (Tabelle 3). Die akute Abstoßungsreaktion nach Nierentransplantation ist heute relativ gut beherrschbar (Kapitel 2.1.5.3). Unzureichend beherrscht ist dagegen die Entwicklung einer chronischen Transplantatschädigung, weshalb sich das Langzeit-Transplantatüberleben nicht entsprechend verbessert hat. Die Therapie mit Calcineurin-Inhibitoren ist ein unabhängiger Risikofaktor für die Entwicklung einer chronischen Transplantatschädigung. Der Begriff CNI-Nephrotoxizität / -Nephropathie umschreibt die im Zusammenhang mit der Gabe von Calcineurin-Inhibitoren zu beobachtenden histopathologischen Veränderungen (Kapitel 2.4.4).

Im Verlauf der chronischen Transplantatschädigung kommt es zu einer Veränderung der Zusammensetzung der extrazellulären Matrix der Niere und letztendlich zu einer Fibrosierung des Organs (Kapitel 2.2.3). TGF- β beeinflusst die Zusammensetzung der extrazellulären Matrix auf verschiedenen Ebenen entscheidend und hat insgesamt eine profibrotische Wirkung (Kapitel 2.3.3). Dementsprechend spielt TGF- β eine wichtige Rolle bei der Entwicklung einer chronischen Transplantatnephropathie (Kapitel 2.3.4).

Die vermehrte Synthese von TGF- β unter Cyclosporin A-Einwirkung konnte bereits an T-Zellen [79], proximalen Tubuluszellen und tubulointerstitiellen Fibroblasten nachgewiesen werden [80]. Mesangiumzellen sind auf der einen Seite in der Lage, TGF- β zu produzieren [81]. Auf der anderen Seite produzieren Mesangiumzellen unter TGF- β -Einwirkung vermehrt extrazelluläre Matrixproteine [53]. Waiser et al. zeigten, dass es unter der Einwirkung von Cyclosporin A sowohl zu einer vermehrten Produktion von TGF- β als auch zu einer vermehrten Expression seiner Rezeptoren T β RI und T β RII in der Mesangiumzelle kommt [82]. Am Tiermodell wurde nachgewiesen, dass es unter der Behandlung mit Tacrolimus zu einem deutlichen Anstieg der TGF- β -Produktion in der Niere kommt [83]. Khanna et al. beobachteten bei nierentransplantierten Patienten mit der histologischen Diagnose einer CNI-Nephrotoxizität eine erhöhte mRNA-Expression von TGF- β und anderen profibrotischen Faktoren [84].

Daraus ergab sich das Ziel dieser Arbeit, die Pathogenese der Entwicklung einer chronischen Transplantatschädigung unter immunsuppressiver Erhaltungstherapie mit Tacrolimus weiter zu untersuchen. Im Einzelnen sollten folgende Fragen beantwortet werden:

1. Kommt es unter der Einwirkung von Tacrolimus zur vermehrten Produktion von TGF- β in der Mesangiumzelle?
2. Kommt es unter der Einwirkung von Tacrolimus zur vermehrten Expression der TGF- β -Rezeptoren T β RI und T β RII in der Mesangiumzelle?

4 Materialien

4.1 Zellen, Materialien und Nährmedien für die Zellkultur

- Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) - 3,7 g/l NaHCO₃, 1 g/l D-Glukose, w/o L-Glutamin (Biochrom, Berlin, Deutschland-DE)
- Fetal Calf Serum (FCS) (Biochrom)
- Glutamin (Biochrom)
- Hungermedium: 500 ml DMEM + 5 ml Penicillin + 5 ml Glutamin
- PBS - Phosphat Buffer Saline (Biochrom)
- Trypsin - 2,5 % in PBS gelöst (Biochrom)
- Mesangiumzellkulturen aus Nierenglomeruli von ausgewachsenen Sprague-Dawley-Ratten (Tierzucht Schönwalde, Berlin, DE)
- Vollmedium: 500 ml DMEM + 50 ml FCS (10 %) + 5 ml Penicillin + 5 ml Glutamin

4.2 Geräte

- Abzug Laminair HB 2448 (Heto-Holten, Kopenhagen, Dänemark-DK)
- Brutschrank Cell House 200 (Heto-Holten)
- Digitalkamera Kodak DC 40 (Kodak, Rochester, Vereinigte Staaten von Amerika-USA)
- Elektrophoresekammer Minnie Horizontal Submarine Unit HE 33 (Hoefer/Amersham, Little Chalfont, Großbritannien-GB)
- ELISA-Auslesegerät MRX-Microplate Reader (Dynatech, Billingham, GB)
- Image Scanner (Amersham)
- Lichtmikroskop (Leica, Bensheim, DE)
- PCR-Gerät T3-Thermocycler (Biometra, Göttingen, DE)
- Spannungsgeber Electrophoresis Power Supply EPS200/300/3500 (Amersham)
- Thermoschüttler Thermomixer compact (Eppendorf, Hamburg, DE)
- Tischzentrifuge Biofuge (Heraeus, Hanau, DE)
- Transferkassette TE Series Transpher Electrophoresis Unit (Hoefer/Amersham)
- Neubauer-Zählkammer (Fein-Optik, Bad Blankenburg, DE)
- UV-Spektograph Macro Vue (Hoefer/Amersham)
- Vakuumzentrifuge Power Heater UNIVAPO 100 H (UNIEQUIP, Martinsried, DE)

- Vortexmixer G560-E (Scientific Industries, Bohemia, New York, USA)
- Wasserbad Master Shake COMFORT (Heto-Holten)
- Zentrifuge Makrofuge (Heraeus)

4.3 Computerprogramme

- 1D Image Analysis Software Kodak Digital Science (Kodak)
- Adobe Photoshop 5.0 (Adobe, Uppsala, Schweden-S)
- ELISA Software Biolinx Assay Management Software Version 2.20 (Biolinx, Frankfurt, DE)
- Scanner-Software Image Master Version 1.0 Totallab (Amersham)
- SPSS Version 17.0 für Windows (SPSS Inc., Chicago, USA)

4.4 Glas- und Plastikwaren

- 21G Einmalkanülen (Terumo/Neolus, Leuven, Belgien-B)
- 96 Well-Mikrotiterplatte U96 Maxisorp Immuno-Platte (Nunc, Wiesbaden, DE)
- Pipetten (Eppendorf, Hamburg, DE)
- Pipettenspitzen (Eppendorf)
- Sterile Pipetten 1, 2, 5, 10 und 25 ml (Falcon, Franklin Lakes, USA)
- Zellkulturflaschen (Nunc)
- Zentrifugenröhrchen 15 und 50 ml (Falcon)
- Zentrifugenröhrchen 1, 2 und 5 ml (Eppendorf)

4.5 Fertigprodukte und Wirkstoffe

- Bicinchoninic acid assay (BCA) Protein Assay Kit (Pierce / Thermo Scientific, Rockford, USA)
- ECL-System (Amersham)
- ELISA-Duo Set[®] (R&D Systems, Wiesbaden, DE)
- FK 506 / Tacrolimus (Fujisawa GmbH, München, DE)
- Filme - Lumi-Film Chemiluminescent Detection Film (Roche, Mannheim, DE)
- GeneAmp RNA PCR Kit[®] (Perkin Elmer, Branchburg, USA)
- Insulin Actrapid (NovoNordisk, Kopenhagen, DK)
- Penicillin / Streptomycin (Biochrom)

- PVDF-Membran Immobilon-P-membrane (Serva, Heidelberg, DE)
- Qiaquick Gel Extraction Kit® (Quiagen, Hilden, DE)
- Riboprobe T7 system Kit® (Promega, Madison, USA)

4.6 Lösungen und Puffer

- Acrylamid - Rotiphorese Gel A 3037.1 (Roth, Karlsruhe, DE)
- BCA Reagenz A aus dem BCA Protein Assay Kit (Pierce / Thermo Scientific)
- BCA Reagenz B aus dem BCA Protein Assay Kit (Pierce / Thermo Scientific)
- Bisacrylamid - Rotiphorese Gel B 3039.1 (Roth)
- DBS 1,4 % (delipidized bovine serum 1,4 %) Opticlear (Biocell Laboratories, Rancho Dominguez, USA)
- DEPC-H₂O: 0,5 ml Diethylpyrocarbonat + 500 ml destilliertes Wasser
- Entwickler Readymatic Dental Developer and Replenisher KP 93247-B (Kodak)
- Fixierer Readymatic Dental Fixer and Replenisher KP 93248-B (Kodak)
- Phosphat Buffer Saline (PBS) Dulbecco w/o Ca²⁺ und Mg²⁺ (Biochrom)
- PCR-Puffer (10x) aus dem GeneAmp RNA PCR Kit® (Perkin Elmer)
- Ponceau S-Lösung: 1 ml Essigsäure + 0,5 g Ponceau S + 100 ml destilliertes Wasser
- Puffer PE, Q6 und QG aus dem Qiaquick Gel Extraction Kit® (Quiagen)
- Stopplösung (ELISA) - 2 NH₂SO₄ aus dem ELISA-Duo Set® (R&D Systems)
- Streptavidin-HRP (streptavidin conjugated to horseradish-peroxidase) Nr. 890803 aus dem ELISA-Duo Set® (R&D Systems)
- Substratlösung (ELISA): 1:1 Mischung aus dem Farbreagenz A (H₂O₂) und dem Farbreagenz B (Tetramethylbenzidin) aus dem ELISA-Duo Set® (R&D Systems) oder als Alternative: Peroxidase Substrate TMB Microwell (KPL, Guilford, GB)
- TBST: 0,1 % Tween 20 auf 500 ml tris buffered saline (TBS)-Puffer
- Transcription optimized 5fach Puffer aus dem Riboprobe T7 system Kit® (Promega)
- Trizol® (Life Technologies, Karlsruhe, DE)
- Western Blot-4xTris / sodium dodecylsulfate (SDS) pH 8,8: 18,2 g Tris-Base + 50 ml destilliertes Wasser mit 1 N HCl auf pH 8,8 justieren und anschließend auf 100 ml mit destilliertem Wasser auffüllen und 0,4 g SDS hinzugeben

- Western Blot-4xTris / SDS pH 6,8: 6,05 g Tris-Base + 40 ml destilliertes Wasser mit 1 N HCl auf pH 6,8 justieren und anschließend auf 100 ml mit destilliertem Wasser auffüllen und 0,4 g SDS hinzugeben
- Western Blot-Blockpuffer: 0,4 l TBS-Puffer, 0,5 ml Tween 20 (0,1 % v/v), 25 g Milchpulver und Auffüllen mit TBS-Puffer zu insgesamt 0,5 l
- Western Blot-Elektrophoresepuffer 5xSDS: 15,1 g Tris-Base, 72 g Glycine, 5 g SDS auf 1000 ml mit destilliertem Wasser auffüllen
- Western Blot-Lysispuffer: 50 mM Tris-Cl (pH 8.0), 150 mM NaCl, 100 µg PMSF/ml, 30 µl Aprotinin/ml, 1 % Triton X-100
- Western Blot-Probenpuffer 2xSDS: 250 mM (0,6 g) Tris-Cl (pH 6,8), 4 % SDS (0,8 g), 20 % Glycerin (4 g), 2 mM Ethylendiamintetraacetat (EDTA)-Lsg., 40 mM Dithiothreitol (DTT) und Bromphenolblau mit destilliertem Wasser auf 20 ml auffüllen
- Western Blot-Probenpuffer 6xSDS: 7 ml 4xTris / SDS pH 6,8, 3 ml Glycerol (bzw. 3,8 g), 1 g 1xSDS (1 %), 0,93 g DTT (0,5 M), 1,2 mg Bromphenolblau auf 10 ml mit destilliertem Wasser auffüllen
- Western Blot-TBS-Puffer 5xTBS: 79 g Tris-Cl + 900 ml destilliertes Wasser auf pH 7,5 justieren und anschließend Zugabe von 45 g NaCl und Auffüllen mit destilliertem Wasser auf 1000 ml
- Western Blot-Transferpuffer: 3 g Tris-Base, 14,42 g Glycine und 150 ml Methanol mit destilliertem Wasser auf 1 Liter auffüllen und pH-Justierung auf pH 8,3-8,4

4.7 Chemikalien

- Agarose (ICN Biochemicals, Aurora, USA)
- Ammoniumperoxodisulfat (APS) (Roth)
- Bromphenol-Blau B-5525 (Sigma chemical Co., St. Louis, USA)
- Chloroform (Merck, Darmstadt, DE)
- Dithiothreitol (DTT) D-0632 (Sigma chemical Co.)
- Diethylpyrocarbonat (Sigma chemical Co.)
- Essigsäure (J.T. Baker, Deventer, Niederlande-NL)
- Ethanol (J.T. Baker)
- Ethidiumbromid (Sigma chemical Co.)
- Glycerol - ACG Reagent (Sigma chemical Co.)

- Glycine (Roth)
- HCl (Merck)
- 2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure (HEPES) (Serva)
- HPLC-H₂O - Baker HPLC analyzed Water (J.T. Baker)
- Isobutylalkohol (Sigma chemical Co.)
- Isopropanol (J.T. Baker)
- Methanol (J.T. Baker)
- Magnesiumchlorid 25 mM aus dem GeneAmp[®] RNA PCR Kit (Perkin Elmer)
- Milchpulver (non fat dry milk 5 % w/v) Skim Milk Powder Pasteurized (ICN Biochemicals)
- NaCl (Merck)
- NaOH (Merck)
- N,N,N,N-Tetramethylethylendiamin (TEMED) plus one (Amersham)
- Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF) (ICN Biomedicals)
- Ponceau S (Serva)
- Sodium Dodecyl Sulfat-C₁₂H₂₅NaO₄S (SDS) ultrapure (Roth)
- Sucrose 5 % - Sucrose Ultrapure (ICN Biomedicals)
- Tris-Base - Tris-(hydroxy)-aminoethan (Merck)
- Tris-Cl - Tris-(hydroxymethyl)-aminomethanhydroxychlorid (Merck)
- Triton X-100 - C₁₄H₂₂O(C₂H₄O)_n (Boehringer, Mannheim, DE)
- Tween 20 - Polyoxyethylen(20)-sorbitan-monolaurat (Serva)

4.8 Primer, Enzyme, Substrate

- Ampli-Taq-Gold[®]-Polymerase (Perkin Elmer)
- ATP, CTP, GTP und UTP aus dem Riboprobe T7 system[®] (Promega)
- dNTP aus dem GeneAmp RNA PCR Kit[®] (Perkin Elmer)
- MULV Reverse Transkriptase aus dem GeneAmp RNA PCR Kit[®] (Perkin Elmer)
- Random-Hexamer-Primer aus dem GeneAmp RNA PCR Kit[®] (Perkin Elmer)
- Ribonukleaseinhibitor Recombinant RNasin[®] aus dem Riboprobe T7 system[®] (Promega)
- RNase-Inhibitor aus dem GeneAmp RNA PCR Kit[®] (Perkin Elmer)
- T7 RNA-Polymerase aus dem Riboprobe T7 system Kit[®] (Promega)

- Sense und Antisense-Primer (TIB MOLBIOL, Berlin, DE):

Primer		Artikelnummer
TGF- β 1	T7-s	102085
TGF- β 1	T7-as	102086
TGF- β 1	s	153568
TGF- β 1	as	153569
GAPDH	T7-s	106478
GAPDH	T7-as	106480
GAPDH	s	170151
GAPDH	as	170152
T β RI	T7-s	73116
T β RI	T7-as	72360
T β RI	s	162384
T β RI	as	162385
T β RII	T7-s	72963
T β RII	T7-as	72362
T β RII	s	158505
T β RII	as	158506

4.9 Antikörper, Antigene, Marker, Markerleitern und Proteine

- 1. Antikörper T β R1 sc-9048 (Santa Cruz, Heidelberg, DE)
- 1. Antikörper T β R2 sc-220 / sc-400 (Santa Cruz)
- 2. Antikörper T β R1/T β R2 sc-2030 (Santa Cruz)
- 100bp-Leiter (Rapidozym, Berlin, DE)
- Albumin als Albumin-Standard aus dem BCA Protein Assay Kit (Pierce / Thermo Scientific) oder alternativ als Albumin, Bovine A-6003 (Sigma chemical Co.)
- Aprotinin A-6279 (Sigma chemical Co.)
- Capture-Ak Nr. 840116 aus dem ELISA-Duo Set[®] (R&D Systems)
- Detection-Ak Nr. 840117 aus dem ELISA-Duo Set[®] (R&D Systems)
- ECL (Elektrochemische Lumineszenz)-Marker sc-2035 (Santa Cruz)
- Positivkontrolle T β RII sc-4122 WB (Santa Cruz)
- Rainbow-Marker (Amersham)
- Standard (rekombinantes humanes TGF- β 1) Nr. 840118 aus dem ELISA-Duo Set[®] (R&D Systems)

5 Methoden

5.1 Mesangiumzellkultur

Die Mesangiumzellkultur ist eine etablierte Methode im nephrologischen Forschungslabor der Charité, Campus Mitte. Glomeruli von ausgewachsenen Sprague-Dawley-Ratten wurden nach einem standardisierten Verfahren durch Zerkleinerung der Nierenrinde und mehrfaches Sieben mit unterschiedlicher Porengröße isoliert und anschließend mit bakteriellen Kollagenasen inkubiert, wodurch die Epithelzellen zerstört wurden. Die aus Endothel- und Mesangiumzellen bestehenden Kulturen wurden anschließend in einem Nährmedium (DMEM + 10 % FCS + 100 µg/ml Streptomycin + 2 mM L-Glutamin + 0,2 IU/ml Insulin) inkubiert, in dem es zum Anwachsen von Mesangiumzellen kam. Nach mehreren Zellpassagen resultierte eine reine Mesangiumzellkultur. Zur Beurteilung der Zellen wurden sowohl morphologische als auch immunhistochemische Kriterien angewendet. Die Zellen wurden nach Waschen und vorsichtigem Kühlen auf -80 °C in Flüssigstickstoff zur weiteren Verwendung dauerhaft gelagert [82, 85, 86]. Für die Untersuchungen in der vorliegenden Arbeit wurden Zellreihen von bereits im Labor etablierten Zellkulturen verwendet.

5.1.1 Kultivierung und Passagieren der Mesangiumzellen

Die Mesangiumzellen wurden in Zellkulturflaschen mit 20 ml Vollmedium bei 37 °C und 5 % CO₂-Gehalt inkubiert. Es fand eine regelmäßige Beurteilung hinsichtlich morphologischer Kriterien und alle drei Tage ein Vollmediumwechsel statt. Für die Passagierung wurde der Überstand abpipettiert. Danach fand ein Waschschrift unter Zugabe von 10 ml PBS und vorsichtigem Schwenken statt. Nach erneuter Abnahme des Überstandes wurden 2 ml Trypsinlösung zugegeben, was zur Ablösung der Zellen vom Untergrund führte. Nach fünfminütigem Zentrifugieren der in 8 ml Vollmedium aufgenommenen Zellen bei 1200 U/min und 4 °C wurde der Überstand verworfen und 10 ml frisches Vollmedium zugegeben. Nach Resuspension der Zellen erfolgte die Bestimmung der Zellzahl durch Auszählung mit der Neubauer-Zählkammer. Für die Fortführung der Zellkultur wurden jeweils 2×10^6 Zellen in zwei Zellkulturflaschen gegeben und mit Vollmedium auf je 20 ml aufgefüllt [82].

5.1.2 Versuchsbedingungen und Durchführung

Für die Versuche wurden Zellen zwischen der 7. und 13. Passage verwendet. Nach erfolgter Auszählung wurden in vier Kulturflaschen jeweils $1,6 \times 10^6$ Zellen mit 20 ml Vollmedium inkubiert. Anschließend erfolgte eine engmaschige Beobachtung der Zellen. Bei einer Konfluenz von 70-100 % wurden die Zellen dreimalig mit 10 ml PBS gewaschen. Dann erfolgte die Zugabe von 20 ml Hungermedium, um die Zellen im Wachstum zu stoppen. Unabdingbare Voraussetzung für die Versuche war eine annähernd gleiche Konfluenz in allen vier Versuchsflaschen. Nach 24 bis 48 Stunden wurde bei mikroskopisch gesunden Zellen ohne Mitosen der Versuch gestartet. Hierfür wurde zunächst der Überstand in den vier Zellkulturflaschen abpipettiert und dann je 20 ml Hungermedium mit Tacrolimus in einer Konzentration von 0, 10, 50 oder 100 ng/ml zugegeben. Anschließend fand eine Inkubation für 8, 24, 48, 72 oder 96 Stunden statt. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurden die Proben für die Bestimmung der mRNA (5.2) und der Proteinmenge im ELISA (5.3) oder im Western Blot (5.4) aufbereitet.

5.2 Kompetitive reverse Transkription-Polymerasekettenreaktion

5.2.1 Allgemeines Prinzip

Die kompetitive reverse Transkription-Polymerasekettenreaktion (rT-PCR) ist eine Methode zum quantitativen Nachweis von spezifischer RNA. Dabei wird die zu messende RNA zunächst in cDNA umgewandelt. In mehreren gemeinsamen PCR-Ansätzen konkurriert die zu messende cDNA dann mit verschiedenen, definierten Mengen an konstruierter Standard-cDNA, wodurch letztendlich eine indirekte Quantifizierung erfolgen kann.

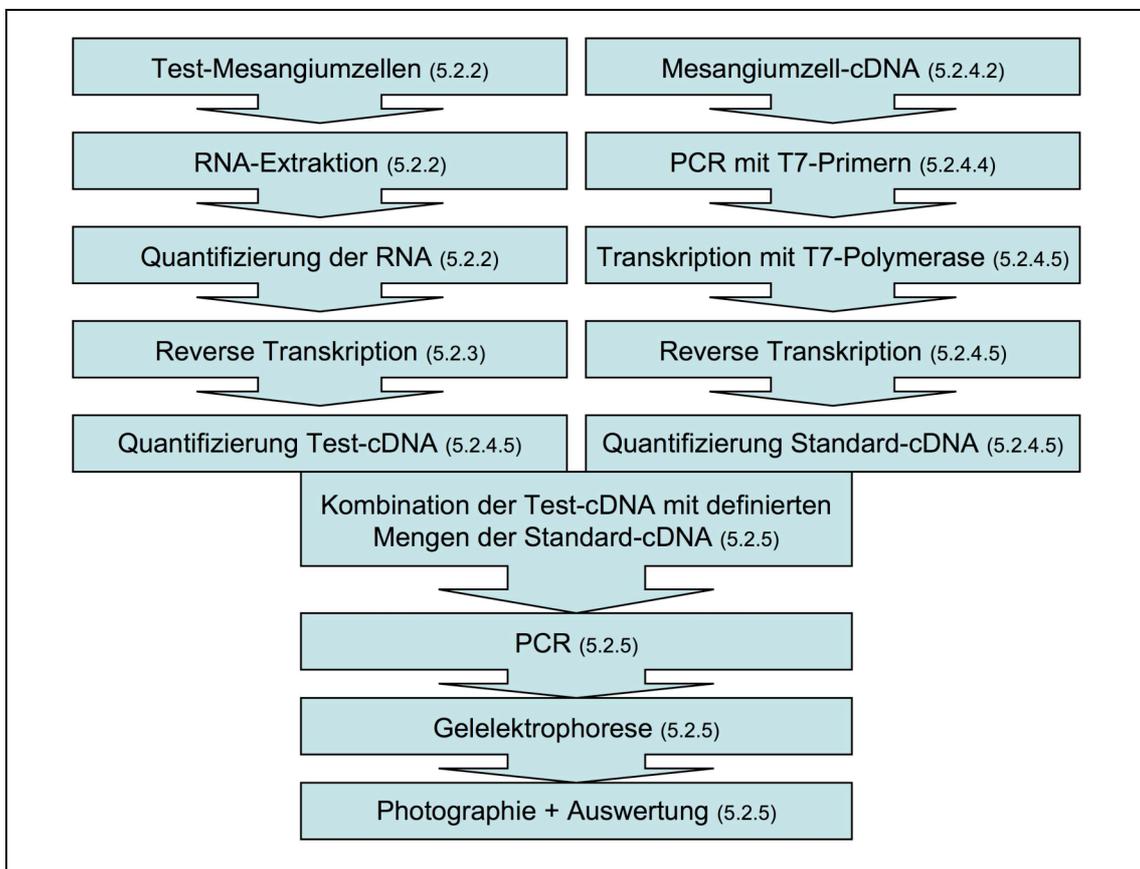


Abbildung 5: Schematische Darstellung der kompetitiven rT-PCR: 1) Linker Pfad: Extraktion und Quantifizierung der Gesamt-RNA aus den Test-Mesangiumzellen mit anschließender Umwandlung in Komplementär-DNA (cDNA) und erneuter Quantifizierung der cDNA-Menge. 2) Rechter Pfad: Durchführung einer PCR mit cDNA aus unbehandelten Mesangiumzellen (Herstellung wie im linken Pfad beschrieben) und T7-Primern zur Herstellung einer "verkürzten" Version der Ziel-DNA. Anschließend Umschreibung in RNA per Transkription und erneute Umwandlung in cDNA durch eine reverse Transkription. Die so erstellte Standard-cDNA wird quantifiziert. 3) Gemeinsamer Pfad: Herstellung von mehreren PCR-Ansätzen mit jeweils der gleichen Menge an Test-cDNA und verschiedenen, bekannten Mengen der Standard-cDNA. Damit erfolgen die Durchführung der kompetitiven PCR und anschließend die Auftrennung der Produkte durch eine Gelelektrophorese, die Photographie der Banden und die graphische Auswertung.

5.2.2 RNA-Extraktion und -Quantifizierung

Nach Inkubation in An- oder Abwesenheit verschiedener Tacrolimus-Konzentrationen wurden die Zellen unter dem Mikroskop begutachtet, das Kulturmedium abgesaugt und die Zellen zweimal gewaschen. Anschließend wurden pro Zellkulturflasche 3 ml Trizol[®] zugegeben. Nach einer Einwirkzeit von fünf Minuten und vollständiger Ablösung des Zellrasens wurde dreimal je 1 ml der Zellsuspension in ein 1,5 ml Eppendorf-Röhrchen überführt. Nach viermaligem Aufziehen und Abgeben des Zelllysates durch eine 21G-Kanüle wurden die Proben mit je 0,2 ml Chloroform versetzt oder für eine spätere Weiterverarbeitung bei $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ tiefgefroren. Nach kräftigem Schütteln und einer Inkubationszeit von drei Minuten bei Raumtemperatur wurden die Proben bei 12.000 g und $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ für 15 Minuten zentrifugiert. Durch die Zentrifugation trennte sich das Gemisch in eine rote Phenol-Chloroform-Phase, eine Zwischenphase und eine obere wässrige Phase, in der sich die RNA befand. Diese Phase wurde jeweils in ein neues Eppendorf-Röhrchen überführt und mit 0,5 ml Iso-Propanol versetzt. Die Röhrchen wurden vorsichtig geschüttelt und anschließend für zehn Minuten bei $30\text{ }^{\circ}\text{C}$ inkubiert, bevor sie erneut bei 12.000 g und $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ für zehn Minuten zentrifugiert wurden. Daraufhin lag die RNA als Pellet auf dem Grund des Röhrchens vor. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet mit 1 ml Ethanol 75 % gewaschen. Nach fünfminütiger Zentrifugation bei 7.500 g und $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ wurde der Überstand verworfen und die Pellets wurden in der Vakuumzentrifuge vorsichtig, d.h. nicht bis zur völligen Austrocknung, getrocknet. Danach wurden die Pellets in je $30\text{ }\mu\text{l}$ DEPC- H_2O gelöst und bei $55\text{ }^{\circ}\text{C}$ für zehn Minuten auf dem Thermoerschüttler inkubiert. Nach Abkühlung wurden aus jedem Ansatz dreimal $2\text{ }\mu\text{l}$ entnommen. Mit jeweils einer der $2\text{ }\mu\text{l}$ -Proben wurde zur Kontrolle der Effizienz der Extraktion eine Agarose-Gel-Elektrophorese mit nachfolgender Ethidiumbromidfärbung durchgeführt. Mit den zwei anderen Proben wurde nach Verdünnung mit DEPC- H_2O eine UV-Spektrographie bei 260 nm zur Messung der Gesamt-RNA vorgenommen.

5.2.3 Reverse Transkription

Die Umwandlung der RNA in einzelsträngige cDNA wurde mit Produkten und einem Protokoll der Firma Perkin Elmer durchgeführt. Dabei enthielt ein $20\text{ }\mu\text{l}$ -Reaktionsansatz $1\text{ }\mu\text{g}$ Gesamt-RNA, $1\text{ }\mu\text{l}$ Random-Hexamer-Primer, $2\text{ }\mu\text{l}$ 10x-PCR-Puffer (500 mM KCl, 100 mM Tris-HCl, pH 8,3), $4\text{ }\mu\text{l}$ 25 mM- MgCl_2 , $0,8\text{ }\mu\text{l}$ 100mM-dNTP, $1\text{ }\mu\text{l}$ MULV Reverse

Transkriptase (2,5 U/μl) und 1 μl RN-ase Inhibitor (1 U/μl) in einer entsprechenden Menge DEPC-H₂O. In einem Thermozykler wurden die Reaktionsansätze zunächst für zehn Minuten bei 25 °C und anschließend für 45 Minuten bei 42 °C inkubiert. Das Stoppen der Reaktion erfolgte durch fünfminütiges Erhitzen auf 95 °C mit anschließendem Abkühlen auf 4 °C. Die Proben wurden sofort weiterverarbeitet oder bei –20 °C aufbewahrt.

5.2.4 Herstellung der kompetitiven Referenzstandards

Die Herstellung der kompetitiven Referenzstandards erfolgte, wenn nicht anders angegeben, nach im nephrologischen Forschungslabor etablierten und bereits veröffentlichten Protokollen [82].

5.2.4.1 Anforderungen an die Referenzstandards

- Referenzstandards und Wildtyp-cDNA (WT-cDNA) müssen exakt die gleiche Zielsequenz für die Primer der rT-PCR besitzen.
- Die PCR-Produkte von Referenzstandards und WT-cDNA müssen sich anschließend durch eine Gelelektrophorese auftrennen lassen.

Deshalb wurde für die Herstellung der Referenzstandards die WT-cDNA des Zielgens verwendet und aus dieser ein Stück „herausgeschnitten“.

5.2.4.2 Umwandlung der WT-RNA in WT-cDNA

Für die Generierung von Referenzstandards wurden Gesamt-RNA-Proben von unbehandelten Mesangiumzellen verwendet. Zunächst wurde die WT-RNA durch eine Reverse Transkription (5.2.3) in Einzelstrang-WT-cDNA umgewandelt, um sie einer PCR zuführen zu können.

5.2.4.3 Primerkonstruktion

Um interne Referenzstandards herzustellen, die den oben genannten Anforderungen genügen, wurden von der Firma TIB MOLBIOL hergestellte Primer gewählt, deren Konstruktion am Beispiel von TGF-β1 erläutert wird:

1. Wahl zweier mRNA-Sequenzen (Angabe der Sequenzen im Folgenden immer in 5'-3'-Richtung) die spezifisch für das TGF-β1-Gen sind und ca. 400 Basen einschließen

(hier: Base 712-733 und 1103-1126). Die Spezifität wurde durch einen Suchlauf in einer Genkartei bestätigt. Diese Sequenzen bildeten die Grundlage für die Primerkonstruktion.

2. Primer 1 (mit T7-sense benannt) erhielt als ersten Teil die später erläuterte so genannte T7-Promoter-Sequenz (5'-AAT TTA ATA CGA CTC ACT ATA GGG A-3') und als zweiten Teil die erste der beiden "spezifischen" Sequenzen (hier: 5'-GGC GGA CTA CTA CGC CAA AGA A -3').

3. Primer 2 (T7-antisense) wurde komplementär konstruiert. Er erhielt als ersten Teil das Komplement der zweiten "spezifischen" Sequenz (5'-CCC ATT GAT TTC CAC GTG GAG TAC-3') und als zweiten Teil das Komplement einer ca. 70 Basen oberhalb liegenden Zielsequenz (5'-GGT TCA GCC ACT CCG GAC A-3'), die im Folgenden als Kürzungssequenz bezeichnet wird.

```

• 1 5'-accgcctccc gcaaagactt caccocaaag ctggggcgca ccccttgac gccaccctcc
• 61 cccagacctg ctcttgagt cccccgcac ccaggaccct ctctcctctg ggaggccgat
• 121 ctccctogga cctgctggca atagcttctt atttaagaac accccacttt tgggtcccag
• 181 agagcgctca tctcgattht tatcccggtg gcatactgag aactctggt gtcagagcgt
• 241 caccgcgact cctgctgctt tctccctcaa cctcaaatta ttcaggacta tcacctacct
• 301 ttctttggga gacccaccc caccocaaa gcctgcagg ggccgggctt ccgcatccca
• 361 cctttgcccg ggttccgctc tctccgaagt tccgtggggc gccgcctccc ccatgccgcc
• 421 ctccgggctg cggctgctgc cgtttctgct cccactcccg tggcttctag tgcctgagcc
• 481 cgggaggcca gccgcgggac tctccacctg caagaccatc gacatggagc tggtgaaacg
• 541 gaagcgcatc gaagccatcc gtggccagat cctgtccaaa ctaaggctcg ccagtcccc
• 601 gagccagggg gaggtaccgc cgggcccgtc gcccgaggcg gtgctcgctt tgtacaacag
•
• 661 caccgcgac cgggtggcag gcgagagcgc tgaccggag cccgagccc aggcgacta
•
• ctacgcaaa gaa
• 721 ctacgcaaa gaagtcaacc gcgtgctaatt ggtggaccgc aacaacgcaa tctatgacaa
• 781 aaccaagac atcacacaca gtatatatat gttcttcaat acgtcagaca ttcgggaagc
• 841 agtgccagaa ccccattgct tgtcccgctg agagctgctc ctgcagagat tcaagtcaac
• 901 tgtggagcaa cacgtagaac tctaccagaa atatagcaac aattcctggc gttaccttgg
• 961 taaccggctg ctgaccccc ctgatacgc tgagtggctg tcttttgacg tcaactggagt
•
• acaggccgtc accgacttgg
• 1021 tgccggcag tggctgaacc aaggagacgg aatacagggc tttcgttca gtgctcactg
•
• catgaggt gcaccttag ttacc
• 1081 ctcttgtag acgaaagata atgtactcca cgtggaatc aatgggatca gtcccaaacg
• 1141 tcgaggtag ctgggcacca tccatgacat gaaccgacc ttctgctcc tcatggccac
• 1201 cccctggaa agggtcaac acctgcacag ctccaggcac cggagagccc tggataccaa
• 1261 ctactgcttc agctccacag agaagaactg ctgtgtacgg cagctgtaca ttgactttag
• 1321 gaaggacctg ggttggaggt ggatccacga gcccaagggc taccatgcca acttctgtct
• 1381 gggccctgc ccctacattt ggagcctgga cacacagtac agcaaggctc ttgccctcta
• 1441 caaccaacac aaccgggtg cttccgcac accgtgctgc gtgccgagg ctttgagacc
• 1501 actgcccac gtctactac tgggtcgcaa gcccaaggtg gagcagttgt ccaacatgat
• 1561 cgtcgctccc tgcaagtgca gcttga-3'

```

Abbildung 6: TGF-β1-mRNA-Sequenz und Primer für die PCR mit T7-Primern; blau-rot: Primer 1 (T7-sense 5'-aatttaatacagactcactataggggaggcgacta ctacgcaaa gaa) aus T7-Promotor (blau) und erster spezifischer Sequenz (schwarz bzw. rot); grün-orange: Primer 2 (T7-antisense 5'-cccattgattccagctggagtaggtcagccactgcccggaca) aus Komplement der 2. spezifischen Sequenz (violett) und Komplement der Kürzungssequenz (braun).

5.2.4.4 PCR mit T7-Primern

Mit diesen Primern wurde die PCR zur exponentiellen Vervielfältigung der cDNA durchgeführt. Für die Herstellung von 20 μ l PCR-Reagenz wurden PCR-Puffer, 2 μ l cDNA, 1,25 U Ampli-Taq-Gold[®]-Polymerase, die beiden Primer in einer Konzentration von jeweils 1 μ M, freie Nukleotide (dNTP) in einer Konzentration von 0,5 mM und Magnesiumchlorid in einer Konzentration von 2,5 mM verwendet.

Im Thermozykler wurde zunächst ein initialer Denaturierungsschritt von zwölf Minuten bei 95 °C durchgeführt, in dem möglicherweise noch durch Wasserstoffbrücken verbundene cDNA-Stränge voneinander getrennt wurden. Anschließend erfolgten 35 Zyklen, die jeweils aus einem Denaturierungsschritt von 30 Sekunden bei 94 °C, einem Schritt zur Primerhybridisierung (Annealingschritt) von 45 Sekunden bei einer von den jeweiligen Primern abhängigen Temperatur sowie einem Elongationsschritt von 60 Sekunden bei 72 °C bestanden.

Im Annealingschritt kommt es zur Anlagerung der Primer an die cDNA. Die dafür gewählte Temperatur ist insbesondere von der Länge der Primersequenzen abhängig. Bei zu niedrig gewählter Temperatur könnten die Primer auch an nicht komplementäre Stränge binden und es käme in der Folge zu nicht erwünschten Produkten. Bei zu hoch gewählter Temperatur binden die Primer nicht stabil genug und die Produktbildung ist ineffizient.

Im Elongationsschritt füllt die DNA-Polymerase die fehlenden Stränge beginnend an den 3'-Enden mit freien Nukleotiden auf. Nach dem letzten Zyklus folgte eine Verlängerung des Elongationsschritts um sieben Minuten und anschließend eine Abkühlung auf 4 °C. Die differierenden Annealingtemperaturen und die Primersequenzen sind nachfolgend in Tabelle 4 aufgeführt.

TGF-β1	
T7-sense-Primer	5'-AAT TTA ATA CGA CTC ACT ATA GGG AGG CGG ACT ACT ACG CCA AAG AA-3'
T7-antisense-Primer	5'-CCC ATT GAT TTC CAC GTG GAG TAC GGT TCA GCC ACT GCC GGA CA-3'
Annealingtemperatur	71 °C
TβRI	
T7-sense-Primer	5'-AAT TTA ATA CGA CTC ACT ATA GGG AGC TGT GGT TGG TGT CGG ATT AT-3'
T7-antisense-Primer	5'-CCA GAA TAC TAA GCC CAT TTA CCT TTT AGT GCC TA-3'
Annealingtemperatur	62 °C
TβRII	
T7-sense-Primer	5'-AAT TAA ATA CGA CTC ACT ATA GGG AGC GTG GCC GTG TGG AGG AAG AA-3'
T7-antisense-Primer	5'-GGG CAG CAG TTC CGT ATT AGG ATG ATG GCG CAG TT-3'
Annealingtemperatur	65 °C
GAPDH	
T7-sense-Primer	5'-AAT TTA ATA CGA CTC ACT ATA GGG ACG TCT TCA CCA CCA TGG AGA A-3'
T7-antisense-Primer	5'-CCA GTG AGC TTC CCG TTC AGC TCC GGC CAT CAC GCC ACA GCT TT-3'
Annealingtemperatur	70 °C

Tabelle 4: Primersequenzen und Annealingtemperaturen für die T7-PCR.

Um den so konstruierten Referenzstandard von den übrigen DNA-Anteilen der Probe zu trennen, erfolgte eine Gelelektrophorese. Nach Herstellung eines zweiprozentigen Agarosegels wurden die 40 µl-Taschen jeweils mit dem PCR-Produkt und 18 µl Ethidiumbromid als Färbemittel gefüllt. Eine Tasche enthielt die Negativkontrolle und eine Tasche die Markersubstanz (Leiter für Basenzahl). Nach Auftrennung mit Hilfe der Elektrophoresekammer wurde das fluoreszierende Produkt aus dem Trenngel herausgeschnitten und gewogen.

5.2.4.5 Extraktion, Transkription und Reverse Transkription

Da für die abschließende PCR Referenzstandards in Form von Einzelstrang-cDNA benötigt wurden, erfolgte eine entsprechende Umwandlung in drei Schritten. Zunächst erfolgte die Extraktion der cDNA aus dem Gel. Dies geschah mit Hilfe des Quiagen Gel Extraction Kit® und zugehörigem Protokoll.

Auflösung des Gels: Zum ausgeschnittenen Gel, das die cDNA beinhaltete, wurden pro µg Gel 3 µl gelber Puffer QG zugegeben und zehn Minuten bei 50 °C im Wasserbad inkubiert. Dadurch kam es zur Verflüssigung des Gels. Anschließend wurde 1 µl Isoopropanol pro µg ursprünglichem Gel zugegeben.

Bindung der cDNA: Das Produkt wurde auf die im Sammelröhrchen plazierte Qiaquick-Säule gegeben und für eine Minute bei 4 °C und 13.000 U/min zentrifugiert. Dadurch kam es zur Bindung der cDNA an die Säule. Die Restflüssigkeit wurde verworfen.

Waschen: A) Gabe von 0,5 ml Puffer Q6 auf die Säule und erneutes Zentrifugieren für eine Minute bei 4 °C und 13.000 U/min. Dadurch wurden Reste der Agarose entfernt. B) Gabe von 0,75 ml Puffer PE auf die Säule und erneutes Zentrifugieren. C) Nach Entfernung der Restflüssigkeit nochmaliges Zentrifugieren. Dadurch wurden die Pufferreste entfernt.

cDNA-Gewinnung: Die Säule wurde in ein 1,5 ml Eppendorf-Röhrchen platziert, mit 30 µl HPLC-Wasser beladen und erneut zentrifugiert. Im Eluat befand sich nun ausschließlich die in HPLC-Wasser gelöste cDNA. Die "gereinigte" cDNA wurde sofort weiterverarbeitet oder bei -20 °C aufbewahrt.

Im zweiten Schritt wurde die cDNA mit Hilfe des Riboprobe T7 system[®]-Kit in cRNA transkribiert. Hierfür war die Konstruktion der T7-Komponente wichtig, da die RNA-Polymerase diese als Startsequenz benötigt. Es wurden folgende Komponenten zusammengegeben: 10 µl Transcription optimized 5fach Puffer, 5 µl DTT (Zielkonzentration 10 mM), 1,25 µl Ribonukleaseinhibitor (50 U), 1 µl T7 RNA-Polymerase (20 U), jeweils 2,5 µl ATP, GTP, CTP und UTP als Substrate für die T7 RNA-Polymerase, 2 µl der in HPLC-Wasser gelösten cDNA und 20,75 µl Nuklease-freies Wasser. Dieser Ansatz wurde für zwei Stunden bei 39 °C im Thermoschüttler inkubiert. Zweimal wurden je 2 µl des Ansatzes in DEPC-Wasser verdünnt und es wurde eine UV-Spektrographie bei 260 nm zur Messung der gewonnenen cRNA-Menge durchgeführt. Der Rest wurde entweder sofort weiterverwendet oder bei -80 °C aufbewahrt.

Im dritten Schritt erfolgte die Umwandlung der cRNA in Einzelstrang-cDNA wie unter 5.2.3 beschrieben. Entsprechend der Methode zur quantitativen Messung der RNA erfolgte nach Verdünnung mit HPLC-Wasser eine UV-Spektrographie bei 260 nm zur Bestimmung der Menge an gewonnener Referenzstandard-cDNA.

5.2.5 Kompetitive PCR

Nach Aufbereitung der Versuchsproben und Herstellung der Referenzstandards von TGF-β1, TβRI, TβRII und GAPDH konnten die eigentlichen Messungen erfolgen. Zuvor wurden Test-PCRs zur Optimierung folgender Parameter durchgeführt [87]:

1. Ausgangskonzentration und Verdünnungsreihe der Referenzstandards

2. Anzahl der PCR-Zyklen (Messung im exponentiellen Bereich)

3. Annealingtemperatur

Unter den jeweils optimalen PCR-Bedingungen erfolgten dann je Probe sieben PCR-Ansätze. Jeder PCR-Ansatz enthielt die jeweiligen Primer (sense und antisense) in einer Konzentration von 1 μ M, 2 μ l 10x-PCR-Puffer, 2 μ l MgCl₂ (Zielkonzentration 0,2 mM), 0,1 μ l dNTP (0,5 mM), 0,25 μ l Taq-Gold-Polymerase® (1,25 U), eine von der zu messenden DNA abhängigen Menge an Test-cDNA und je 3 μ l einer vorher erstellten 1:3-Verdünnungsreihe des jeweiligen Referenzstandards oder 3 μ l HPLC-Wasser als Negativkontrolle. Anschließend wurde mit HPLC-Wasser auf 20 μ l ergänzt. Für alle Ansätze gleich waren der erste Denaturierungsschritt von 12 Minuten bei 95 °C, der Denaturierungsschritt von 30 Sekunden bei 94 °C pro Zyklus, der Elongationsschritt von einer Minute bei 72 °C, der letzte verlängerte Elongationsschritt von 7 Minuten bei 72 °C und die abschließende Abkühlung auf 4 °C.

Die variablen Parameter sind nachfolgend in Tabelle 5 aufgeführt:

TGF-β1	
sense-Primer	5'-GGC GGA CTA CTA CGC CAA AGA A-3'
antisense-Primer	5'-CCC ATT GAT TTC CAC GTG GAG TAC-3'
Verdünnungsreihe des Referenzstandards in μ g	1,6 / 1,6*3 ⁻¹ / 1,6*3 ⁻² / 1,6*3 ⁻³ / 1,6*3 ⁻⁴ / 1,6*3 ⁻⁵
Menge an Test-cDNA pro PCR-Ansatz	1 μ l
Zyklusanzahl	30
Annealingtemperatur	60 °C
TβRI	
sense-Primer	5'-GCT GTG GTT GGT GTC GGA TTA T-3'
antisense-Primer	5'-CCA GAA TAC TAA GCC CAT T-3'
Verdünnungsreihe des Referenzstandards in μ g	0,8 / 0,8*3 ⁻¹ / 0,8*3 ⁻² / 0,8*3 ⁻³ / 0,8*3 ⁻⁴ / 0,8*3 ⁻⁵
Menge an Test-cDNA pro PCR-Ansatz	2 μ l
Zyklusanzahl	28
Annealingtemperatur	54 °C
TβRII	
sense-Primer	5'-GCG TGG CCG TGT GGA GGA AGA A-3'
antisense-Primer	5'-GGG CAG CAG TTC CGT ATT-3'
Verdünnungsreihe des Referenzstandards in μ g	8 / 8*3 ⁻¹ / 8*3 ⁻² / 8*3 ⁻³ / 8*3 ⁻⁴ / 8*3 ⁻⁵
Menge an Test-cDNA pro PCR-Ansatz	2 μ l
Zyklusanzahl	28
Annealingtemperatur	60 °C

GAPDH	
sense-Primer	5'-CGT CTT CAC CAC CAT GGA GAA-3'
antisense-Primer	5'-CCA GTG AGC TTC CCG TTC AGC TC-3'
Verdünnungsreihe des Referenzstandards in µg	8 / 8*3 ⁻¹ / 8*3 ⁻² / 8*3 ⁻³ / 8*3 ⁻⁴ / 8*3 ⁻⁵
Menge an Test-cDNA pro PCR-Ansatz	0,25 µl
Zyklusanzahl	26
Annealingtemperatur	60 °C

Tabelle 5: Sense- und antisense-Primer, Verdünnungsreihe des Referenzstandards, Menge an Test-cDNA aus dem jeweiligen Versuch pro PCR-Ansatz, Zyklusanzahl und Annealingtemperatur für die kompetitive PCR von TGF-β1, TβRI, TβRII und GAPDH.

Die entstandenen PCR-Produkte wurden anschließend in die Taschen eines zwei-prozentigen Agarosegels überführt und mit Ethidiumbromidlösung als Färbemittel ergänzt. In die achte Tasche wurde als Marker eine 100bp-Leiter als Standard pipettiert. Nach elektrophoretischer Auftrennung wurden die sichtbaren Banden mit der Digitalkamera photographiert und deren Intensität mit Hilfe der 1D Image Analysis Software densitometrisch gemessen. Das Prinzip der Auswertung dieser Messergebnisse ist exemplarisch in Kapitel 6.2.1.1 dargestellt.

5.3 TGF-β1-ELISA

5.3.1 Allgemeines Prinzip

Der ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay) ist eine Methode zur quantitativen Messung von Proteinen, Hormonen und anderen Substanzen. Der Nachweis erfolgt über Antigen/Antikörper-Bindungen und eine Farbreaktion. Zunächst wird eine Mikrotiterplatte mit einem spezifischen Antikörper gegen TGF-β1 beschichtet. Anschließend wird die Testsubstanz auf die Platte gegeben.

Nach einem Waschschrift wird ein zweiter biotinylierter Antikörper (in diesem Fall ein Hühnerantikörper) auf die Platte gegeben, der ebenfalls an TGF-β1 bindet, aber an eine andere Teilstruktur als der erste Antikörper. Nun wird Streptavidin-HRP zugegeben. Das Peroxidase-gekoppelte Streptavidin bindet Biotin. Nach einem erneuten Waschschrift wird der Peroxidase ein Substrat angeboten, so dass es bei vorhandenem TGF-β1 zu einer Farbreaktion kommt. Indem definierte TGF-β1-Standardkonzentrationen mitgetestet werden, kann die densitometrisch gemessene Farbreaktion der Testsubstanz quantifiziert werden.

5.3.2 Probenaufbereitung

Nach Inkubation in An- oder Abwesenheit verschiedener Tacrolimus-Konzentrationen und mikroskopischer Begutachtung der Zellen wurde der Überstand der Zellkulturflaschen mit Hilfe einer Pipette gemischt. Danach wurden je Versuchsflasche 2 ml in ein Eppendorf-Röhrchen überführt und auf Eis gestellt. Es folgte eine Zentrifugation mit 10.000 U/min bei 4 °C für sieben Minuten. Die von Zellresten befreite Flüssigkeit wurde anschließend in ein 2 ml-Eppendorf-Röhrchen überführt. Nach nochmaligem Mischen mit dem Vortexmixer wurden je 0,5 ml in drei neue Eppendorf-Röhrchen überführt und bei -80 °C für die spätere Messung aufbewahrt.

5.3.3 ELISA

Die Messung der TGF- β 1-Konzentration erfolgte mit dem ELISA-Duo Set[®] Development System nach dem zugehörigen Protokoll.

Erster Antikörper (Capture-Antikörper Nr. 840116): Zunächst wurde die 96-Loch-Mikrotiterplatte mit dem ersten anti-TGF- β 1-Antikörper präpariert. Dafür wurden in jede Vertiefung 100 μ l des in einer Konzentration von 2 μ g/ml in PBS gelösten Antikörpers gegeben. Anschließend wurde die Platte abgedeckt und über Nacht bei Raumtemperatur inkubiert. Währenddessen wurden die für die nächsten Schritte benötigten Lösungen hergestellt: 500 ml Waschpuffer (0,05 % Tween 20 in PBS), 50 ml Blockpuffer (5 % Tween 20 + 2,5 % Sucrose (w/v) in PBS), 50 ml Verdünnungsreagenz (DBS 1,4 % + 0,05 % Tween 20 in PBS), 100 ml 1 N HCl und 100 ml 1,2 N NaOH / 0,5 M HEPES. Die Flüssigkeit wurde nun abgekippt und die Platte vorsichtig trocken geklopft. Anschließend fand dreimalig ein Waschschriff mit jeweils 300 μ l Waschpuffer pro Vertiefung statt, um Reste von nicht gebundenen Antikörpern zu entfernen.

Blockierung: Durch Zugabe von 300 μ l Blockpuffer pro Vertiefung und Inkubation für eine Stunde wurden freie Bindungsstellen auf der Platte blockiert, um später eine unspezifische Bindung des Antigens zu verhindern.

Proben und Standard (Antigen): Es wurde eine Standard-1:2-Verdünnungsreihe aus dem rekombinanten humanen TGF- β 1 und dem Verdünnungsreagenz mit einer Anfangskonzentration von 2 μ g/ml hergestellt. Die Proben wurden durch Zugabe von 100 μ l 1 N HCl und Mischen mit dem Vortexmixer zunächst aktiviert und anschließend durch Zugabe von 1,2 N NaOH / HEPES wieder neutralisiert. Durch diesen Vorgang

lagen die Proben jetzt mit einem Verdünnungsfaktor von 1,4 vor. Nach einem erneuten Waschschrift wurden die Vertiefungen folgendermaßen jeweils doppelt bestückt und zugedeckt für zwei Stunden inkubiert:

B	B	HM	HM	P8	P8	P16	P16	P24	P24	P32	P32
S1	S1	P1	P1	P9	P9	P17	P17	P25	P25	P33	P33
S2	S2	P2	P2	P10	P10	P18	P18	P26	P26	P34	P34
S3	S3	P3	P3	P11	P11	P19	P19	P27	P27	P35	P35
S4	S4	P4	P4	P12	P12	P20	P20	P28	P28	P36	P36
S5	S5	P5	P5	P13	P13	P21	P21	P29	P29	P37	P37
S6	S6	P6	P6	P14	P14	P22	P22	P30	P30	P38	P38
S7	S7	P7	P7	P15	P15	P23	P23	P31	P31	P39	P39

Abbildung 7: 96-Loch-Platte. B: 100 µl Verdünnungsreagenz, HM: 100 µl Hungermedium, S1-7: 100 µl Standard als Verdünnungsreihe, P1-39: 100 µl Proben (mit Verdünnungsfaktor 1,4)

Zweiter Antikörper (Detection-Antikörper Nr. 840117): Nach einem erneuten Waschschrift wurden in jede Vertiefung 100 µl des zweiten Antikörpers in einer Konzentration von 300 ng/ml gegeben und erneut für zwei Stunden inkubiert.

Streptavidin-Peroxidase: Nach einem erneuten Waschschrift wurden in jede Vertiefung 100 µl Streptavidin-HRP (1:200 in Verdünnungsreagenz) pipettiert. Anschließend fand eine Inkubation für 20 Minuten im Dunkeln statt.

Substrat: Nach einem erneuten Waschschrift zur Entfernung von nicht gebundener Streptavidin-HRP wurden pro Vertiefung 100 µl Substratlösung zugegeben. Nach weiteren 20 Minuten wurde die Reaktion durch Zugabe von 50 µl Stopplösung beendet.

5.3.4 Auswertung

Die Auswertung erfolgte direkt nach Beendigung der Reaktion durch eine Messung im ELISA-Auslesegerät. Dabei wurde eine Doppelfiltermessung mit 450 nm als Testfilter und 570 nm als Referenzfilter gewählt, um bei der Messung Hintergrundstörungen herauszufiltern. Für die Proben wurde ein Verdünnungsfaktor von 1,4 eingestellt. Das zugehörige Computerprogramm berechnete aus den vorgegebenen Standardkonzentrationen eine Eichkurve, mit deren Hilfe die Konzentration von TGF-β1 in den Proben berechnet werden konnte.

5.4 T β RI/T β RII - Western Blot

5.4.1 Allgemeines Prinzip

Durch einen Western Blot (oder Immunoblot) erfolgt der spezifische Nachweis von Proteinen durch Antigen/Antikörper-Erkennung. Dabei werden die Proteine einer zu untersuchenden Probe zunächst nach Ihrem Molekulargewicht (Größe) durch eine Gelelektrophorese aufgetrennt, um anschließend auf eine Membran übertragen („geblottet“) zu werden. Im letzten Schritt findet dann durch Inkubation mit spezifischen Antikörpern die Identifizierung statt.

5.4.2 Probenaufbereitung

Nach Inkubation in An- oder Abwesenheit verschiedener Tacrolimus-Konzentrationen und mikroskopischer Begutachtung der Zellen wurde der Zellrasen dreimal mit PBS gewaschen und anschließend mit einem Milliliter Lysispuffer unter Mithilfe eines Zellscabers vom Boden der Zellkulturflasche gelöst. Zur Homogenisierung wurde das Zelllysate noch viermal durch eine 21G-Kanüle aufgezogen und wieder abgegeben. Nach einer Inkubationszeit von 60 Minuten auf Eis wurden die Proben bei 10.000 g und 4 °C für zehn Minuten zentrifugiert. Anschließend erfolgte die Überführung der Überstände in ein neues Eppendorf-Röhrchen.

5.4.3 Proteinmessung

Da für die Durchführung eines Western Blots die Gesamtproteinkonzentration der jeweiligen Probe benötigt wird, erfolgte zunächst die Messung der Proteinkonzentration mit Hilfe des BCA-Proteinassay-Kits. In diesem standardisierten Verfahren wird ausgenutzt, dass Proteine im alkalischen Milieu zweiwertige zu einwertigen Kupferionen reduzieren und einwertige Kupferionen mit Bicinchoninsäure einen Komplex bilden, der farbmetrisch gemessen werden kann [88].

Zunächst wurde eine Standardverdünnungsreihe aus Rinderalbumin in einer Konzentration von 2000 μ g/ml bis 25 μ g/ml hergestellt. Außerdem wurde die Reaktionslösung aus BCA-Reagenz A und BCA-Reagenz B im Verhältnis 50:1 angesetzt. In jede Vertiefung einer 96 Loch-Mikrotiterplatte wurden entweder 25 μ l der zu messenden Probe oder 25 μ l Standard in doppelter Ausführung pipettiert. Dann wurden 200 μ l Reaktionslösung

in jede Vertiefung gegeben, die Platte für 30 Sekunden vorsichtig geschüttelt und für weitere 30 Sekunden bei 37 °C im Brutschrank inkubiert. Nach Abkühlung auf Raumtemperatur erfolgte die densitometrische Messung im ELISA-Auslesegerät bei 570 nm und die graphische Auswertung in gleicher Weise wie unter 5.3.4 beschrieben.

5.4.4 SDS-Gelelektrophorese

5.4.4.1 Konstruktion des Lämmli-Gels

Zunächst wurde das Trenngel gegossen. Hierfür wurden 6 ml Acrylamidlösung 30 %, 2,4 ml Bisacrylamidlösung 2 %, 3,75 ml 4xTris / SDS (pH 8,8), 2,85 ml destilliertes Wasser sowie 50 µl APS und 10 µl TEMED in ein 50 ml Falcon-Röhrchen gegeben und gemischt. Anschließend wurde das Gel in die vorbereitete Kammer gegossen und mit Isobutylalkohol überschichtet.

Nach einer Stunde Aushärtungszeit wurde der Alkohol abgegossen. Nach einem Waschschrift mit 1xSDS wurde das Sammelgel (15 ml Falcon-Röhrchen: 0,65 ml Acrylamidlösung 30 %, 0,25 ml Bisacrylamidlösung 2 %, 1,25 ml 4xTris / SDS (pH 6,8), 2,8 ml destilliertes Wasser sowie 25 µl APS und 5 µl TEMED) auf das Trenngel gegossen und ein Kamm zur Konstruktion der Substrattaschen eingeklemmt. Die zweite Aushärtungszeit betrug ebenfalls eine Stunde.

5.4.4.2 Elektrophorese

Zunächst wurden die Proben vorbereitet. Zu jeder Probe (40 µg Gesamtprotein) wurde ¼ des Probenvolumens an 6xSDS gegeben. Zu 10 µl des Regenbogen-Markers wurden 10 µl 2xSDS gegeben. Die Positivkontrolle von TβRII wurde im Verhältnis 1:160 mit 2xSDS verdünnt. Diese Ansätze wurden jeweils fünf Minuten bei 95 °C erhitzt und anschließend wieder auf Raumtemperatur abgekühlt. Der ECL-Marker lag gebrauchsfertig vor und musste nicht erhitzt werden.

Nach erfolgtem Aufbau der Elektrophoresekammer, Einspannen des Gels und Füllung der Kammer mit 1xSDS wurden die Taschen mit den jeweiligen Proben und Markern beladen und die Kühlung sowie der Spannungsgeber (40 mA, 120 V) gestartet. Nach Beendigung der Elektrophorese (erkennbar durch das Erreichen des Gelendes der mit dem Bromphenolblau markierten Führungsbande) wurde das Trenngel in eine Schale

mit Transferpuffer überführt und vom Sammelgel getrennt. Anschließend erfolgte die Äquilibrierung im Transferpuffer für 30 Minuten.

5.4.5 Blot

Die für den Blot benötigte Polyvinylidenfluorid (PVDF)-Membran wurde zunächst zugeschnitten, dann in destilliertem Wasser befeuchtet, in Methanol überführt und für 15 Minuten im Transferpuffer äquilibriert. Anschließend wurde die Transferkassette (Abbildung 8) in einer Schale mit Transferpuffer aufgebaut, wobei die jeweiligen Bestandteile vorher mit Transferpuffer befeuchtet wurden, und in den komplett mit Transferpuffer gefüllten Tank eingesetzt. Nach 70 Minuten bei 100 V, 380 mA und laufender Kühlung wurde die Membran (mit den darauf transferierten Proteinen) in eine Schale mit TBS gegeben. Zur Kontrolle des erfolgreichen Transfers erfolgte eine Färbung mit Ponceau S.

Kathodenseite der Kassette
Schwamm
Filterpapier
Trenngel
PVDF-Membran
Filterpapier
Schwamm
Anodenseite der Kassette

Abbildung 8: Aufbau der Transferkassette für den Western Blot.

5.4.6 Immundetektion

Zunächst wurde die PVDF-Membran mit den auf ihr befindlichen Proteinen mindestens 60 Minuten im Blockpuffer inkubiert, um freie Membrananteile für unspezifische Bindungen zu blockieren. Anschließend fand eine Inkubation mit dem in Blockpuffer verdünnten 1. Antikörper über 90 Minuten statt (die Konzentration des Antikörpers wurde nach den Vorgaben des Herstellers jeweils angepasst). Bei dem ersten Antikörper handelte es sich entweder um einen Kaninchenantikörper gegen eine extrazelluläre Domäne von T β RI oder gegen eine Peptidstruktur der carboxyterminalen Domäne von T β RII. Die Marker und die Positivkontrolle von T β RII wurden mitinkubiert. Die Negativkontrollen wurden nur mit Blockpuffer inkubiert.

Es folgte ein viermaliger Waschschrift mit TBST über jeweils zehn Minuten auf dem Schüttler und dann die Inkubation mit dem zweiten in Blockpuffer verdünnten Antikörper über 60 Minuten. Bei dem zweiten Antikörper handelte es sich um einen polyklonalen, mit einer Peroxidase konjugierten Ziegenantikörper gegen Kaninchenantikörper. Nach dreimaligem Waschen mit TBST und einmaligem Waschen mit TBS wurde die Membran gleichmäßig mit dem ECL-System beschichtet. Dabei wurde ausgenutzt, dass es in Anwesenheit des Enzyms Peroxidase im ECL-System zu einer Chemilumineszenz-Reaktion kommt.

Nach der Reaktionszeit von fünf Minuten fand eine Belichtung von Filmen mit mehreren Belichtungszeiten statt. Die Bandintensitäten auf den entwickelten Filmen wurden mit Hilfe der 1D Image Analysis Software densitometrisch ausgewertet.

5.5 Statistische Auswertung

Die statistische Auswertung der Untersuchungsergebnisse erfolgte mit dem Statistikprogramm SPSS Version 17.0 für Windows.

Die Verteilung von TGF- β 1 und der Rezeptoren T β RI und T β RII in Mesangiumzellen kann als annähernd normal verteilt angenommen werden, weshalb in den graphischen Darstellungen eine Mittelwertangabe inklusive Standardabweichung als Fehlerindikator erfolgte. Es ist außerdem davon auszugehen, dass eine lineare Beziehung zwischen der Anzahl der Zellen und dem produzierten TGF- β 1 bzw. dem Vorhandensein der Rezeptoren T β RI und T β RII besteht. Da bei den Ausgangsbedingungen für die Versuche mit gleicher Inkubationszeit methodenbedingt lediglich ein Unterschied in der Zellzahl der Kultur bestand, durfte eine Normierung der Ausgangskonzentration erfolgen.

Die Testung von Unterschieden zwischen zwei Gruppen erfolgte mit dem Mann-Whitney-U-Test, da Abweichungen in der Normalverteilung nicht ausgeschlossen werden konnten. Die Testung von Unterschieden zwischen mehreren Gruppen erfolgte mit einer einfaktoriellen Varianzanalyse (ANOVA) und nachfolgender auf dem T-Test basierender multipler Vergleichstestung nach Bonferroni, da die ANOVA gegenüber Abweichungen von der Normalverteilung ebenfalls robust ist [89, 90, 91, 92, 93].

6 Ergebnisse

6.1 Vorbemerkungen zu den Zellkulturversuchen

Für die Versuche wurden Mesangiumzellkulturen verwendet, die zu vier unterschiedlichen Zeitpunkten von Sprague-Dawley-Ratten gewonnen wurden und im Folgenden mit den Buchstaben A, B, C und D abgekürzt werden. Die Versuche wurden mit einer siebenstelligen Kodierung versehen, wobei der Buchstabe die Mesangiumzellkultur, die Ziffern 1 und 2 die Inkubationszeit in Stunden und die Ziffern 3 bis 6 das Datum der Beendigung des Versuchs (Tag und Monat) bezeichnen.

6.2 Wirkung von Tacrolimus auf die TGF- β 1-Synthese

6.2.1 TGF- β 1-mRNA-Expression

Die Mesangiumzellkulturen wurden in Anwesenheit verschiedener Tacrolimus-Konzentrationen (10, 50 und 100 ng/ml) oder ohne Tacrolimus über unterschiedliche Zeiträume (24, 48, 72 und 96 Stunden) inkubiert. Anschließend erfolgten die Isolierung der RNA und die Bestimmung der TGF- β 1-mRNA-Menge mit Hilfe der kompetitiven rT-PCR. Nachfolgend findet sich unter 6.2.1.1 eine exemplarische Darstellung der Auswertung von Versuch C721310 und unter 6.2.1.2 die Zusammenfassung aller Versuche zur Messung der TGF- β 1-mRNA.

6.2.1.1 Exemplarische Auswertung

Das Versuchsergebnis wurde als Relation der Menge an TGF- β 1-mRNA in den mit Tacrolimus inkubierten Mesangiumzellen zur Menge an TGF- β 1-mRNA in den ohne Tacrolimus inkubierten Mesangiumzellen angegeben.

Die Berechnung erfolgte in folgenden Schritten:

1) Densitometrische Messung der Bandintensitäten der elektrophoretisch aufgetrennten rT-PCR-Produkte (siehe Abbildung 9).

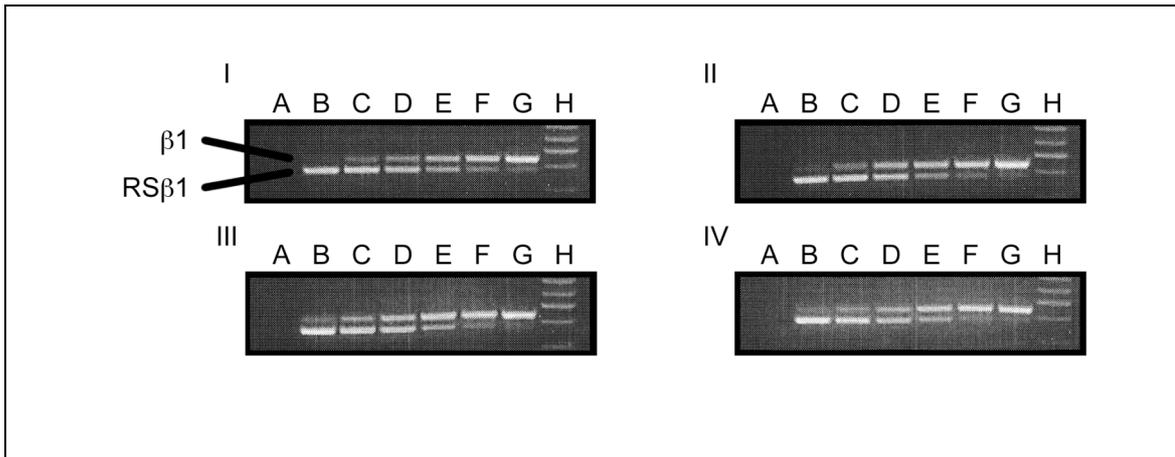


Abbildung 9: Photographische Ablichtungen I-IV der elektrophoretisch aufgetrennten Produkte der kompetitiven rT-PCR für TGF- β 1 aus dem Versuch C721310. In den Spalten B-G finden sich die PCR-Produkte aus dem Ansatz mit jeweils einer konstanten Menge von 1 μ l der Versuchssprobe (nach Inkubation der Mesangiumzellen ohne (I), mit 10 (II), mit 50 (III) und 100 ng/ml Tacrolimus (IV)) und einer standardisierten Menge an TGF- β 1-Referenz-Standard-cDNA (Spalte B: 0,2 μ g, Spalte C: $1/3 \times 0,2 \mu$ g, Spalte D: $(1/3)^2 \times 0,2 \mu$ g, usw.). Die obere Bande besteht jeweils aus der TGF- β 1-cDNA (β 1) der Versuchssprobe und die untere (kleinere und damit schneller laufende) Bande aus der konkurrierenden TGF- β 1-Referenz-Standard-cDNA (RS β 1). In Spalte A findet sich die Negativkontrolle und in Spalte H die 100bp-Leiter.

2) Berechnung des Logarithmus des Quotienten aus Densität der TGF- β 1-Referenz-Standard-cDNA-Bande und Densität der TGF- β 1-cDNA-Bande (siehe Tabelle 6).

Tacrolimus	Bande	B Vf=1	C Vf=1/3	D Vf=(1/3) ²	E Vf=(1/3) ³	F Vf=(1/3) ⁴	G Vf=(1/3) ⁵
0 ng/ml	β 1		4858,24	6327,79	9790,57	12823,57	15904,02
	RS β 1		15338,71	11433,25	8414,01	5581,53	4153,98
	lg (RS β 1/ β 1)		0,4993	0,2569	-0,0658	-0,3613	-0,5830
10 ng/ml	β 1	4747,89	7485,32	12086,96	14042,61	16953,00	
	RS β 1	17989,11	16461,26	13890,03	8585,26	5922,00	
	lg (RS β 1/ β 1)	0,5785	0,3423	0,0604	-0,2137	-0,4568	
50 ng/ml	β 1	5517,50	8026,34	12488,48	16754,26	18757,45	
	RS β 1	21356,00	18009,18	14929,75	10440,08	6861,29	
	lg (RS β 1/ β 1)	0,5878	0,3510	0,0775	-0,2054	-0,4368	
100 ng/ml	β 1	3899,22	5371,44	7785,22	11869,33	13857,74	
	RS β 1	16414,00	12755,00	9635,30	7151,13	4836,49	
	lg (RS β 1/ β 1)	0,6242	0,3756	0,0926	-0,2201	-0,4572	

Tabelle 6: Gemessene Densitäten der TGF- β 1-cDNA-Banden aus dem Versuch C721310. Die Densität der in Abbildung 9 dargestellten Banden der TGF- β 1-cDNA (β 1) und der TGF- β 1-Referenz-Standard-cDNA (RS β 1) wurde mit der 1D Image Analysis Software bestimmt. Im Anschluss an die Messung wurde vom Quotienten RS β 1/ β 1 der Logarithmus zur Basis 10 (lg) berechnet. Aufgrund zu geringer Bandintensitäten von TGF- β 1-cDNA in Spalte B (Verdünnungsfaktor Vf der TGF- β 1-Referenz-Standard-cDNA = 1) bei Inkubation ohne Tacrolimus und der TGF- β 1-Referenz-Standard-cDNA in Spalte G (Vf = $(1/3)^5$) bei Inkubation mit 10, 50 und 100 ng/ml Tacrolimus konnte keine Messung mit der Software erfolgen, weshalb die entsprechenden Felder leer blieben.

3) Graphische Darstellung der Messergebnisse und Berechnung einer Regressionsgeraden, deren Schnittpunkt mit der x-Achse (Verdünnungsfaktor der TGF- β 1-Referenz-Standard-cDNA) denjenigen Punkt darstellt, an dem die Menge an TGF- β 1-cDNA und die Menge an TGF- β 1-Referenz-Standard-cDNA im PCR-Ansatz gleich groß sein würden (siehe Abbildung 10).

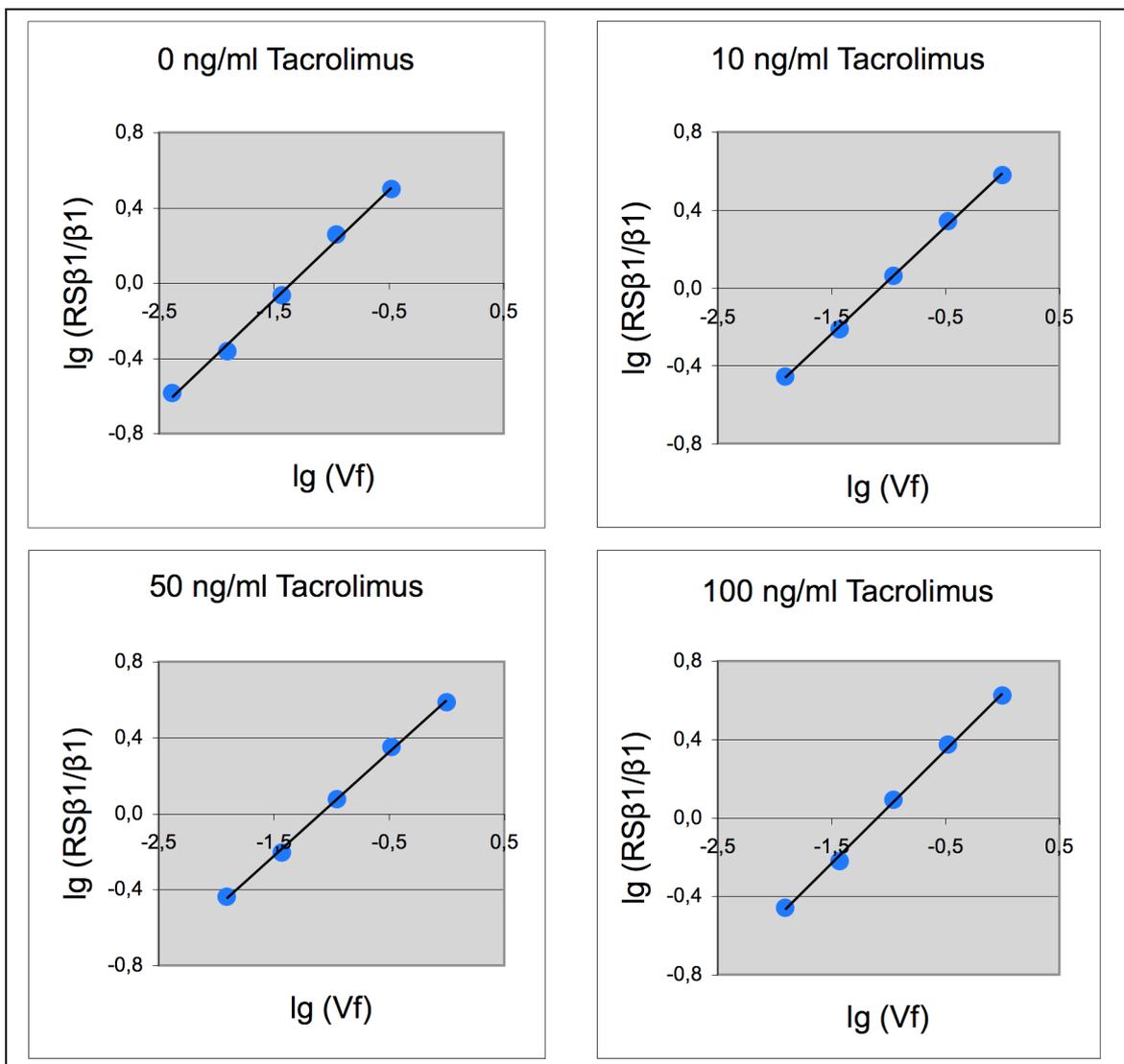


Abbildung 10: Die vier Graphen entsprechen den vier eingesetzten Tacrolimus-Konzentrationen 0, 10, 50 und 100 ng/ml im Versuchsansatz. Der Verdünnungsfaktor (Vf) der TGF- β 1-Referenz-Standard-cDNA ist jeweils gegen den Quotienten aus der Densität der TGF- β 1-Referenz-Standard-cDNA-Bande (RS β 1) und der Densität der TGF- β 1-cDNA-Bande (β 1) aufgetragen. Da es in der PCR zu einer exponentiellen Vervielfachung des Ausgangsproduktes kommt und die Verdünnung der TGF- β 1-Referenz-Standard-cDNA exponentiell erfolgte, sind beide logarithmisch aufgetragen. Die aus den Werten interpolierte Regressionsgerade schneidet die x-Achse an dem Punkt, an dem die Menge der aus der Versuchsprobe gewonnenen TGF- β 1-cDNA und die bekannte Menge der TGF- β 1-Referenz-Standard-cDNA gleich sein würden.

4) Angabe der Ergebnisse als Relation (R) der Menge an TGF- β 1-mRNA in den Mesangiumzellen, die mit Tacrolimus inkubiert wurden und der Menge an TGF- β 1-mRNA in den Mesangiumzellen, die ohne Tacrolimus inkubiert wurden (Tabelle 7).

5) Durchführung der Schritte 1, 2 und 3 für die Messung der GAPDH-mRNA. GAPDH dient als Kontrollenzym, das von Zellen in konstanter Menge gebildet wird.

6) Fehlerkorrektur der Messergebnisse (R') durch den jeweiligen GAPDH-Faktor (Tabelle 7).

6.2.1.2 Übersicht TGF- β 1-mRNA

Insgesamt wurde die TGF- β 1-mRNA aus neun verschiedenen Versuchsansätzen bestimmt (Tabelle 7). Dabei wurden drei verschiedene Mesangiumzellkulturen ("A", "B" und "C") eingesetzt. Die Inkubationszeit betrug 24, 48, 72 oder 96 Stunden.

Versuch		M0	M10	M50	M100	R10	R50	R100	R'10	R'50	R'100
A242108	GAPDH	0,087	0,081	0,073	0,073	0,93	0,84	0,84	1,02	1,05	1,17
	TGF- β 1	0,060	0,057	0,053	0,059	0,95	0,88	0,98			
B242106	GAPDH	0,153	0,162	0,167	0,145	1,06	1,09	0,95	0,90	1,20	1,15
	TGF- β 1	0,045	0,043	0,059	0,049	0,96	1,31	1,09			
B482206	GAPDH	0,042	0,051	0,052	0,053	1,21	1,24	1,26	1,01	0,94	1,04
	TGF- β 1	0,067	0,082	0,078	0,088	1,22	1,16	1,31			
B481107	GAPDH	0,066	0,062	0,049	0,050	0,94	0,74	0,76	0,95	1,13	1,17
	TGF- β 1	0,081	0,072	0,068	0,072	0,89	0,84	0,89			
B723006	GAPDH	0,122	0,097	0,102	0,106	0,80	0,84	0,87	1,05	1,08	0,90
	TGF- β 1	0,042	0,035	0,038	0,033	0,83	0,90	0,79			
B720707	GAPDH	0,283	0,257	0,251	0,299	0,91	0,89	1,06	0,96	1,14	1,00
	TGF- β 1	0,139	0,121	0,140	0,147	0,87	1,01	1,06			
B961306	GAPDH	0,091	0,105	0,109	0,109	1,15	1,20	1,20	0,92	0,83	0,77
	TGF- β 1	0,075	0,080	0,075	0,069	1,07	1,00	0,92			
C721310	GAPDH	0,098	0,107	0,116	0,116	1,09	1,18	1,18	1,77	1,52	1,50
	TGF- β 1	0,045	0,087	0,081	0,080	1,93	1,80	1,78			
C722010	GAPDH	0,126	0,127	0,131	0,130	1,01	1,04	1,03	1,94	1,88	1,46
	TGF- β 1	0,045	0,088	0,088	0,068	1,96	1,96	1,51			

Tabelle 7: TGF- β 1-rT-PCR-Ergebnisse. In der ersten Spalte ist die Kodierung der neun durchgeführten Mesangiumzellkultur-Versuche aufgeführt. Nach Durchführung der rT-PCR mit anschließender elektrophoretischer Auftrennung und graphischer Darstellung wurden die Verdünnungsfaktoren M0 - M100 (in Abhängigkeit der eingesetzten Tacrolimus-Konzentrationen 0, 10, 50 und 100 ng/ml) der Referenz-Standard-cDNA für TGF- β 1 und GAPDH, bei denen die Menge an Referenz-Standard-cDNA und TGF- β 1-, bzw. GAPDH-cDNA aus der Versuchsprobe im PCR-Ansatz gleich sein würde, berechnet. In den Spalten R10 - R100 sind die errechneten Relationen Mx/M0 für TGF- β 1 und GAPDH aufgeführt. In den Spalten R'10 - R'100 sind für TGF- β 1 die mit dem GAPDH-Quotienten korrigierten Relationen aufgeführt. GAPDH dient als Kontrollenzym, das von Zellen unabhängig in konstanter Menge gebildet wird.

Ausschließlich bei "C"- Mesangiumzellen kam es zu einer Zunahme der TGF- β 1-Expression nach 72-stündiger Inkubation mit Tacrolimus (Tabelle 7). Dabei war die Höhe der Zunahme der TGF- β 1-mRNA-Expression unabhängig von der eingesetzten Tacrolimus-Konzentration. Statistisch signifikant ($p < 0,05$, ANOVA-Schätzung mit nachfolgender Bonferroni-Testung) ließ sich dies für die Inkubation mit 10 und 50 ng/ml Tacrolimus bestätigen (Abbildung 11). In allen anderen Versuchsansätzen mit anderen Mesangiumzellkulturen ("A"+"B") kam es unabhängig von der Inkubationszeit und der eingesetzten Tacrolimus-Konzentration zu keiner Zunahme der TGF- β 1-mRNA-Expression.

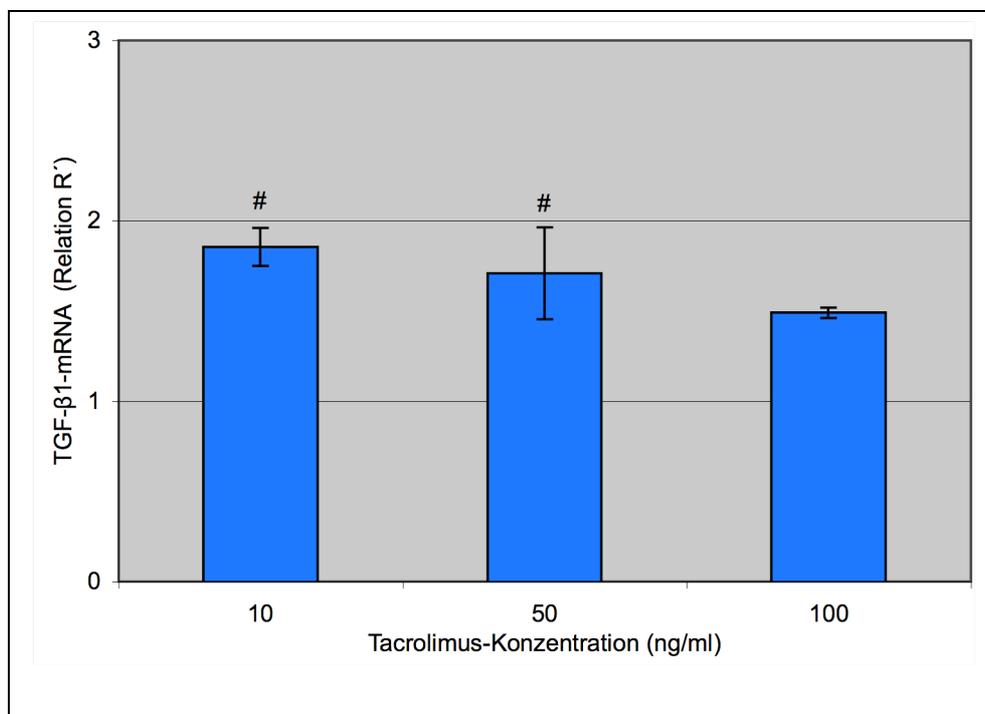


Abbildung 11: TGF- β 1-rT-PCR. Graphische Darstellung der Versuchsergebnisse der rT-PCR nach 72-stündiger Inkubation von "C"-Mesangiumzellkulturen in Anwesenheit verschiedener Tacrolimus-Konzentrationen. Abgebildet sind die Mittelwerte der mit dem GAPDH-Quotienten korrigierten Relationen R' der Menge an TGF- β 1-mRNA in den mit Tacrolimus inkubierten Mesangiumzellkulturen zur Menge an TGF- β 1-mRNA in den ohne Tacrolimus inkubierten Mesangiumzellen inklusive der einfachen Standardabweichung als Fehlerindikator. #: $p < 0,05$, ANOVA-Schätzung mit nachfolgender Bonferroni-Testung.

6.2.2 Übersicht TGF- β 1-Protein im Zellkulturüberstand

Die Mesangiumzellkulturen wurden mit verschiedenen Tacrolimus-Konzentrationen über unterschiedliche Zeiträume inkubiert. Nach Beendigung der Inkubationszeit wurde der Kultur-Überstand abgenommen und die TGF- β 1-Protein-Konzentration mit Hilfe eines ELISA gemessen. Jeder ELISA erfolgte zweimalig und jeweils im Zweifachansatz mit nachfolgender Berechnung des Mittelwertes. In Tabelle 8 sind die Mittelwerte der Versuchsergebnisse inklusive der Berechnungen von Mittelwerten und Standardabweichungen aus der Zusammenfassung mehrerer Versuche aufgeführt. In früheren Untersuchungen hat sich bei Inkubation mit Cyclosporin A unter sonst gleichen Versuchsbedingungen eine maximale Zunahme der TGF- β 1-mRNA-Expression nach 72 Stunden und eine maximale Zunahme des TGF- β 1-Proteins im Kulturüberstand nach 96 Stunden gezeigt (82). Da auch für Tacrolimus eine Zunahme der TGF- β 1-mRNA-Expression nach 72 Stunden gezeigt werden konnte (6.2.1.2) und aufgrund der noch notwendigen Translation ein um ca. 24 Stunden verzögerter Proteinanstieg zu erwarten war, wurde für die meisten Versuche ebenfalls eine Inkubationszeit von 96 Stunden gewählt.

Versuch	TGF- β 1 in pg/ml nach Stimulation mit x ng/ml Tacrolimus			
	x=0	x=10	x=50	x=100
I) A721805	201,15	186,01	165,36	203,26
B723006	76,15	87,48	79,44	93,11
B720707	124,32	148,30	116,71	150,96
	133,87 \pm 63,04	140,60 \pm 49,72	120,50 \pm 43,09	149,11 \pm 55,10
II) C721310	187,41	383,02	311,91	317,59
C722010	87,11	193,13	172,08	199,55
	137,26 \pm 70,92	288,08 \pm 134,27	242,00 \pm 98,87	258,57 \pm 83,47
III) A961109	1283,94	1126,43	1059,40	1087,54
A961809	934,46	910,23	938,43	1015,07
A961806	951,63	782,23	691,19	690,08
A962012	365,02	424,45	431,58	455,83
B961306	748,50	725,56	606,74	731,16
B962706	242,34	258,56	287,39	223,97
	754,31 \pm 391,31	704,58 \pm 317,53	669,12 \pm 293,72	700,61 \pm 327,64
IV) C962409	335,28	536,57	482,19	518,06
C960910	473,67	738,19	749,22	929,84
C961912	246,01	390,97	396,92	484,63
D960910	372,88	736,11	702,92	675,99
D961610	389,09	518,56	503,30	550,28
D962310	468,53	627,41	607,26	596,46
	380,91 \pm 85,67	591,30 \pm 135,85	573,64 \pm 136,54	625,87 \pm 163,13

Tabelle 8: Ergebnisse der TGF- β 1-ELISA-Messungen nach 72 und 96 Stunden. In der ersten Spalte ist die Kodierung der 17 durchgeführten Mesangiumzellkultur-Versuche aufgeführt. In den anderen Spalten finden sich die Messergebnisse der TGF- β 1-Protein-Konzentration nach Inkubation der Mesangiumzellen mit verschiedenen Tacrolimus-Konzentrationen (0, 10, 50 und 100 ng/ml). Die Versuche wurden in vier Gruppen I-IV zusammengefasst, da aufgrund der Erkenntnisse aus den Untersuchungen der TGF- β 1-mRNA keine Erhöhung des TGF- β 1-Proteins bei "A"- und "B"-Mesangiumzellen zu erwarten war (I: 72 Stunden Inkubationszeit, "A"- und "B"-Mesangiumzellen; II: 72 Stunden Inkubationszeit, "C"-Mesangiumzellen; III: 96 Stunden Inkubationszeit, "A"- und "B"-Mesangiumzellen; IV: 96 Stunden Inkubationszeit, "C"- und "D"-Mesangiumzellen). Bei anzunehmender annähernder Normalverteilung des TGF- β 1-Proteins wurde in den vier Gruppen jeweils der Mittelwert mit zugehöriger Standardabweichung berechnet.

Ausschließlich in der Gruppe der "C"- und "D"- Mesangiumzellen kam es zu einer Zunahme der TGF- β 1-Protein-Produktion nach Inkubation mit Tacrolimus (Tabelle 8). Statistisch signifikant ($p < 0,05$, Mann-Whitney-U-Test) ließ sich dies für die Inkubation über 96 Stunden mit 10, 50 und 100 ng/ml Tacrolimus bestätigen. Dabei war die Höhe der Zunahme unabhängig von der eingesetzten Tacrolimus-Konzentration. Für die Inkubation über 72 Stunden erreichte die zu beobachtende Zunahme keine statistische Signifikanz (Abbildung 12). In allen anderen Versuchsansätzen mit anderen

Mesangiumzellkulturen ("A" und "B") kam es zu keiner Zunahme der TGF- β 1-Protein-Produktion.

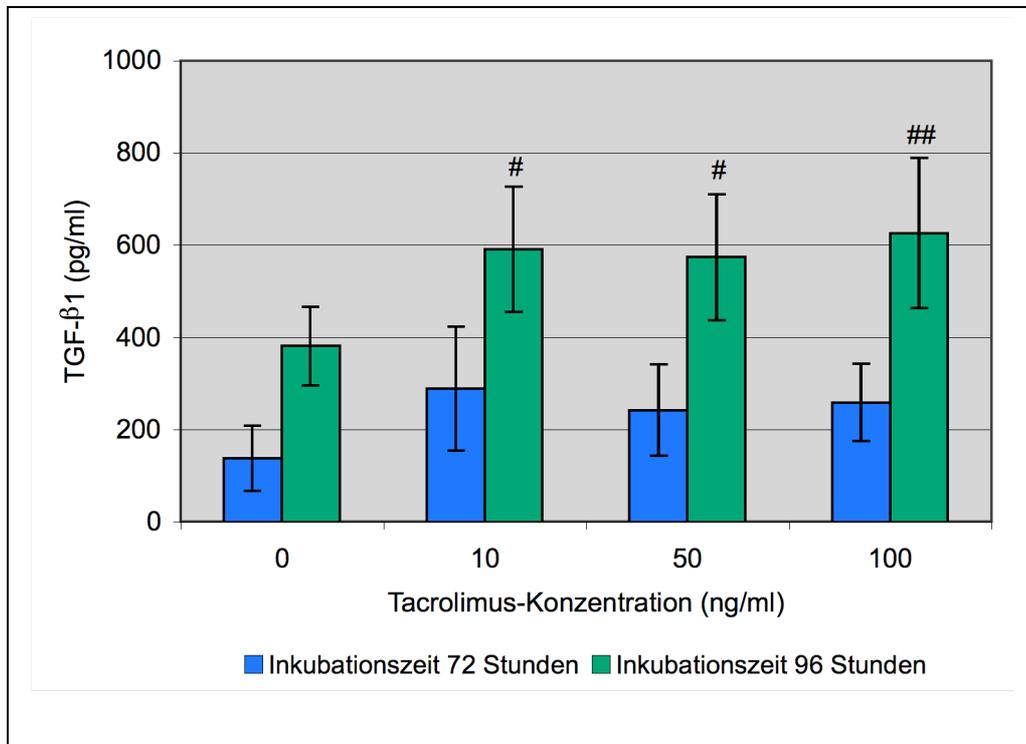


Abbildung 12: TGF- β 1-ELISA. Mittelwerte der gemessenen TGF- β 1-Protein-Konzentrationen mit den zugehörigen einfachen Standardabweichungen als Fehlerindikator. Die blauen Säulen zeigen die Mittelwerte der "C"- Mesangiumzellen nach 72stündiger Inkubation mit 0, 10, 50 und 100 ng/ml Tacrolimus. Die grünen Säulen zeigen die Mittelwerte der Gruppe der "C"- und "D"- Mesangiumzellen nach 96stündiger Inkubation mit 0, 10, 50 und 100 ng/ml Tacrolimus (#: $p < 0,05$; ##: $p < 0,01$; Mann-Whitney-U-Test).

6.3 Wirkung von Tacrolimus auf die Expression von T β RI und T β RII

6.3.1 Übersicht T β RI- und T β RII-mRNA

Mesangiumzellen wurden mit verschiedenen Konzentrationen Tacrolimus (0, 10, 50 und 100 ng/ml) über unterschiedliche Zeitintervalle (24, 48, 72 und 96 Stunden) kultiviert. Anschließend erfolgten die Isolierung der RNA und die Bestimmung des Gehaltes an T β RI- und T β RII-mRNA mit der kompetitiven rT-PCR. Die Versuchsergebnisse (Tabelle 9) wurden als Relation der Menge an T β RI- bzw. T β RII-mRNA in der mit Tacrolimus inkubierten Probe zur Menge an T β RI- bzw. T β RII-mRNA in der ohne Tacrolimus inkubierten Probe angegeben (siehe 6.2.1.1).

Versuch		M0	M10	M50	M100	R10	R50	R100	R'10	R'50	R'100
A242108	GAPDH	0,087	0,081	0,073	0,073	0,93	0,84	0,84			
	TβRI	0,039	0,031	0,031	0,032	0,79	0,79	0,82	0,85	0,95	0,98
	TβRII	0,037	0,034	0,036	0,040	0,92	0,97	1,08	0,99	1,16	1,29
B242106	GAPDH	0,153	0,162	0,167	0,145	1,06	1,09	0,95			
	TβRI	0,027	0,031	0,034	0,029	1,15	1,26	1,07	1,08	1,15	1,13
	TβRII	0,029	0,031	0,038	0,047	1,07	1,31	1,62	1,01	1,20	1,71
B482206	GAPDH	0,042	0,051	0,052	0,053	1,21	1,24	1,26			
	TβRI	0,066	0,056	0,056	0,046	0,85	0,85	0,70	0,70	0,69	0,55
	TβRII	0,100	0,074	0,089	0,078	0,74	0,89	0,78	0,61	0,72	0,62
B481107	GAPDH	0,066	0,062	0,049	0,050	0,94	0,74	0,76			
	TβRI	0,029	0,023	0,015	0,023	0,79	0,52	0,79	0,84	0,70	1,05
	TβRII	0,069	0,063	0,061	0,062	0,91	0,88	0,90	0,97	1,19	1,19
B723006	GAPDH	0,122	0,097	0,102	0,106	0,80	0,84	0,87			
	TβRI	0,037	0,033	0,033	0,033	0,89	0,89	0,89	1,12	1,07	1,03
	TβRII	0,039	0,038	0,040	0,040	0,97	1,03	1,03	1,23	1,23	1,18
B720707	GAPDH	0,283	0,257	0,251	0,299	0,91	0,89	1,06			
	TβRI	0,069	0,059	0,074	0,078	0,86	1,07	1,13	0,94	1,21	1,07
	TβRII	0,220	0,168	0,190	0,210	0,76	0,86	0,95	0,84	0,97	0,90
B961306	GAPDH	0,091	0,105	0,109	0,109	1,15	1,20	1,20			
	TβRI	0,059	0,059	0,056	0,055	1,00	0,95	0,93	0,87	0,79	0,78
	TβRII	0,090	0,077	0,111	0,090	0,86	1,23	1,00	0,74	1,03	0,83
C721310	GAPDH	0,098	0,107	0,116	0,116	1,09	1,18	1,18			
	TβRI	0,088	0,071	0,094	0,076	0,81	1,07	0,86	0,74	0,90	0,73
	TβRII	0,080	0,117	0,113	0,124	1,46	1,41	1,55	1,34	1,19	1,31
C722010	GAPDH	0,126	0,127	0,131	0,130	1,01	1,04	1,03			
	TβRI	0,052	0,057	0,069	0,064	1,10	1,33	1,23	1,09	1,28	1,19
	TβRII	0,084	0,099	0,095	0,100	1,18	1,13	1,19	1,17	1,09	1,15

Tabelle 9: Ergebnisübersicht TβRI- und TβRII-rT-PCR. In der ersten Spalte ist die Kodierung der neun durchgeführten Mesangiumzellkultur-Versuche aufgeführt. Nach Durchführung der rT-PCR mit anschließender elektrophoretischer Auftrennung und graphischer Darstellung wurden die Verdünnungsfaktoren M0 - M100 (in Abhängigkeit der eingesetzten Tacrolimus-Konzentrationen 0, 10, 50 und 100 ng/ml) der Referenz-Standard-cDNA für TβRI, TβRII und GAPDH, bei denen die Menge an Referenz-Standard-cDNA und TβRI-, bzw. TβRII-, bzw. GAPDH-cDNA aus der Versuchsprobe im PCR-Ansatz gleich sein würde, berechnet. In den Spalten R10 - R100 sind die errechneten Relationen Mx/M0 für TβRI, TβRII und GAPDH aufgeführt. In den Spalten R'10 - R'100 sind für TβRI und TβRII die mit dem GAPDH-Quotienten korrigierten Relationen aufgeführt. GAPDH dient als Kontrollenzym, das von Zellen unabhängig in konstanter Menge gebildet wird.

Eine Änderung der TβRI- oder der TβRII-mRNA-Expression in Mesangiumzellen, die mit Tacrolimus inkubiert wurden, ließ sich nicht nachweisen. In Abbildung 13 ist die TβRI- und TβRII-mRNA-Expression von "C"-Mesangiumzellen nach 72stündiger Inkubation mit Tacrolimus dargestellt. Zu diesem Zeitpunkt wurde bei diesen Mesangiumzellen ("C") eine erhöhte TGF-β1-mRNA-Expression (siehe Abschnitt 6.2.1.2) beobachtet. Auch in dieser Sub-Gruppe zeigte sich jedoch keine statistisch signifikante Änderung

der T β RI- und T β RII-mRNA-Expression nach Inkubation mit Tacrolimus (ANOVA-Schätzung mit nachfolgender Bonferroni-Testung).

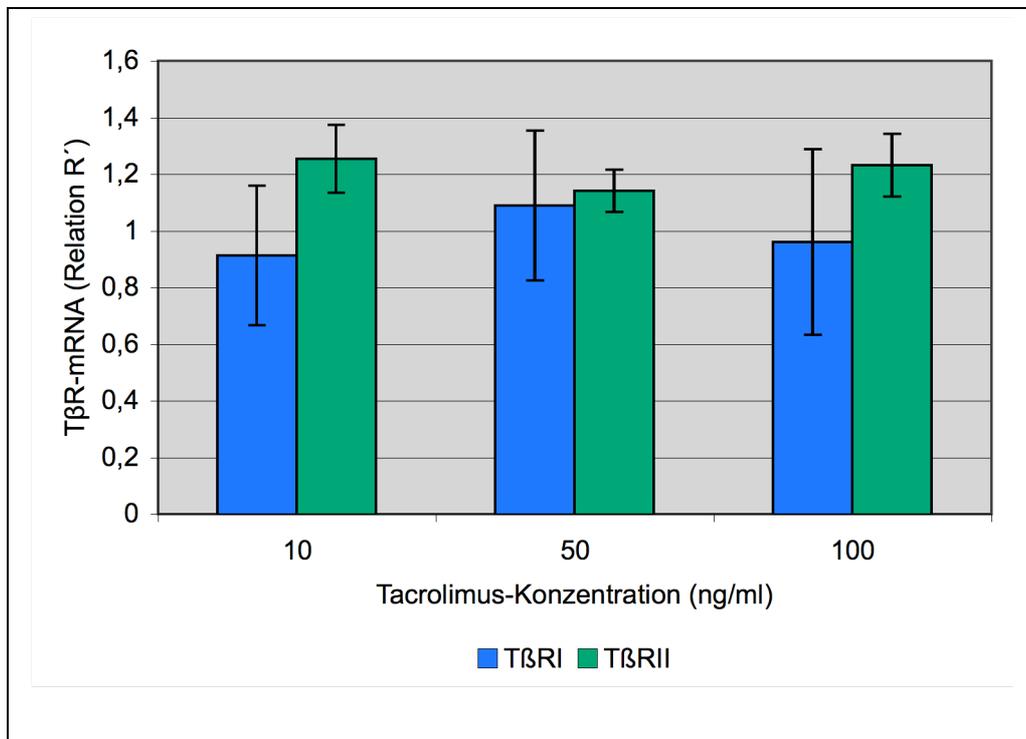


Abbildung 13: T β R-rT-PCR nach 72-stündiger Inkubation von "C"-Mesangiumzellkulturen in Anwesenheit verschiedener Tacrolimus-Konzentrationen. Abgebildet sind die Mittelwerte der mit dem GAPDH-Quotienten korrigierten Relationen R' der Menge an T β RI-mRNA (bzw. T β RII-mRNA) in den mit Tacrolimus inkubierten Mesangiumzellkulturen zur Menge an T β RI-mRNA (T β RII-mRNA) in den ohne Tacrolimus inkubierten Mesangiumzellen inklusive der einfachen Standardabweichung als Fehlerindikator. Eine statistisch signifikante Zunahme (ANOVA-Schätzung mit nachfolgender Bonferroni-Testung) ließ sich nicht nachweisen.

6.3.2 Übersicht T β RI- und T β RII-Protein in der Mesangiumzelle

Mesangiumzellkulturen wurden mit unterschiedlichen Konzentrationen Tacrolimus über 96 Stunden inkubiert. Nach Beendigung der Versuchszeit erfolgte die Messung der Proteine T β RI und T β RII in den Zellen mittels Western Blot. Die anschließende Chemilumineszenz-Reaktion wurde mit mindestens zwei verschiedenen Belichtungszeiten festgehalten, so dass nach densitometrischer Messung der Bandintensitäten die Bestimmung eines Mittelwertes erfolgen konnte. Die Versuchsergebnisse wurden als Relation der Menge an T β RI- bzw. T β RII-Protein in den mit Tacrolimus inkubierten Mesangiumzellen zur Menge an T β RI- bzw. T β RII-Protein in den ohne Tacrolimus inkubierten Mesangiumzellen angegeben (Tabelle 10). Als Inkubationszeit wurde 96 Stunden gewählt, da sich in früheren Untersuchungen bei Inkubation mit Cyclosporin A und sonst gleich

chen Versuchsbedingungen zu diesem Zeitpunkt eine signifikante Zunahme sowohl des T β RI- als auch des T β RII-Proteins in den Mesangiumzellen gezeigt hat (82).

A) T β RI							
Versuch	D0	D10	D50	D100	R10	R50	R100
A961109	18.463	18.297	17.560	18.502	0,99	0,95	1,00
A961809	10.082	8.406	8.185	9.254	0,83	0,81	0,92
C962409	11.720	11.091	9.971	12.837	0,95	0,85	1,10
C960910	15.905	16.635	15.509	15.179	1,05	0,98	0,95
D960910	9.186	7.198	8.233	8.348	0,78	0,90	0,91
B) T β RII							
Versuch	D0	D10	D50	D100	R10	R50	R100
A961109	4.201	4.312	4.777	4.770	1,03	1,14	1,14
A961809	40.584	38.702	33.888	40.586	0,95	0,84	1,00
C961912	76.783	72.196	70.810	66.383	0,94	0,92	0,86
C962409	81.375	89.134		104.836	1,10		1,29
D962310	81.388	86.893	81.115	64.622	1,07	1,00	0,79

Tabelle 10: T β R-Westernblot. Ergebnisse der T β RI- und T β -RII-Protein-Messungen in den Mesangiumzellen nach 96 Stunden Inkubation. In der ersten Spalte ist die Kodierung der zehn durchgeführten Mesangiumzellkultur-Versuche aufgeführt. In der mittleren Spalte sind die Absolutwerte der densitometrischen Messungen D0, D10, D50 und D100 (nach Mittelwertbildung) dargestellt. In der rechten Spalte finden sich die Relationen der Absolutwerte (R10, R50 und R100: Inkubation mit 10, 50 oder 100 ng/ml Tacrolimus / Inkubation ohne Tacrolimus). Statistisch signifikante Unterschiede zwischen den einzelnen Gruppen ließen sich nicht nachweisen (ANOVA-Schätzung mit nachfolgender Bonferroni-Testung). Im Versuch C962409 gab es bei der Messung von T β RII nach Inkubation mit 50 ng/ml Tacrolimus mittels Western Blot einen technischen Fehler, so dass keine Auswertung erfolgen konnte.

Eine Zunahme der Proteine T β RI und T β RII in Mesangiumzellen, die mit Tacrolimus inkubiert wurden, ließ sich nicht nachweisen. In Abbildung 14 ist exemplarisch die Menge an T β RI- und T β RII-Protein von "C"- und "D"-Mesangiumzellen nach 96stündiger Inkubation mit Tacrolimus dargestellt. Zu diesem Zeitpunkt wurde bei "C"-Mesangiumzellen eine Zunahme von TGF β 1 im Zellkulturüberstand nachgewiesen (siehe Abschnitt 6.2.2). Auch in dieser Sub-Gruppe zeigte sich jedoch keine statistisch signifikante Änderung des T β RI- und T β RII-Proteins in Mesangiumzellen nach Inkubation mit Tacrolimus (ANOVA-Schätzung mit nachfolgender Bonferroni-Testung).

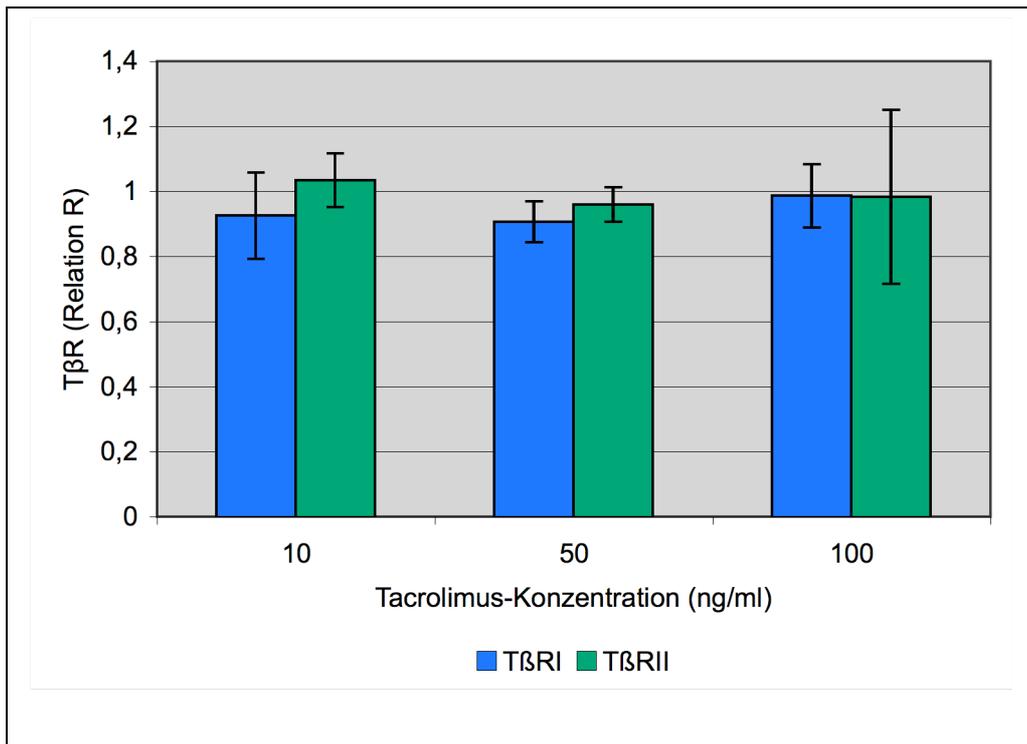


Abbildung 14: TβR-Westernblot. Graphische Darstellung der Mittelwerte der Relationen der TβRI- und TβRII-Proteinkonzentrationen (mit x ng/ml Tacrolimus inkubierte Zellen / ohne Tacrolimus inkubierte Zellen) in den "C"- und "D"-Mesangiumzellen mit den zugehörigen einfachen Standardabweichungen als Fehlerindikator. Die blauen Säulen zeigen die Mittelwerte von TβRI nach 96stündiger Inkubation mit 0, 10, 50 und 100 ng/ml Tacrolimus. Die grünen Säulen zeigen die Mittelwerte von TβRII nach 96stündiger Inkubation mit 0, 10, 50 und 100 ng/ml Tacrolimus. Ein statistisch signifikanter Unterschied in den Gruppen zeigte sich nicht (ANOVA-Schätzung mit nachfolgender Bonferroni-Testung).

6.4 Unterschiede in der TGF- β 1-Synthese

In den Versuchen zeigte sich ein auffällig differierendes Ansprechen der Mesangiumzellkulturen, die von unterschiedlichen Sprague-Dawley-Ratten gewonnenen worden waren, auf die Inkubation mit Tacrolimus. Deshalb wurde eine statistische Untersuchung durchgeführt, in der die Ergebnisse der Gruppe der "A"- und "B"-Zellkulturen mit den Ergebnissen der "C"- und "D"-Zellkulturen bezüglich der TGF- β 1-Produktion auf mRNA-Ebene und auf Proteinebene verglichen wurden.

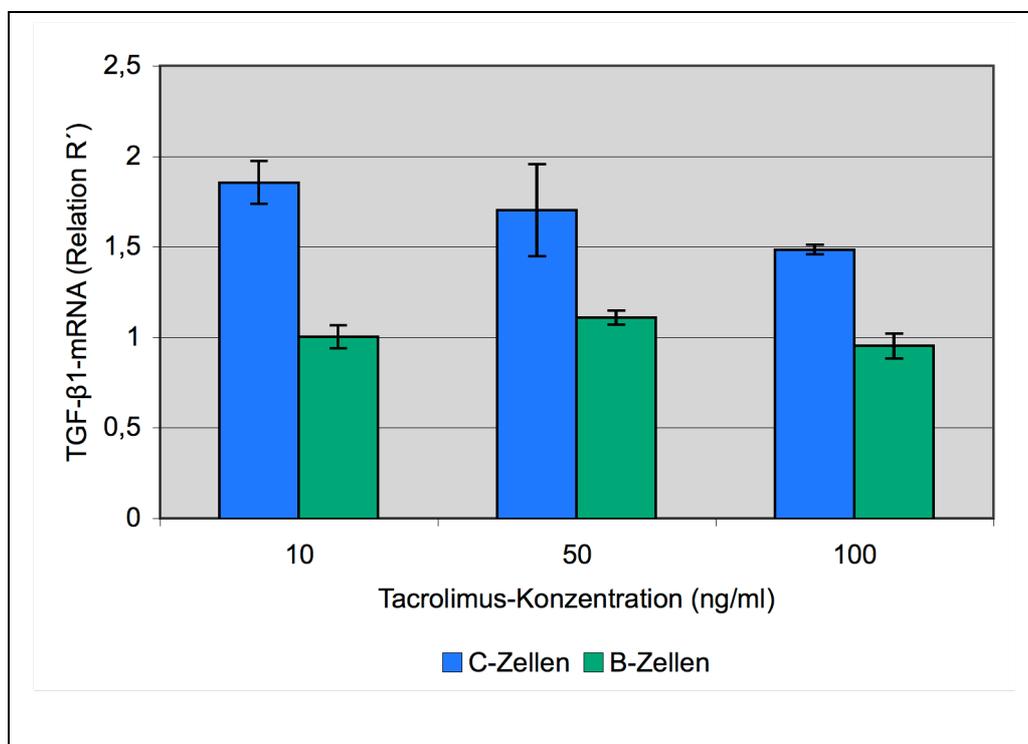


Abbildung 15: TGF- β 1-rT-PCR. Vergleich der Mittelwerte der mit dem GAPDH-Quotienten korrigierten Relationen R' der Menge an TGF- β 1-mRNA in den mit Tacrolimus inkubierten Mesangiumzellkulturen zur Menge an TGF- β 1-mRNA in den ohne Tacrolimus inkubierten Mesangiumzellen inklusive der einfachen Standardabweichung als Fehlerindikator in der Gruppe der "B"-Mesangiumzellen mit der Gruppe der "C"-Mesangiumzellen im 72 Stunden-Versuch nach Inkubation mit 10, 50 oder 100 ng/ml Tacrolimus (zugrunde liegende Messwerte in Tabelle 7). Ein statistisch signifikanter Unterschied (ANOVA-Schätzung mit nachfolgender Bonferroni-Testung) ließ sich nicht nachweisen.

Nach 72 Stunden Inkubation mit Tacrolimus wurden keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen in Bezug auf die TGF- β 1-mRNA-Produktion gefunden (Abbildung 15).

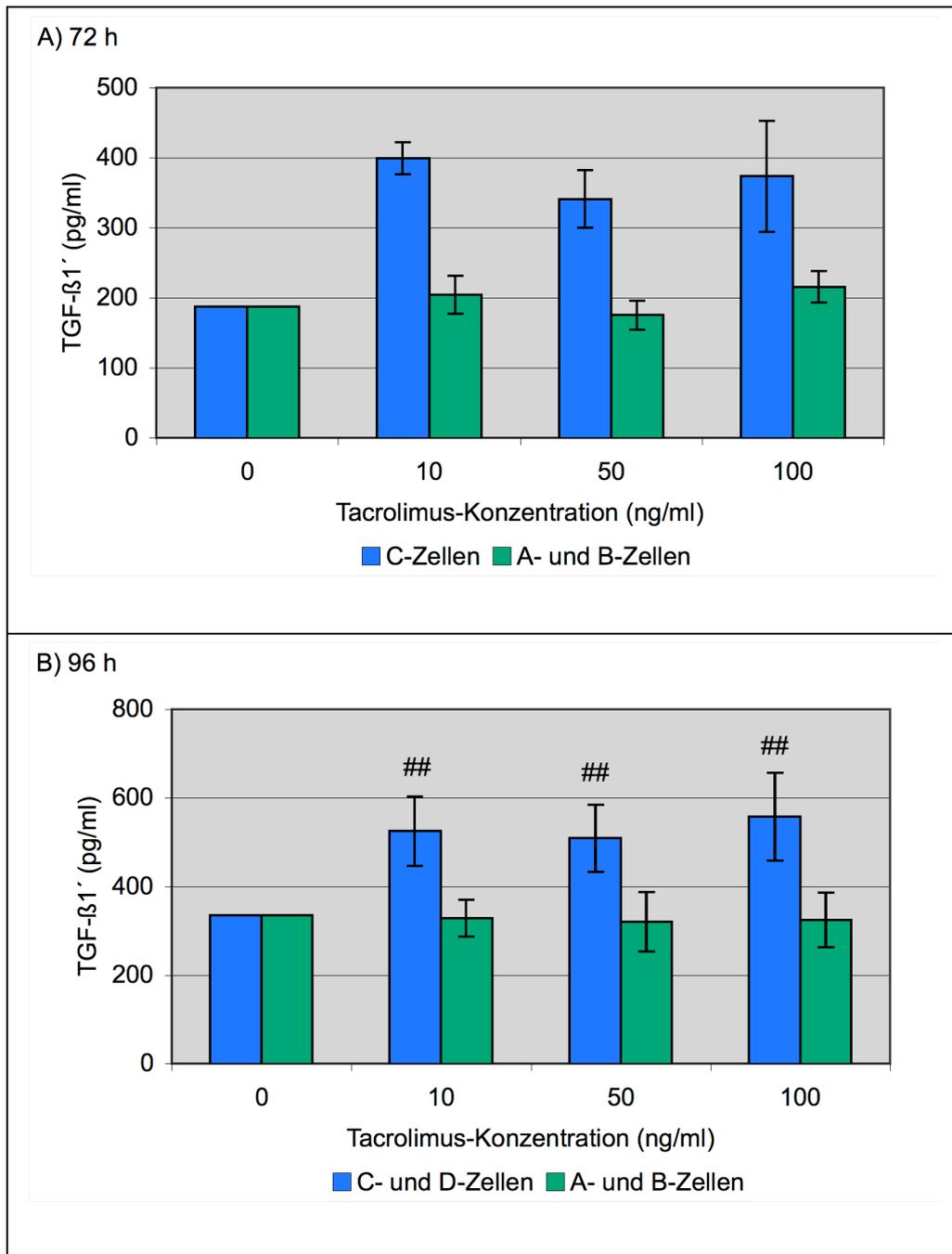


Abbildung 16: TGF- β 1-ELISA. Vergleich der Mittelwerte der normierten TGF- β 1-Konzentrationen (TGF- β 1') der Gruppe der "A"- und "B"-Mesangiumzellen mit "C"-Mesangiumzellen nach 72stündiger Inkubation (zugrunde liegende Messwerte in Tabelle 8). B) Vergleich der Mittelwerte der normierten TGF- β 1-Konzentrationen (TGF- β 1') der Gruppe der "A"- und "B"-Mesangiumzellen mit "C"- und "D"-Mesangiumzellen nach 96stündiger Inkubation (zugrunde liegende Messwerte in Tabelle 8). ##: $p < 0,01$; Mann-Whitney-U-Test.

Auf Proteinebene waren die Unterschiede in der TGF- β 1-Produktion zwischen den Gruppen nach 72 Stunden statistisch nicht signifikant. Nach 96 Stunden Inkubationszeit zeigten sich dagegen signifikante Unterschiede nach Stimulation mit Tacrolimus (Abbildung 16).

7 Diskussion

7.1 Zellkulturversuche

Im Verlauf der durchgeführten Zellkulturversuche zeigte sich ein unterschiedliches Ansprechen der verschiedenen Mesangiumzellkulturen auf die Inkubation mit Tacrolimus, weshalb an dieser Stelle eine kritische Bewertung der Methode erfolgt.

Die Versuche erfolgten mit verschiedenen Mesangiumzellkulturen, die zu unterschiedlichen Zeitpunkten aus Nieren von Sprague-Dawley-Ratten isoliert wurden. Die Isolierung der Mesangiumzellen ist eine seit Jahren etablierte, mehrfach beschriebene und veröffentlichte Methode [85, 86, 94]. Im Verlauf der Zellkulturpassagierungen erfolgten regelmäßige morphologische Beurteilungen der Zellen. Die Beurteilung der Zellen erfolgte parallel durch Frau Dr. Kerstin Dell, die eine langjährige Erfahrung im Arbeiten mit Mesangiumzellkulturen besitzt [82]. Bei dem geringsten Anhalt für das Auftreten von Veränderungen der Zellen oder dem Vorhandensein anderer Zellen wurde die Kultivierung der Mesangiumzellen abgebrochen.

Insgesamt ist somit ein methodischer Fehler unwahrscheinlich, womit von einem echten Effekt ausgegangen werden muss, der in 7.4 diskutiert wird. Zunächst soll aber auf die Versuche mit denjenigen Mesangiumzellen eingegangen werden, bei denen sich eine signifikante Änderung der TGF- β 1-Synthese nach Inkubation mit Tacrolimus nachweisen ließ (7.2 und 7.3).

7.2 Wirkung von Tacrolimus auf die TGF- β 1-Synthese

Sowohl auf mRNA- als auch auf Proteinebene zeigte sich eine gesteigerte TGF- β 1-Synthese nach Inkubation der Mesangiumzellen mit Tacrolimus. Die Tatsache, dass der Effekt auf mRNA-Ebene bei einer Konzentration von 100 ng/ml nicht signifikant war, ist vermutlich darauf zurückzuführen, dass die Zunahme der TGF- β 1-Synthese in Relation zur Anzahl der Versuche zu gering war. Somit wurde gezeigt, dass zumindest ein Teil der systemisch [95] und in der Niere [83, 96] nachgewiesenen Erhöhung von TGF- β 1 unter immunsuppressiver Therapie mit Tacrolimus durch eine gesteigerte Synthese von TGF- β 1 in Mesangiumzellen erklärt werden kann.

Eine Dosisabhängigkeit konnte in dieser Arbeit nicht gezeigt werden. Die Ursache hierfür ist vermutlich eine bereits bei einer Konzentration von 10 ng/ml bestehende maxima-

le Wirkung von Tacrolimus auf Mesangiumzellen. Tacrolimus liegt in vivo zu 95 % an Erythrozyten gebunden vor. Da nur die freie Fraktion von Tacrolimus im Plasma pharmakologisch aktiv ist, hätten die eingesetzten Tacrolimus-Konzentrationen retrospektiv niedriger gewählt werden müssen. So wurden in nachfolgenden Arbeiten zum profibrotischen Effekt von Tacrolimus auf Mesangiumzellen vergleichsweise niedrigere Tacrolimus-Konzentrationen (0,8 bis 8 ng/ml) gewählt [97].

7.3 Wirkung von Tacrolimus auf die Expression von T β RI und T β RII

Weder auf mRNA- noch auf Proteinebene zeigte sich nach Inkubation mit Tacrolimus eine erhöhte Expression der beiden Rezeptoren T β RI und T β RII in Mesangiumzellen. Daraus lässt sich folgern, dass die Wirkung von TGF- β 1 an der Mesangiumzelle nicht durch eine erhöhte Expression der Zielrezeptoren potenziert wird.

Auf der anderen Seite fanden Bing et al. bei Untersuchungen von Ratten, die mit Tacrolimus behandelt worden waren, eine vermehrte renale Expression von T β RI und T β RII mittels in situ-Hybridisierung und Immunhistochemie [96]. Dabei wurde allerdings nicht darauf eingegangen von welchen Zellen die Rezeptoren exprimiert wurden. Die vermehrte renale Expression von T β RI und T β RII in vivo könnte somit entweder durch andere Zellen verursacht sein oder durch in vivo-Interaktionen, die in der isolierten Mesangiumzellkultur nicht abgebildet werden können.

7.4 Unterschiedliches Ansprechen von Mesangiumzellen auf Tacrolimus

In den Versuchen zeigte sich ein unterschiedliches Ansprechen der Mesangiumzellen auf die Inkubation mit Tacrolimus. Da die Mesangiumzellkulturen aus verschiedenen Sprague-Dawley-Ratten zu unterschiedlichen Zeitpunkten isoliert worden waren, liegt die Vermutung nahe, dass genetische Faktoren ursächlich für das unterschiedliche Ansprechen waren.

Zahlreiche Forschungsgruppen befassen sich aktuell mit der Suche nach genetischen Risikofaktoren für die Entwicklung von chronischen Nierenerkrankungen im Allgemeinen und für die Entwicklung einer chronischen Transplantatschädigung im Besonderen. Aufgrund der wichtigen Rolle von TGF- β 1 bei der Entwicklung von Fibrosevorgängen haben Awad et al. die genetische Regulation von TGF- β 1 untersucht [98]. Sie identifizierten fünf Polymorphismen im TGF- β 1-Gen, zwei in der Promotorregion, eine in einer nicht-translatierten Region und zwei in der Signalsequenz (Kodon 10 und Kodon 25).

Bei der anschließenden Untersuchung von Leukozyten-Kulturen von gesunden Probanden mit Polymorphismen im Kodon 25 zeigten sich signifikante Unterschiede in der TGF- β 1-Produktion. Zudem waren Polymorphismen im Kodon 25 mit der Ausbildung einer Lungenfibrose vor und nach Lungentransplantation und Polymorphismen im Kodon 10 mit der Ausprägung einer Lungenfibrose vor Transplantation assoziiert [98].

Nach der Entdeckung der verschiedenen TGF- β 1-Polymorphismen erfolgten zahlreiche Untersuchungen mit der Fragestellung, ob der TGF- β 1-Genotyp ein unabhängiger Risikofaktor für die Entwicklung einer chronischen Nierenschädigung ist, nicht zuletzt vor dem Hintergrund einer immunsuppressiven Erhaltungstherapie mit Calcineurin-Inhibitoren.

Van de Wetering et al. untersuchten 465 Patienten, die zwischen 1984 und 2005 eine Herztransplantation erhalten hatten. Alle Patienten wurden mit einer Calcineurininhibitor-basierten immunsuppressiven Erhaltungstherapie behandelt. Es zeigte sich, dass Patienten mit einem bestimmten Polymorphismus im Kodon 10 (Leu \rightarrow Pro) und im Kodon 25 (Arg \rightarrow Pro) signifikant häufiger bzw. früher ein chronisches Nierenversagen entwickelten [99]. Baan et al. untersuchten 168 Patienten, die ebenfalls eine Herztransplantation erhalten hatten und anschließend mit Cyclosporin A behandelt wurden. Sie wiesen nach, dass Patienten mit einem Polymorphismus im Kodon 10 (Leu \rightarrow Pro) signifikant häufiger eine höhergradige Niereninsuffizienz (definiert durch einen Kreatininwert größer 250 μ mol/l) entwickelten [100].

Mytilineos et al. untersuchten Blutproben von 2298 Patienten nach Erstnierentransplantation und 1901 Patienten nach Retransplantation im Hinblick auf TGF- β 1-Polymorphismen im Kodon 10 und 25. Dabei zeigte sich kein Unterschied im Langzeit-Transplantatüberleben zwischen den verschiedenen Genotypen [101]. In einer Metaanalyse von Thakkinstian et al., die den Zusammenhang zwischen Polymorphismen im TGF- β 1-Gen und dem Outcome nach Nierentransplantation (chronische Transplantatschädigung, Transplantatversagen, Rejektion) untersuchte, zeigten sich ebenfalls keine statistisch signifikanten Unterschiede [102].

Die dargestellten Studien zur Rolle von Polymorphismen im TGF- β 1-Gen bei der Entwicklung einer chronischen Transplantatschädigung zeigen somit differierende Ergebnisse. Die Tatsache, dass TGF- β 1 einerseits immunsuppressive Eigenschaften besitzt, andererseits aber durch seine profibrotischen Effekte wesentlich zur chronischen Transplantatschädigung beitragen kann, ist zumindest teilweise eine Erklärung für diese

widersprüchlichen Beobachtungen. Zudem wurden die genetischen Untersuchungen ausschließlich bei den Empfängern durchgeführt. Die gemachten Beobachtungen und die daraus resultierenden Ergebnisse sollten dazu führen, dass bei zukünftigen Untersuchungen sowohl Spender als auch Empfänger auf genetische Polymorphismen untersucht werden. Daraus resultieren könnte eine weitere Individualisierung der immunsuppressiven Therapiestrategie.

Für die Interpretation der in dieser Arbeit gefundenen Unterschiede zwischen den Mesangiumzellkulturen bzgl. der Produktion von TGF- β 1 ist die Kenntnis von relevanten Polymorphismen im TGF- β 1-Gen entscheidend. Um einen möglichen Zusammenhang zwischen Polymorphismen im TGF- β 1-Gen und der Produktion von TGF- β 1 nachzuweisen, müssen Versuche mit Mesangiumzellkulturen, deren Polymorphismen im TGF- β 1-Gen bekannt sind, durchgeführt werden.

7.5 Vergleich mit Cyclosporin A

Seit der Einführung von Tacrolimus wurden zahlreiche Untersuchungen an Zellkulturen und Nierenbiopsien sowie klinische Studien durchgeführt, die insbesondere den Vergleich mit Cyclosporin A betrafen. Aufgrund der bekannten profibrotischen Wirkung von TGF- β 1 erfolgten insbesondere experimentelle Vergleiche der Wirkung von Cyclosporin A und Tacrolimus auf die Regulation von TGF- β 1 und seiner Rezeptoren T β RI und T β RII. Mohamed et al. zeigten mittels Immunhistochemie an humanen Transplantatnieren-Biopsien, dass unter Therapie mit Cyclosporin A signifikant mehr TGF- β 1 exprimiert wird als unter Therapie mit Tacrolimus [103]. Esposito et al. inkubierten humane Glomeruli mit Tacrolimus oder Cyclosporin A. Dabei konnten sie auf mRNA-Ebene zeigen, dass es unter Inkubation mit Cyclosporin A im Gegensatz zu Tacrolimus zu einer gesteigerten Expression von TGF- β 1 kommt [104]. Bicknell et al. fanden dagegen keinen Unterschied in der TGF- β 1-mRNA-Expression zwischen Nierenbiopsien von Patienten, die mit Tacrolimus oder Cyclosporin A behandelt worden waren [105].

Waiser et al. zeigten am Zellkulturmodell, dass es nach Inkubation von Mesangiumzellen mit Cyclosporin A zu einer gesteigerten Expression der Rezeptoren T β RI und T β RII kommt [82]. Passend zu der in Kapitel 6.3 gezeigten fehlenden Zunahme der Expression von T β RI und T β RII in Mesangiumzellen nach Inkubation mit Tacrolimus zeigten Baan et al., dass es nach Therapiewechsel von Cyclosporin A auf Tacrolimus zu einer signifikanten Senkung der Expression von T β RI in peripheren

Lymphozyten und Monozyten kommt [106]. Bing et al. behandelten Sprague-Dawley-Ratten 35 Tage mit Tacrolimus oder Cyclosporin A und untersuchten anschließend semiquantitativ die Expression von T β RI und T β RII im Nierengewebe. Zwar fand sich auch nach Tacrolimus-Behandlung eine vermehrte Expression von T β RI und T β RII, allerdings war diese signifikant niedriger als nach Behandlung mit Cyclosporin A [96].

Zusammenfassend kann aufgrund der Datenlage vermutet werden, dass unter Therapie mit Cyclosporin A TGF- β 1 und seine Rezeptoren T β RI und T β RII in der Niere stärker exprimiert werden als unter Therapie mit Tacrolimus. Ob sich dieser Unterschied in einem besseren Transplantatüberleben widerspiegelt, wurde in vielen klinischen Studien untersucht.

Webster et al. führten 2005 eine Metaanalyse mit 30 Studien und 4102 eingeschlossenen Patienten durch [107]. Dabei zeigte Tacrolimus in Bezug auf das Auftreten akuter und steroidrefraktärer Rejektionen nach einem Jahr einen signifikanten Vorteil gegenüber Cyclosporin A. Auch in Bezug auf das Transplantatüberleben (zensiert für "Tod mit funktionierendem Transplantat") und das Auftreten einer chronischen Transplantatschädigung war Tacrolimus überlegen (Beobachtungszeitraum der untersuchten Studien: 3 Monate bis 5 Jahre). Andererseits fand sich unter Therapie mit Tacrolimus ein signifikant häufigeres Auftreten von Diabetes mellitus sowie gastrointestinalen und neurologischen Nebenwirkungen [107].

In der Folge veröffentlichten Shihab et al. eine Studie mit 197 nierentransplantierten Patienten, deren immunsuppressive Erhaltungstherapie zu Studienbeginn auf Cyclosporin A basierte [108]. Bei zwei Drittel der Patienten wurde die Therapie von Cyclosporin A auf Tacrolimus umgestellt, während das andere Drittel weiter Cyclosporin A erhielt. Ausschlusskriterium war der histologische Nachweis einer moderaten oder schweren akuten Rejektion während der letzten sechs Monate. Die Patienten unter Therapie mit Tacrolimus wiesen signifikant niedrigere Kreatininspiegel, ein signifikant selteneres Auftreten von Hyperlipidämien und signifikant niedrigere Raten von kardialen Ereignissen auf. Im eigentlichen Endpunkt, nämlich der 5-Jahres-Transplantat-Überlebensrate, zeigten sich jedoch keine signifikanten Unterschiede [108]. Jevnikar et al. führten eine ähnliche Studie mit 106 Patienten durch, die ebenfalls keinen Unterschied im 5-Jahres-Transplantat-Überleben zwischen der Cyclosporin A-basierten und der Tacrolimus-basierten Therapie erbrachte [109].

Opelz und Döhler untersuchten retrospektiv Daten von 51.303 Patienten, die zwischen 1998 und 2007 in Europa, Nordamerika oder in Australien transplantiert worden waren. Dabei zeigten sich bei den mit Tacrolimus behandelten Patienten zwar niedrigere Kreatininspiegel im Vergleich zu den mit Cyclosporin A behandelten Patienten, erneut aber fand sich kein Unterschied im 5-Jahres-Transplantat-Überleben [110].

Der zwischenzeitlich vermutete Therapievorteil von Tacrolimus gegenüber Cyclosporin A in Bezug auf das Langzeit-Transplantatüberleben kann somit aufgrund der bestehenden Datenlage nicht bestätigt werden. Allerdings könnten die signifikant niedrigeren Kreatininspiegel ein Hinweis dafür sein, dass sich die fibrotischen Umbauvorgänge in der Niere erst bei längeren Beobachtungszeiträumen auf das Transplantatüberleben auswirken. Deshalb müssen die Ergebnisse von Studien mit noch längeren Nachbeobachtungszeiträumen abgewartet werden.

8 Abkürzungsverzeichnis

Abkürzung	Bedeutung
ACE	Angiotensin-konvertierendes Enzym (englisch: angiotensin converting enzyme)
ADAMs	Bezeichnung einer Genfamilie von Metalloproteinasen (engl.: a disintegrin and metalloproteinase)
Ag	Antigen
ALK	Aktivin-Rezeptor-ähnliche Kinase (engl.: activin receptor-like kinase)
ANOVA	einfaktorielle Varianzanalyse (engl.: analysis of variance)
APD	automatische Peritonealdialyse
APS	Ammoniumpersulfat
ATP	Adenosintriphosphat
Arg	Arginin
Banff	Ort in der kanadischen Provinz Alberta
BCA	Bicinchoninsäure (engl.: bicinchoninic acid)
BMPs	knochenmorphogenetische Proteine (engl.: bone morphogenetic proteins)
bp	Basenpaar
C4d	Komplementspaltprodukt
CAI	chronische Transplantatschädigung (engl.: chronic allograft injury)
CAN	chronische Transplantatnephropathie (engl.: chronic allograft nephropathy)
CAPD	kontinuierlich ambulante Peritonealdialyse
CD	Gruppen immunphänotypischer Oberflächenmerkmale von Zellen (engl.: cluster of differentiation)
cDNA	Komplementär-DNA
CM	Calmodulin
CN	Calcineurin
CNI	Calcineurininhibitor
CO ₂	Kohlendioxid
Co-SMAD	kooperative SMAD-Proteine

CRAC	Kalzium-abhängige Kalziumkanäle (engl.: Ca²⁺ release activated Ca²⁺ channel)
cRNA	Komplementär-RNA
CTP	Cytosintriphosphat
CyA	Cyclosporin A
Cyp	Cyclophilin
DBS	lipidfreies Rinderserum (engl.: delipidized bovine serum)
DAG	Diacylglycerol
DEPC-H ₂ O	mit Diethylpyrocarbonat vorbehandeltes Wasser
DMEM	Dulbecco's Modifizierte Medien (engl.: Dulbecco's modified eagle's medium)
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
DSO	Deutsche Stiftung Organtransplantation
DTT	Dithiothreitol
ECL	Elektrochemilumineszenz
ECM	extrazelluläre Matrix
EDTA	Ethylendiamin-Tetraessigsäure
ELISA	antikörperbasiertes Nachweisverfahren (engl.: enzyme linked immunosorbent assay)
EMT	epithelial-mesenchymale Transformation
ER	endoplasmatisches Retikulum
FCS	fetales Kälberserum (engl. Fetal Calf Serum)
FK	Fermentek Katalog
FKBP	FK 506-bindendes Protein
GAPDH	Glyceraldehyd-3-Phosphat Dehydrogenase
GFR	Glomeruläre Filtrationsrate
GMP	Guanosinmonophosphat
GTP	Guanosintriphosphat
HCl	Salzsäure
HD	Hämodialyse
HDF	Hämodiafiltration
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-Piperazinyl)-Ethansulfonsäure
HF	Hämodiafiltration

HLA	humanes Leukozytenantigen
HPLC	Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (engl.: high-performance liquid chromatography)
HRP	Meerrettichperoxidase (engl.: horseradish peroxidase)
HST	Harnstoff
IL-2	Interleukin 2
INF- γ	Interferon Gamma
IP3	Inositol-1,4,5-Triphosphat
I-SMAD	inhibitorische SMAD-Proteine
K	Clearance
K/DOQI	Kidney Dialysis Outcomes Quality Initiative
K*t/V _{HST}	Harnstoff-Clearance
LAP	Prädomäne von TGF- β (engl.: latency associated protein)
Leu	Leucin
Ig	Logarithmus zur Basis 10
LLC	großer latenter TGF- β 1-Komplex (engl.: large latent complex)
LTBP	latentes TGF- β -Bindungsprotein (engl.: latent TGF-β binding protein)
M-II	Metabolit von Tacrolimus
Mann-	
Whitney-U	Rangsummenparameter beim Mann-Whitney-U-Test
MAD	Eigenname einer Gruppe von Proteinen, der sich aus dem englischen Begriff mother against decapentaplegic ableitet
MgCl ₂	Magnesiumchlorid
MH1/MH2	Domänen der MAD-Proteine
MMF	Mycophenolatmofetil
MPA	Mycophenolsäure
mTOR	Ziel des Rapamycins im Säugetier (engl.: mammalian target of Rapamycin)
mRNA	Boten-RNA (engl.: messenger RNA)
MULV	Mäuse-Leukämie-Virus (engl.: murine leukemia virus)
MW	Mittelwert
NaCl	Natriumchlorid
NaOH	Natronlauge

NFAT	Gruppe von Transkriptionsfaktoren in T-Zellen (engl.: nuclear factor of activated T-cells)
PAI	Plasminogen-Aktivator-Inhibitor
PBS	phosphatgepufferte Salzlösung (engl.: phosphate buffered saline)
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PIP2	Phosphatidylinositol-4,5-Diphosphat
PLC	Phospholipase C
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
PPlasen	Peptidyl-Prolin-cis-trans-Isomerasen
Pro	Prolin
PVDF	Polyvinylidenfluorid
QuaSi-Niere	gemeinnützige Gesellschaft zur Förderung der Qualitätssicherung in der Nierenersatztherapie
RNA	Ribonukleinsäure
R-SMAD	Rezeptor-SMAD-Proteine
rT	reverse Transkription
SCR	subklinische Rejektion (engl.: subclinical rejection)
SDS	Natriumlaurylsulfat (engl.: sodium dodecylsulfat)
SMAD	Eigename einer Gruppe von Proteinen, der sich aus dem englischen Begriff mother against decapentaplegic ableitet
SPSS	Münchner Firma für analytische Software
STABW	Standardabweichung
T β RI / T β RII	TGF- β -Rezeptor I und II
TBS	tert.-Butyldimethylsilyl
TBST	Tris-gepufferte Lösung mit 0,05 % Tween
TCR	T-Zell-Rezeptor
TEMED	Tetramethylethyldiamin
TGF- β	transformierender Wachstumsfaktor (engl.: transforming growth factor-beta)
TIMPs	Gewebeinhibitor von Metallproteinasen (engl.: tissue inhibitor of metalloproteinases)
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
Tween	Handelsname von Polyoxyethylen(20)-sorbitan-monolaurat
UTP	Uridintriphosphat

UV	ultraviolett
Wilcoxon-W	Rangsummenparameter beim Mann-Whitney-U-Test
WT	Wildtyp
Z	Testgröße für die Irrtumswahrscheinlichkeit beim Mann-Whitney-U-Test

9 Literaturverzeichnis

1. National Kidney Foundation. K/DOQI clinical practice guidelines for chronic kidney disease: evaluation, classification and stratification. *Am J Kidney Dis* 2002; 39 (Suppl.1): S46-S75 oder <http://www.kidney.org>.
2. Frei U und Schober-Halstenberg HJ. Nierenersatztherapie in Deutschland, Qua-Si-Niere Jahresbericht 2006/2007. Berlin, Deutschland 2008; <http://www.quasi-niere.de>.
3. Neuringer JR, Brenner BM. Hemodynamic theory of progressive renal disease: a 10-year update in brief review. *Am J Kidney Dis* 1993; 22: 98-104.
4. Keller CK und Geberth SK. Chronische Niereninsuffizienz. In: Keller CK, Geberth SK. *Praxis der Nephrologie*. 3. Auflage, Heidelberg, Deutschland: Springer Medizin Verlag, 2010: 200-227.
5. Mettang T und Kuhlmann U. Ratschläge zur Abklärung und Betreuung niereninsuffizienter Patienten. In: Kuhlmann U, Walb D, Böhler J, Luft FC. *Nephrologie*. 5. Auflage, Stuttgart, Deutschland: Georg Thieme Verlag, 2008: 361-380.
6. National Kidney Foundation. NKF-K/DOQI clinical practice guidelines for peritoneal dialysis adequacy: update 2000. *Am J Kidney Dis* 2001; 37 (Suppl. 1): S65-S136 oder <http://www.kidney.org>.
7. Keller CK und Geberth SK. Nierenersatztherapie. In: Keller CK, Geberth SK. *Praxis der Nephrologie*. 3. Auflage, Heidelberg, Deutschland: Springer Medizin Verlag, 2010: 230-290.
8. Rabindranath KS, Strippoli GF, Daly C, Roderick PJ, Wallace SA und MacLeod AM. Haemodiafiltration, haemofiltration and haemodialysis for end-stage kidney disease. *Cochrane Database of Systematic Reviews* 2006; Issue 4, DOI: 10.1002/14651858; <http://www.thecochranelibrary.com>.
9. Mettang T. Peritonealdialyse. In: Kuhlmann U, Walb D, Böhler J, Luft FC. *Nephrologie*. 5. Auflage, Stuttgart, Deutschland: Georg Thieme Verlag, 2008: 582-618.
10. Ginieri-Coccosis M, Theofilou P, Synodinou C, Tomaras V und Soldatos C. Quality of life, mental health and health beliefs in haemodialysis and peritoneal dialysis patients: Investigating differences in early and later years of current treatment. *BMC Nephrology* 2008; Issue 9; DOI: 10.1186/1471-2369-9-14; <http://www.biomedcentral.com>.
11. Vonesh EF, Snyder JJ, Foley RN und Collins AJ. Mortality studies comparing peritoneal dialysis and haemodialysis: what do they tell us? *Kidney Int* 2006; 70 (Suppl. 103): S3-S11.
12. Merrill JP, Harrison JH, Murray J und Guild WR. Successful homotransplantation of the kidney in an identical twin. *Trans Am Clin Climatol Assoc.* 1956; 67: 166-173.

13. Maibaum M. Die Geschichte der Nierentransplantation. Dissertation an der Universität Münster, Fachbereich Medizinische Fakultät, 2003; urn:nbn:de:hbz6-10181; <http://www.deposit.d-nb.de>.
14. Calne RY. The initial study of the immunosuppressive effects of 6-mercaptopurine and azathioprine in organ transplantation and a few words on cyclosporin A. *World J. Surg* 1982; 6: 637-640.
15. Hariharan S, Johnson CP, Bresnahan BA, et al. Improved graft survival after renal transplantation in the United States, 1988 to 1996. *N Engl J Med* 2000; 342: 605-612.
16. Meier-Kriesche HU, Schold JD und Kaplan B. Long-term renal allograft survival: have we made significant progress or is it time to rethink our analytic and therapeutic strategies? *Am J Transplant* 2004; 4: 1289-1295.
17. Hesse A, Waage P. Deutsche Stiftung Organtransplantation - Organspende und Transplantation in Deutschland - Jahresbericht 2011; <http://www.dso.de>.
18. Oosterlee A, Rahmel A. Eurotransplant international Foundation - Annual Report 2011; <http://www.eurotransplant.org>.
19. Wolfe RA, Ashby VB, Milford EL, et al. Comparison of mortality in all patients on dialysis, patients on dialysis awaiting transplantation, and recipients of a first cadaveric transplant. *N Engl J Med* 1999; 341: 1725-1730.
20. Waiser J, Budde K, Schreiber M, et al. The quality of life in end stage renal disease care. *Transpl Int* 1998; 11 (Suppl. 1): S42-S45.
21. Liem YS, Bosch JL, Arends LR, Heijenbrok-Kal MH und Hunink MG. Quality of life assessed with the medical outcomes study short form 36-item health survey of patients on renal replacement therapy: a systematic review and meta-analysis. *Value Health* 2007; 10: 390-397.
22. Yates PJ und Nicholson ML. The aetiology and pathogenesis of chronic allograft nephropathy. *Transpl Immunol* 2006; 16: 148-157.
23. Racusen LC, Solez K, Colvin RB, et al. The Banff 97 working classification of renal allograft pathology. *Kidney Int* 1999; 55: 713-723.
24. Solez K, Colvin RB, Racusen LC, et. al. Banff '05 meeting report: differential diagnosis of chronic allograft injury and elimination of chronic allograft nephropathy ('CAN'). *Am J Transplant* 2007; 7: 518-526.
25. Solez K, Colvin RB, Racusen LC, et. al. Banff '07 classification of renal allograft pathology: updates and future directions. *Am J Transplant* 2008; 8: 753-760.
26. Massy ZA, Guijarro C, Wiederkehr MR, Ma JZ und Kasiske BL. Chronic renal allograft rejection: immunologic and nonimmunologic risk factors. *Kidney Int* 1996; 49: 518-524.
27. Nankivell BJ, Borrows RJ, Fung C, O'Connell PJ, Allen RD und Chapman JR. Natural history, risk factors, and impact of subclinical rejection in kidney transplantation. *Transplantation* 2004; 78: 242-249.

28. Lefaucheur C, Superbielle-Boissel C, Hill GS, et al. Clinical relevance of preformed HLA donor-specific antibodies in kidney transplantation. *Am J Transplant* 2008; 8: 324-331.
29. Waiser J, Schreiber M, Budde K, et al. Age-matching in renal transplantation; *Nephrol Dial Transplant* 2000; 15: 696-700.
30. Humar A, Gillingham KJ, Payne WD, Dunn DL, Sutherland DE und Matas AJ. Association between cytomegalovirus disease and chronic rejection in kidney transplant recipients. *Transplantation* 1999; 68: 1879-1883.
31. Szabo A und Heemann U. Ischemia reperfusion injury and chronic allograft rejection. *Transplant Proc* 1998; 30: 4281-4284.
32. Mihatsch MJ, Kyo M, Morozumi K, Yamaguchi Y, Nickleit V und Ryffel B. The side-effects of ciclosporine-A and tacrolimus. *Clin Nephrol* 1998; 49: 356-363.
33. Freese P, Svalander CT, Mölne J, Norden G und Nyberg G. Chronic allograft nephropathy - biopsy findings and outcome. *Nephrol Dial Transplant* 2001; 16: 2401-2406.
34. Sun PD und Davies DR. The cystine-knot growth-factor superfamily. *Annu Rev Biophys Biomol Struct* 1995; 24: 269-291.
35. Roberts AB, Lamb LC, Newton DL, Sporn MB, De Larco JE und Todaro GJ. Transforming growth factors: isolation of polypeptides from virally and chemically transformed cells by acid/ethanol extraction. *Proc Natl Acad Sci USA* 1980; 77: 3494-3498.
36. Schmierer B und Hill C. TGF β -SMAD signal transduction: molecular specificity and functional flexibility. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2007; 8: 970-982.
37. Qi W, Chen X, Poronnik P und Pollock CA. Transforming growth factor- β / connective tissue growth factor axis in the kidney. *Int J Biochem Cell Biol* 2008; 40: 9-13.
38. Wang W, Koka V und Lan HY. Transforming growth factor- β and smad signalling in kidney diseases. *Nephrology* 2005; 10: 48-56.
39. Rahimi AR und Leof EB. TGF- β Signaling: A tale of two responses. *J Cell Biochem* 2007; 102: 593-608.
40. Sekelsky JJ, Newfeld SJ, Raftery LA, Chartoff EH und Gelbart WM. Genetic characterization and cloning of mothers against dpp, a gene required for decapentaplegic function in drosophila melanogaster. *Genetics* 1995; 139: 1347-1358.
41. Shi Y und Massague J. Mechanisms of TGF- β signaling from cell membrane to the nucleus. *Cell* 2003; 113: 685-700.
42. Massague J und Gomis RR. The logic of TGF β signaling. *FEBS Lett* 2006; 580: 2811-2820.
43. Siegel PM und Massague J. Cytostatic and apoptotic actions of TGF- β in homeostasis and cancer. *Nat Rev Cancer* 2003; 3: 807-821.
44. Massague J, Blain SW und Lo RS. TGF- β signaling in growth control, cancer and heritable disorders. *Cell* 2000; 103: 295-309.

45. Li MO, Wan YY, Sanjabi S, Robertson AL und Flavell RA. Transforming growth factor- β regulation of immune responses. *Annu Rev Immunol* 2006; 24: 99-146.
46. Stavnezer J. Regulation of antibody production and class switching by TGF- β . *J Immunol* 1995; 155: 1647-1651.
47. Bellone G, Aste-Amezaga M, Trinchieri G und Rodeck U. Regulation of NK cell functions by TGF- β 1. *J Immunol* 1995; 155: 1066-1073.
48. Ashcroft GS. Bidirectional regulation of macrophage function by TGF- β . *Microbes Infect* 1999; 1: 1275-1282.
49. Prud'homme GJ, Piccirillo CA. The inhibitory effects of transforming growth factor-beta-1 (TGF- β 1) in autoimmune diseases. *J Autoimmun* 2000; 14: 23-42.
50. Letterio JJ und Roberts AB. Regulation of immune responses by TGF- β . *Annu Rev Immunol* 1998; 16: 137-161.
51. Lawrence DA. Transforming growth factor- β : an overview. *Kidney Int* 1995; 47 (Suppl. 49): S19-S23.
52. Border WA und Noble NA. Transforming growth factor β in tissue fibrosis. *N Engl J Med* 1994; 331: 1286-1292.
53. Border WA, Okuda S, Languino LR und Ruoslahti E. Transforming growth factor- β regulates production of proteoglycans by mesangial cells. *Kidney Int* 1990; 689-695.
54. Liu Y. Renal fibrosis: new insights into the pathogenesis and therapeutics. *Kidney Int* 2006; 69: 213-217.
55. Böttinger EP und Bitzer M. TGF- β signaling in renal disease. *J Am Soc Nephrol* 2002; 13: 2600-2610.
56. Sharma VK, Bologa RM, Xu GP, et al. Intragraft TGF- β 1 mRNA: a correlate of interstitial fibrosis and chronic allograft nephropathy. *Kidney Int* 1996; 49: 1297-1303.
57. Harris S, Coupes BM, Roberts SA, Roberts IS, Short CD und Brenchley PE. TGF- β 1 in chronic allograft nephropathy following renal transplantation. *J Nephrol* 2007; 20: 177-185.
58. Hricik DE, Almawi WY und Strom TB. Trends in the use of glucocorticoids in renal transplantation. *Transplantation* 1994; 57: 979-989.
59. Allison AC und Eugui EM. Mycophenolate mofetil and its mechanisms of action. *Immunopharmacology* 2000; 47: 85-118.
60. Sehgal SN. Rapamune® (RAPA, rapamycin, sirolimus): mechanism of action immunosuppressive effect results from blockade of signal transduction and inhibition of cell cycle progression; *Clin Biochem* 1998; 31: 335-340.
61. Brown EJ, Albers MW, Shin TB, et al. A mammalian protein targeted by G1-arresting rapamycin-receptor complex. *Nature* 1994; 369: 756-758.
62. Opelz G. Collaborative Transplant Study - 10-year report. *Transplant Proc* 1992; 24(6): 2342-2355.

63. Australia & New Zealand dialysis and transplant registry (ANZDATA). The 31st annual report 2008; <http://www.anzdata.org.au/>.
64. U.S. department of health and human services (HRSA). Scientific registry of transplant recipients (SRTR): 2011 annual data report; http://srtr.transplant.hrsa.gov/annual_reports/2011/.
65. Acuto O und Michel F. CD28-mediated co-stimulation: a quantitative support for TCR signalling. *Nat Rev Immunol* 2003; 3: 939-951.
66. Crabtree GR und Clipstone NA. Signal transmission between the plasma membrane and nucleus of T lymphocytes. *Annu Rev Biochem* 1994; 63: 1045-1083.
67. Berridge MJ, Bootman MD und Lipp P. Calcium - a life and death signal. *Nature* 1998; 395: 645-648.
68. Crabtree GR und Olson EN. NFAT signaling: choreographing the social lives of cells. *Cell* 2002; 109 (Suppl.): S67-79.
69. Malek TR und Bayer AL. Tolerance, not immunity, crucially depends on IL-2. *Nat Rev Immunol* 2004; 4: 665-674.
70. Liu J, Farmer JD, Lane WS, Friedman J, Weissman I und Schreiber SL. Calcineurin is a common target of cyclophilin-cyclosporin A und FKBP-FK506 complexes. *Cell* 1991; 66: 807-815.
71. Iwasaki K. Metabolism of tacrolimus (FK 506) and recent topics in clinical pharmacokinetics. *Drug Metab. Pharmacokint.* 2007; 22: 328-335.
72. Staatz CE und Tett SE. Clinical pharmacokinetics and pharmacodynamics of tacrolimus in solid organ transplantation. *Clin Pharmacokinet* 2004; 43: 623-653.
73. Kapturczak MH, Meier-Kriesche HU und Kaplan B. Pharmacology of Calcineurin Antagonists. *Transplant Proc* 2004; 36(Suppl2): 25S-32S.
74. Laskow DA, Vincenti F, Neylan JF, Mendez R und Matas A. An open-label, concentration-ranging trial of FK 506 in primary kidney transplantation. *Transplantation* 1996; 62: 900-905.
75. Griffiths MH, Crowe AV, Papadaki L, et al. Cyclosporin nephrotoxicity in heart and lung transplant patients. *QJM* 1996; 89: 751-763.
76. Porayko MK, Gonwa TA, Klintmalm GB und Wiesner RH. Comparing nephrotoxicity of FK 506 and cyclosporine regimens after liver transplantation: preliminary results from US multicenter trial. *Transplant Proc* 1995; 27: 1114-1116.
77. Bennett WM, De Mattos A, Meyer MM, Andoh T und Barry JM. Chronic cyclosporine nephropathy: the Achilles' heel of immunosuppressive therapy. *Kidney Int* 1996; 50: 1089-1100.
78. Perico N, Detcheva A, Khalil EI und Remuzzi G. Cyclosporine induces glomerulosclerosis: Three-dimensional definition of the lesions in a rat model of renal transplant. *Kidney Int* 1996; 49: 1283-1288.
79. Ahuja SS, Shrivastav S, Danielpour D, Balow JE und Boumpas DT. Regulation of transforming growth factor- β 1 and its receptor by cyclosporine in human T lymphocytes. *Transplantation* 1995; 60: 718-723.

80. Wolf G, Thaiss F und Stahl RA. Cyclosporine stimulates expression of transforming growth factor- β in renal cells. *Transplantation* 1995; 60: 237-241.
81. Kaname S, Uchida S, Ogata E und Kurokawa K. Autocrine secretion of transforming growth factor- β in cultured rat mesangial cells. *Kidney Int* 1992; 42: 1319-1327.
82. Waiser J, Dell K, Böhler T, et. al. Cyclosporine A up-regulates the expression of TGF- β 1 and its receptors type I and type II in rat mesangial cells. *Nephrol Dial Transplant* 2002; 17: 1568-1577.
83. Shihab FS, Bennett WM, Tanner AM und Andoh TF. Mechanism of fibrosis in experimental tacrolimus nephrotoxicity. *Transplantation* 1997; 64: 1829-1837.
84. Khanna A, Plummer M, Bromberek C, Bresnahan B und Hariharan S. Expression of TGF- β and fibrogenic genes in transplant recipients with tacrolimus and cyclosporine nephrotoxicity. *Kidney Int* 2002; 62: 2257-2263.
85. Budde K, Coleman DL, Lacy J und Sterzel RB. Rat mesangial cells produce granulocyte-macrophage colony-stimulating factor. *Am J Physiol* 1989; 257: 1065-1078.
86. Lovett DH, Ryan JL und Sterzel B. A thymocyte-activating factor derived from glomerular mesangial cells. *J Immunol* 1983; 130: 1796-1801.
87. Freeman WM, Walker SJ, Vrana KE. Quantitative RT-PCR: pitfalls and potential. *Biotechniques* 1999; 26: 112-122.
88. Smith PK, Krohn RI, Hermanson GT, et al. Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Anal Biochem* 1985; 150: 76-85.
89. Bühl A. SPSS 16 Einführung in die moderne Datenanalyse. 11. Überarbeitete und erweiterte Auflage, München, Deutschland. Pearson Studium Verlag, 2008.
90. Dell K, Böhler T, Gaedeke J, Budde K, Neumayer HH und Waiser J. Impact of PGE1 on cyclosporine A induced up-regulation of TGF- β 1, its receptors, and related matrix production in cultured mesangial cells. *Cytokine* 2003; 22:189-193.
91. Mozes MM, Böttinger EP, Jacot TA und Kopp JB. Renal expression of fibrotic matrix proteins and of transforming growth factor- β (TGF- β) isoforms in TGF- β transgenic mice. *J Am Soc Nephrol* 1999; 10: 271-280.
92. Lee HS, Kim BC, Hong HK und Kim YS. LDL stimulates collagen mRNA synthesis in mesangial cells through induction of PKC and TGF- β expression. *Am J Physiol Renal Physiol* 1999; 277: 369-376.
93. Anscher MS, Peters WP, Reisenbichler H, Petros WP und Jirtle RL. Transforming growth factor β as a predictor of liver and lung fibrosis after autologous bone marrow transplantation for advanced breast cancer. *N Engl J Med* 1993; 328: 1592-1598.
94. Davies M. The mesangial cell: a tissue culture view. *Kidney Int* 1994; 45: 320-327.
95. Citterio F, Pozzetto U, Romagnoli J, et al. Plasma levels of transforming growth factor- β 1 in renal transplant recipients receiving different immunosuppressive regimens. *Transplant Proc* 2004; 36: 698-699.

96. Bing P, Maode L, Li F und Sheng H. Comparison of expression of TGF- β 1, its receptors TGF β 1R-I and TGF β 1R-II in rat kidneys during chronic nephropathy induced by cyclosporine and tacrolimus. *Transplant Proc* 2006; 38: 2180-2182.
97. Akool ES, Doller A, Babelova A, et al. Molecular mechanisms of TGF β receptor-triggered signaling cascades rapidly induced by the calcineurin inhibitors cyclosporin A and FK 506. *J Immunol* 2008; 181: 2831-2845.
98. Awad MR, El-Gamel A, Hasleton P et. al. Genotypic variation in the transforming growth factor-(beta)1 gene: association with transforming growth factor-(beta)1 production, fibrotic lung disease and graft fibrosis after lung transplantation. *Transplantation* 1998; 66: 1014-1020.
99. Van de Wetering J, Weimar CH, Balk AH, et al. The impact of transforming growth factor- β 1 gene polymorphism on end-stage renal failure after heart transplantation. *Transplantation* 2006; 82: 1744-1748.
100. Baan CC, Balk AH, Holweg CT, et al. Renal failure after clinical heart transplantation is associated with the TGF- β 1 codon 10 gene polymorphism. *J Heart Lung Transplant* 2000; 19: 866-872.
101. Mytilineos J, Laux G., Opelz G. Relevance of IL10, TGF β 1, TNF α and IL4R α gene polymorphisms in kidney transplantation: A collaborative transplant study report. *Am J Transplant* 2004; 4: 1684-1690.
102. Thakkinstian A, Dmitrienko S, Gerbase-DeLima M, et al. Association between cytokine gene polymorphisms and outcomes in renal transplantation: a meta-analysis of individual patient data. *Nephrol Dial Transplant* 2008; 23: 3017-3023.
103. Mohamed MA, Robertson H, Booth TA, et al. Active TGF- β 1 expression in kidney transplantation: a comparative study of cyclosporin-A (CyA) and tacrolimus (FK506). *Transpl Int* 2000; 13 (Suppl. 1): S295-S298.
104. Esposito C, Foschi A, Parrilla B, et al. Effect of calcineurin inhibitors on extracellular matrix turnover in isolated human glomeruli. *Transplant Proc* 2004; 36: 695-697.
105. Bicknell GR, Williams ST, Shaw JA, Pringle JH, Furness PN und Nicholson ML. Differential effects of cyclosporin and tacrolimus on the expression of fibrosis-associated genes in isolated glomeruli from renal transplants. *Br J Surg* 2000; 87: 1569-1575.
106. Baan CC, van Riemsdijk - van Overbeeke IC, Balk AH, et al. Conversion from cyclosporin A to tacrolimus is safe and decreases blood pressure, cholesterol levels and TGF- β 1 type I receptor expression. *Clin Transplant* 2001; 15: 276-283.
107. Webster AC, Woodroffe RC, Taylor RS, Chapman JR und Craig JC. Tacrolimus versus ciclosporin as primary immunosuppression for kidney transplant recipients: meta-analysis and meta-regression of randomised trial data. *Cochrane Database of Systematic Reviews* 2005; Art. No.: CD003961; DOI:10.1136/bmj.38569.47007.AE; <http://www.thecochranelibrary.com>.
108. Shihab FS, Waid TH, Conti DJ, et al. Conversion from cyclosporine to tacrolimus in patients at risk for chronic renal allograft failure: 60-Month results of the CRAF Study. *Transplantation* 2008; 85: 1261-1269.

109. Jevnikar A, Arlen D, Barrett B, et al. Five-year study of tacrolimus as secondary intervention versus continuation of cyclosporine in renal transplant patients at risk for chronic renal allograft failure. *Transplantation* 2008; 86: 953-960.
110. Opelz G und Döhler B. Influence of immunosuppressive regimens on graft survival and secondary outcomes after kidney transplantation. *Transplantation* 2009; 87: 795-802.

10 Eidesstattliche Versicherung

„Ich, Jan Erich Kreutzkamp, versichere an Eides statt durch meine eigenhändige Unterschrift, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema "Wirkung von Tacrolimus auf die Synthese von TGF- β 1 und die Expression der TGF- β 1-Rezeptoren T β RI und T β RII in der Mesangiumzelle" selbstständig und ohne nicht offengelegte Hilfe Dritter verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel genutzt habe.

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

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

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

Datum

Unterschrift

Anteilserklärung an etwaigen erfolgten Publikationen

Jan Erich Kreutzkamp hatte folgenden Anteil an der folgenden Publikation:

Waiser J, Dell K, Kreutzkamp J, Böhler T, Budde K, Peters H und Neumayer HH. FK 506, transforming growth factor β 1 and mesangial matrix synthesis: Parallels and differences compared with cyclosporin A. Cytokine 2006; 33: 59-65.

Beitrag im Einzelnen: Durchführung von Teilen der Mesangiumzellkultur-Versuche (Inkubation mit verschiedenen Tacrolimus-Konzentrationen) und Auswertung von Teilen der Versuche (mRNA- und Protein-Messungen von TGF- β 1 und der TGF- β 1-Rezeptoren T β RI und T β RII).

Unterschrift, Datum und Stempel des betreuenden Hochschullehrers

Unterschrift des Doktoranden

11 Lebenslauf

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

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

12 Publikationsliste

Im Rahmen meiner Tätigkeit als Doktorand in der Arbeitsgruppe von Herrn PD Dr. med. Johannes Waiser an der Medizinischen Klinik mit Schwerpunkt Nephrologie der Charité ist unter meiner Mitwirkung folgende Publikation entstanden:

Waiser J, Dell K, Kreuzkamp J, Böhler T, Budde K, Peters H und Neumayer HH. FK 506, transforming growth factor β 1 and mesangial matrix synthesis: Parallels and differences compared with cyclosporin A. Cytokine 2006; 33: 59-65.

13 Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei den Menschen bedanken, die mir auf verschiedene Art und Weise bei der Durchführung dieser Arbeit zur Seite gestanden haben.

Ich danke meinem Doktorvater Herrn PD Dr. med. Johannes Waiser für die Überlassung des Dissertationsthemas, die Bereitstellung der erforderlichen Materialien und Geräte, die Betreuung bei der Planung und Auswertung der Versuche sowie bei der Verfassung der Dissertation.

Herrn Prof. Dr. Hans-H. Neumayer danke ich für die Möglichkeit, die Einrichtung und Geräte im nephrologischen Forschungslabor der Medizinischen Klinik mit Schwerpunkt Nephrologie an der Charite Campus Mitte nutzen zu dürfen.

Weiterhin gilt mein Dank Frau Dr. Kerstin Dell für die Einführung in die Methoden sowie die nachfolgende tägliche enge Zusammenarbeit und Unterstützung bei der Durchführung und Auswertung der Zellkulturversuche. Für die gemeinsame tägliche Arbeit im Labor und die Gespräche während dieser Zeit danke ich Dr. Torsten Böhler, Pia Hambach und Christine Lorkowski.

Abschließend möchte ich mich bei meiner Familie und meinen Freunden für die moralische Unterstützung und den zeitlichen Freiraum bedanken.

Ganz besonders danken möchte ich aber meinen Eltern, die wissen warum.