

AUS DEM BEREICH KLINISCHE MEDIZIN
FACHRICHTUNG INFektionsMEDIZIN
ABTEILUNG FÜR TRANSPLANTATIONS- UND INFektionsSIMMUNOLOGIE
DER MEDIZINISCHEN FAKULTÄT (M) DER UNIVERSITÄTS DES SAARLANDES, HOMBURG/SAAR

Charakterisierung und Quantifizierung alloreaktiver T-Zellen

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades der Doktorin der Naturwissenschaften

der Medizinischen Fakultät (M)

der Universität des Saarlandes

2019

vorgelegt von

Michaela Fischer (geb. Wolf)

geb. am 22.08.1986 in Roth

Tag des Kolloquiums: _____

Name des Dekans: _____

Namen der Mitglieder des Prüfungsausschusses: _____

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	3
1 Zusammenfassung.....	8
2 Summary	10
3 Einleitung.....	12
3.1 Organtransplantation	12
3.2 Das menschliche Immunsystem	13
3.2.1 Das angeborene Immunsystem.....	13
3.2.2 Das adaptive Immunsystem	14
3.2.3 Vielfalt der MHC-Moleküle.....	19
3.2.4 Die Antigenpräsentation	20
3.3 Immunologische Mechanismen der Abstoßungsreaktion	22
3.3.1 Einteilung von Abstoßungsreaktionen.....	22
3.3.2 Direkte und indirekte Alloreaktion.....	24
3.3.3 Präformierte und <i>de novo</i> induzierte Alloreaktivität.....	26
3.3.4 Immunisierungsereignisse zur Induktion einer Alloreaktion	27
3.4 Maßnahmen zur Verhinderung von Abstoßungen.....	29
3.4.1 Medikamentöse Immunsuppression	29
3.4.2 Methoden zur Minimierung des Abstoßungsrisikos nach Transplantation.....	31
3.5 Zielsetzung dieser Arbeit	35
4 Material und Methoden.....	37
4.1 Material	37
4.1.1 Geräte und Hilfsmittel	37
4.1.2 Chemikalien und Reagenzien	39
4.1.3 Medien und Puffer/Lösungen	40

4.1.4	Antikörper	41
4.1.5	Antigene	42
4.1.6	Immunsuppressiva	43
4.1.7	Software	43
4.2	Probandenkollektive und Probenmaterialien	43
4.2.1	Probanden und Patienten	43
4.2.2	Probenmaterialien und klinische Daten.....	50
4.3	Methoden	51
4.3.1	Isolation von mononukleären Zellen des peripheren Blutes oder der Milz	51
4.3.2	Zellzahlbestimmung von PBMC oder MMC	52
4.3.3	Einfrieren von isolierten PBMC oder MMC.....	52
4.3.4	Auftauen von isolierten PBMC oder MMC.....	52
4.3.5	Stimulation alloreaktiver T-Zellen	53
4.3.6	Stimulation antigenspezifischer und polyklonaler T-Zellen	60
4.3.7	Bestimmung der T-Zellproliferation.....	60
4.3.8	Durchflusszytometrische Analyse	62
4.3.9	Bestimmung des CMV-Serostatus durch ELISA.....	68
4.3.10	Datenverwaltung.....	69
4.3.11	Statistische Analyse.....	69
4.3.12	Festlegung der Nachweisgrenze für alloreaktive T-Zellen.....	70
5	Ergebnisse	72
5.1	Entwicklung eines Vollblutverfahrens zum Nachweis und zur Charakterisierung alloreaktiver T-Zellen bei Gesunden und Patienten mit Niereninsuffizienz	72
5.1.1	Alloreaktive T-Zellen lassen sich direkt aus dem Vollblut nachweisen.....	72
5.1.2	Alloreaktive CD8 T-Zellen dominieren über alloreaktive CD4 T-Zellen.....	74

5.1.3	Phänotypische und funktionelle Charakterisierung alloreaktiver CD8 T-Zellen	75
5.1.4	Stabilität alloreaktiver T-Zell Frequenzen im zeitlichen Verlauf	78
5.1.5	Alloreaktive T-Zell Frequenzen treten häufiger bei Patienten mit Niereninsuffizienz als bei immungesunden Probanden auf	79
5.1.6	Assoziation zwischen der Anzahl an HLA-Mismatchen und dem Auftreten alloreaktiver T-Zellen.....	84
5.1.7	Untersuchung weiterer Einflussfaktoren auf die Entwicklung einer zellulären Alloreaktivität	86
5.2	Analyse alloreaktiver T-Zellen bei Patienten der Transplantationswartelisten für eine Leber oder Lunge.....	87
5.3	Bestimmung alloreaktiver T-Zellen im klinischen Setting einer Transplantation	89
5.3.1	Anwendung von EDTA-Vollblut und Milzgewebe als Quelle für Stimulatorzellen	89
5.3.2	Analyse alloreaktiver T-Zellen vor und im Verlauf nach Transplantation.....	91
5.3.3	Fallbeispiele zur Rolle alloreaktiver T-Zellen für die Entwicklung von Abstoßungsepisoden nach Transplantation.....	94
5.3.4	Versuchsbedingungen zum Nachweis funktioneller T-Zellen nach Probentransport aus externen Zentren	111
5.4	Alloreaktive T-Zell Immunität bei Schwangeren	119
5.4.1	Querschnittsanalyse alloreaktiver T-Zellen bei Schwangeren und bei Probanden ohne Schwangerschaft	119
5.4.2	Alloreaktive und SEB-reaktive T-Zellen im Verlauf einer Schwangerschaft.....	122
5.4.3	Erhöhte CD8 Alloreaktivität bei Fortschreiten einer Schwangerschaft mit einem männlichen Nachkommen	125
5.4.4	Keine Induktion alloreaktiver T-Zellen durch vorangegangene Fehlgeburten	126
6	Diskussion.....	127

6.1	Die Bedeutung der humoralen und zellulären Abstoßung in der Transplantationsmedizin.....	127
6.2	Verfahren zur Vorhersage einer zellulären Abstoßungsreaktion.....	127
6.3	Vorteile der durchflusszytometrischen Vollblutmethode gegenüber weiteren Kurzzeit-Methoden.....	129
6.4	Limitierungen und Vorzüge der Zytokin-basierten Vollblutmethode.....	131
6.5	Charakteristika alloreaktiver T-Zellen.....	132
6.5.1	Immunsuppressive Medikamente können alloreaktive T-Zellen inhibieren ...	132
6.5.2	Alloreaktive CD8 T-Zellen dominieren über alloreaktive CD4 T-Zellen.....	132
6.5.3	Ursachen für das häufigere Auftreten alloreaktiver T-Zellen bei niereninsuffizienten Patienten gegenüber immungesunden Probanden	133
6.5.4	Verteilung alloreaktiver CD4 und CD8 T-Zellen bei immungesunden und niereninsuffizienten Patienten.....	134
6.5.5	Alloreaktive T-Zellen bei Leber- und Lungeninsuffizienten Patienten.....	135
6.5.6	Anwendung alloreaktive T-Zellen zur frühzeitigen Identifizierung von Patienten mit Risiko einer akuten Abstoßungsreaktion.....	136
6.5.7	Anwendung alloreaktive T-Zellen zur Spenderselektion	139
6.5.8	Ausblick einer multizentrischen Studie.....	140
6.6	Technische Voraussetzungen zum Nachweis einer zellulären Alloreaktivität	141
6.7	Vergleich solider Organe und deren Einfluss auf das Transplantatoutcome.....	142
6.8	<i>De novo</i> Induktion alloreaktiver T-Zellen nach einer Transplantation.....	142
6.9	Die Rolle der Alloreaktivität bei der Schwangerschaft.....	144
6.10	Ausblick.....	146
7	Literaturverzeichnis.....	149
8	Abbildungsverzeichnis.....	159
9	Tabellenverzeichnis.....	162

10	Abkürzungsverzeichnis	163
11	Publikationen und Kongressbeiträge	167
11.1	Originalarbeiten	167
11.1.1	Originalarbeiten dieser Dissertation	167
11.1.2	Weitere Originalarbeiten	167
11.2	Kongressbeiträge und Auszeichnungen.....	167
12	Danksagung	172
13	Lebenslauf	174
	Persönliche Daten	174
	Schule und Studium	174
	Beruflicher Werdegang	175

1 Zusammenfassung

Obwohl präformierte alloreaktive T-Zellen eine akute Abstoßungsreaktion nach Organtransplantation auslösen können, sind bisher keine für die klinische Routine geeigneten Nachweismethoden vorhanden, um das Abstoßungsrisiko abzuschätzen. In dieser Arbeit wurde eine neue Methode zur Identifikation alloreaktiver T-Zellen entwickelt und zur detaillierten Charakterisierung der präformierten Alloreaktivität bei 84 Nieren-, 41 Leber- und 36 Lungeninsuffizienten Patienten sowie bei 190 immungesunden Probanden und bei Schwangeren angewandt.

Zur Quantifizierung einer Alloreaktivität eines Empfängers gegen den Spender wurde Vollblut eines Empfängers mit CD45 vorgefärbtem Blut des Spenders für 6 h in einer gemischten Lymphozytenreaktion stimuliert. Der Anteil alloreaktiver CD4 und CD8 T-Zellen wurde durch intrazelluläre Zytokinfärbung mittels Durchflusszytometrie bestimmt. Als Negativkontrolle diente eine autologe Stimulation, als Positivkontrolle eine polyklonale Stimulation mit bakteriellem Superantigen *Staphylococcus aureus* Enterotoxin B (SEB). Zusätzlich wurde Blut des Empfängers gegen Blut von mindestens drei nicht blutsverwandten Probanden („Third-Party Stimulatoren“) getestet. Zudem wurden alloreaktive T-Zellen detailliert funktionell und phänotypisch charakterisiert und deren Hemmbarkeit durch Immunsuppressiva in vitro evaluiert.

Alloreaktive CD8 T-Zellen traten häufiger und mit höheren Frequenzen auf als alloreaktive CD4 T-Zellen (9,51% vs. 2,66%). Messbare alloreaktive T-Zellen blieben über einen Zeitraum von einem Jahr nachweisbar und waren mittels immunsuppressiver Medikamente hemmbar. Alloreaktive CD8 T-Zellen wurden als Effektor-Memory T-Zellen durch eine fehlende Expression von CD27, CD62L und CCR7 identifiziert. Das Auftreten und die Höhe der alloreaktiven T-Zell Frequenzen zeigte eine Assoziation mit der Anzahl der HLA-Mismatches ($p=0,0271$). Unter Nieren- und Lungeninsuffizienten Patienten auf der Transplantationswarteliste zeigte sich ein höherer Anteil alloreaktiver T-Zellen als unter Kontrollen und Leberinsuffizienten Patienten (CD4 T-Zellen: Niere 4,06%, Lunge 7,06%, Kontrolle 1,53%, Leber 0,63%; CD8 T-Zellen: Niere 14,80%, Lunge 12,94%, Kontrolle 5,27%, Leber 6,88%). In der Gruppe der niereninsuffizienten Patienten zeigten 5 von 84 Probanden (5,95%) eine hohe CD8 Alloreaktivität gegen die meisten der mitgeführten Third-Party Stimulatorzellen, während 26/84 (30,95%) Patienten eine moderate Alloreaktivität gegen

ihre Stimulatoren aufwiesen. Demgegenüber zeigten 53/84 (63,10%) Patienten keine zelluläre Alloreaktivität. Im klinischen Setting einer Transplantation zeigten drei der 55 Nierentransplantierten eine humorale Abstoßungsreaktion. Bei keinem Patienten mit einer humoralen Abstoßungsreaktion traten alloreaktive CD8 T-Zellen auf. Nur ein Nierentransplantiertes Patient wies im ersten Jahr nach seiner Transplantation eine zelluläre Abstoßungsreaktion auf, diese korrelierte mit dem Auftreten einer präformierten zellulären CD8 Alloreaktivität. Im Setting einer Lungentransplantation zeigte einer von vier Patienten eine Abstoßungsreaktion. Dabei handelte es sich um eine zelluläre Abstoßungsreaktion, die wiederum mit einer präformierten CD8 Alloreaktivität korrelierte. Im Kontext einer Schwangerschaft zeigten Schwangere (n=104) nach Geburt ihres Kindes einen Trend zu einer erhöhten CD8 Alloreaktivität gegenüber väterlichen Antigenen. Auch im Rahmen einer longitudinalen Analyse wiesen Schwangere (n=20) nach Geburt ihres Kindes eine erhöhte CD8 Alloreaktivität gegen paternale Antigene im Gegensatz zu Antigenen, die von Third-Party Stimulatoren stammten auf ($p=0,0386$).

Zusammenfassend erlaubt das im Rahmen dieser Arbeit etablierte Verfahren den Nachweis einer präformierten zellulären Alloreaktivität. Im Kontext der Schwangerschaft scheint eine zelluläre Alloreaktivität, die gegen paternale Antigene gerichtet ist, unmittelbar nach Geburt eines Kindes induziert zu werden. Im Kontext der Transplantation hat das Verfahren aufgrund der schnellen Durchführbarkeit innerhalb eines Arbeitstages das Potential zur Identifizierung von Patienten mit einem erhöhten Risiko für eine akute zelluläre Abstoßungsreaktion und könnte zur Steuerung einer individualisierten immunsuppressiven Induktionstherapie bzw. zur Auswahl eines geeigneten Spenders beitragen. Auf Basis der Ergebnisse dieser Arbeit wurde in unserer Abteilung eine deutschlandweite prospektive klinische Multicenter-Studie initiiert, um den prädiktiven Wert alloreaktiver T-Zellen zur Vorhersage von akuten Abstoßungsreaktionen zu evaluieren.

2 Summary

Although preformed alloreactive T-cells can induce acute rejection episodes after organ transplantation, no suitable assays for use in clinical routine are currently available. In this thesis, a new method for the identification of alloreactive T-cells was developed and applied to characterize preformed alloreactivity in 84 renal-, 41 liver- and 36 lung-deficient patients, as well as in 190 healthy controls, and pregnant women.

To quantify alloreactivity of a patient against a donor, whole blood of the recipient was stimulated with CD45 pre-stained blood of the donor for 6 h in a mixed lymphocyte reaction. The proportion of alloreactive CD4 and CD8 T-cells was flow-cytometrically determined by intracellular cytokine staining. An autologous stimulation served as negative control, a polyclonal stimulation with *Staphylococcus aureus* Enterotoxin B (SEB) as positive control. In addition, recipient cells were tested against blood from at least three unrelated third-party stimulators. Moreover, alloreactive T-cells were phenotypically and functionally characterized and the inhibitory effect of immunosuppressive drugs on alloreactive T-cells was evaluated.

Alloreactive CD8 T-cells were detected more frequently than alloreactive CD4 T-cells (9.51% vs. 2.66%). Likewise, alloreactive CD8 T-cell-levels were higher than those of CD4 T-cells. Alloreactive T-cells remained detectable for over a time period of one year and were inhibited by immunosuppressive drugs. Alloreactive CD8 T-cells were characterized as effector memory T-cells largely negative for expression of CD27, CD62L, and CCR7. Detection of alloreactive T-cells and alloreactive T-cell levels were associated with higher numbers of HLA mismatches ($p=0.0271$). Among renal- and lung-deficient patients on the transplant waiting list, a higher proportion had alloreactive T-cells as compared to controls and liver-deficient patients (CD4 T-cells: kidney 4.06%, lung 7.06%, control 1.53%, liver 0.63%; CD8 T-cells: kidney 14.80%, lung 12.94%, control 5.27%, liver 6.88%). Among transplant candidates, 5 out of 84 (5.95%) exhibited alloreactive CD8 T-cells against most third-party stimulators, whereas 26 out of 84 (30.95%) had alloreactive T-cells towards a limited number of stimulators. In contrast, 53 out of 84 did not show any alloreactivity. In the clinical setting of transplantation, three of the 55 kidney transplant recipients showed a humoral rejection. None of the patients with a humoral rejection reaction showed alloreactive CD8 T-cells. Only

one kidney transplant patient had a cellular rejection in the first year after transplantation, which correlated with the occurrence of preformed cellular CD8 alloreactivity. In the setting of lung transplantation, one out of four patients showed a rejection. This was a cellular rejection reaction, which correlated with preformed CD8 alloreactivity. In the context of pregnancies, pregnant women (n=104) showed a trend towards an increased CD8 alloreactivity to paternal antigens after birth. Likewise, in a longitudinal analysis, pregnant women (n=20) exhibited a higher CD8 alloreactivity against paternal antigens after birth as compared to antigens derived from third-party stimulators (p=0.0386).

In summary, the newly established assay allows identification of preformed alloreactive T-cells. In the context of pregnancy, a cellular alloreactivity against paternal antigens appears to be induced immediately after birth. In the context of organ transplantation, the assay to detect cellular alloreactivity within one working day may have potential to identify patients at risk for acute rejection and may be used to guide decisions on individualized immunosuppressive induction therapy or on the choice of an adequate donor. Based on the results of this thesis, our department has initiated a prospective German multicenter study to evaluate the predictive value of preformed alloreactive T-cell of a recipient towards his organ donor for acute cellular rejection episodes.

3 Einleitung

3.1 Organtransplantation

In der klinischen Medizin werden sowohl solide Organe wie Niere, Leber, Lunge, Herz, Bauchspeicheldrüse und Dünndarm als auch Gewebe (Hornhaut) oder vaskularisierte Gewebekomplexe (Hand, Gesicht) und Blutstammzellen oder Knochenmark transplantiert. Transplantationen können das Leben verlängern bzw. die Lebensqualität erheblich verbessern [1-3]. So ist zum Beispiel ein Patient mit terminaler Niereninsuffizienz lebenslang auf eine Nierenersatztherapie angewiesen. Zu den am häufigsten angewandten Nierenersatztherapie-Verfahren zählen die Hämodialyse (HD), welche außerhalb des Körpers (extrakorporal) und die kontinuierliche ambulante Peritonealdialyse (CAPD), die innerhalb des Körpers (intrakorporal) stattfindet. Da ein niereninsuffizienter Patient täglich mit Einschränkungen bezüglich seines Ernährungs- und Flüssigkeitshaushaltes leben muss, stellt eine Nierentransplantation das Nierenersatzverfahren mit Zurückgewinnung der besten Lebensqualität dar [1, 2, 4].

Unter einer allogenen Transplantation versteht man die Transplantation zwischen genetisch unterschiedlichen Individuen derselben Spezies. Transplantationen, die zwischen genetisch identischen Individuen stattfinden, wie es bei eineiigen Zwillingen der Fall ist, werden als syngene Transplantationen definiert. Transplantationen innerhalb desselben Individuums werden als autologe Transplantation bezeichnet [5]. Die allogene Organtransplantation stellt beim Menschen die häufigste Form der Transplantation dar. Bei einer allogenen Transplantation unterscheidet man weiter die Verstorbtenenspende und die Lebendspende. Eine Lebendspende ist bei der Transplantation von Niere, aber auch von Leberlappen und Lungenflügeln möglich. Die Verstorbtenenspende setzt den irreversiblen Hirnfunktionsausfall voraus und wird im Vergleich zur Lebendspende sehr viel häufiger durchgeführt. So wurden in Deutschland im Jahr 2017 257 Herzen, 309 Lungen (davon keine Lebendspende), 1921 Nieren (davon 557 Lebendspenden), 823 Lebern (davon 61 Lebendspenden), 72 Pankreata und 3 Dünndärme transplantiert [6]. Patienten nach Nieren-Lebendspende zeigen generell ein besseres Transplantatüberleben als Patienten nach Verstorbtenenspende [7]. Zudem ist die Wahrscheinlichkeit einer Infektion nach einer Nieren-Lebendspende etwa 20% geringer [8]. Das bessere Transplantatüberleben liegt an der kürzeren Ischämiezeit, unter der man

den Zeitraum zwischen Organentnahme und erneuter Verknüpfung der Gefäße des Empfängers mit dem Spenderorgan versteht [9], ebenso wie an dem erhöhten Ausmaß der Gewebeübereinstimmung zwischen Empfänger und Spender [10-16]. Die Tatsache dass Empfänger einer Lebendspende häufiger einer kürzere Wartezeit haben bzw. präemptiv, d.h. vor einer regelmäßigen Dialysebehandlung, transplantiert werden, trägt ebenfalls zu einem besseren Transplantatüberleben bei [17, 18].

Das Immunsystem bietet einen wirksamen Schutz vor Infektionen mit Pathogenen wie Viren, Bakterien, Pilzen oder Parasiten. Dies erfordert eine Unterscheidung zwischen körpereigen („selbst“) und körperfremd („nicht-selbst“) [19]. Ähnlich wie Pathogene kann ein transplantiertes Organ vom Immunsystem des Empfängers als körperfremd erkannt werden, was zu einer Abstoßungsreaktion dieses Organs führen kann. Eine Abstoßungsreaktion kann durch humorale und zelluläre Komponenten des Immunsystems vermittelt werden. Um Abstoßungsreaktionen zu verhindern, wird das Immunsystem des transplantierten Patienten zeitlebens medikamentös durch immunsuppressiv wirkende Medikamente unterdrückt.

3.2 Das menschliche Immunsystem

Das Immunsystem wird in ein angeborenes und ein adaptives Immunsystem unterteilt. Dabei umfassen beide Systeme sowohl zelluläre als auch humorale, lösliche Komponenten.

3.2.1 Das angeborene Immunsystem

Das angeborene Immunsystem bietet einen schnell wirksamen Schutz gegen Pathogene [20]. Es besteht aus zellulären Komponenten wie Makrophagen, Granulozyten, dendritischen Zellen (DC) und natürlichen Killer (NK) Zellen und humoralen Bestandteilen wie dem Komplementsystem, akut-Phase Proteinen, Lektinen und Zytokinen, die, sobald ein Pathogen die erste Barriere des menschlichen Körpers überwunden hat, zur Abwehr des Erregers beitragen [21]. Infizierte Zellen werden Pathogen-unspezifisch durch NK Zellen erkannt. Die Erkennung der Pathogene außerhalb von Zellen erfolgt über Strukturmerkmale, die für diese Organismen essentiell und hoch konserviert sind, die jedoch nicht im menschlichen Organismus vorkommen. Diese Strukturmerkmale werden als *pathogen-associated molecular patterns* (PAMPs) bezeichnet [5]. Bei den PAMPs kann es sich um Lipopolysaccharide, Phosphoantigene, Lipide oder doppelsträngige RNAs handeln [5, 22]. Zur Erkennung der PAMPs sind die Zellen des angeborenen Immunsystems mit spezifischen

Membranrezeptoren, den *Pattern Recognition Rezeptoren* (PRR) ausgestattet. Die Elimination der Pathogene erfolgt über den Mechanismus der Phagozytose durch neutrophile Granulozyten, Makrophagen und dendritische Zellen. Weitere Unterstützung bei der Erkennung von Erregern erhalten diese Phagozyten durch humorale Komponenten wie dem Komplementsystem und durch Antikörper, was das Zusammenwirken der Komponenten der angeborenen und adaptiven Immunantwort unterstreicht.

3.2.1.1 Komplementsystem

Das Komplementsystem besteht aus über 30 Plasma- und Membran-gebundenen Proteinen wie den Komplementfaktoren C1 bis C9, dem Mannose-bindenden Lektin und den Serinproteasen [23, 24]. Man unterscheidet drei Wege, über die das Komplementsystem aktiviert werden kann. Zunächst den über Antikörper vermittelten klassischen Weg, der über Antikörper und Immunkomplexe aktiviert wird. Desweiteren existiert der Lektin-Weg, bei dem Lektine an Mannosereste auf der Pathogenoberfläche binden und hierdurch eingedrungene Erreger markieren. Der Antikörper-unabhängige alternative Weg schließlich findet direkt an der mikrobiellen Oberfläche statt und wird durch eine spontane Hydrolyse von C3 initiiert. Es entsteht, wie bei den anderen beiden Wegen, eine C3-Konvertase, auf deren Ebene die Wege der Komplementaktivierung zusammenlaufen. Durch Wirkung der C3- und C5-Konvertase entstehen Spaltprodukte früher Komponenten des Komplementsystems, welche vielfältige Wirkungen besitzen [5]. Anlagerung des C3b Spaltproduktes führt zu einer Opsonierung von Pathogenen, die zur Steigerung der Phagozytose und somit zur Pathogenzerstörung führt. Spaltprodukte wie C3a, C4a, C5a haben chemotaktische Wirkung und führen zur Rekrutierung von Leukozyten an den Infektionsherd. Weitere terminale Komplementspaltprodukte schließlich haben lytische Wirkung auf Pathogene, indem sich diese zu Membranangriffskomplexen (*Membran-attack complexes*, MACs) formieren. Diese können Poren bilden, die nicht selektiven Ionenkanälen entsprechen und dadurch zur Pathogenlyse führen [23, 25].

3.2.2 Das adaptive Immunsystem

Im Gegensatz zum angeborenen Immunsystem kommt es beim adaptiven Immunsystem zur spezifischen Erkennung der Pathogene mit Ausbildung eines immunologischen Gedächtnisses [26]. Aufgrund des immunologischen Gedächtnisses erfolgt die

Immunantwort bei erneutem Kontakt mit demselben Erreger schneller und zielgerichteter als beim Erstkontakt.

Die Hauptkomponenten des adaptiven Immunsystems sind die Antikörper, die von B-Lymphozyten und Plasmazellen produziert werden und die T-Lymphozyten. Sowohl B- als auch T-Zellen erkennen spezifische Antigene, die von einzelnen Pathogenen stammen mit ihren spezifischen Rezeptoren [5]. Die Erkennung des Antigens führt zur Proliferation und klonalen Expansion der B- und T-Zellen. Aufgrund der klonalen Expansion beim adaptiven Immunsystem entstehen identische Lymphozyten, welche zu Effektorzellen oder langlebigen Gedächtniszellen differenzieren. Durch diesen Vermehrungs- und Differenzierungsprozess kommt es, im Vergleich zum angeborenen Immunsystem, zu einer zeitverzögerten Ausbildung und Reaktion der adaptiven Immunantwort. Die Vorläuferzellen der B- und T-Lymphozyten entstehen aus hämatopoetischen Stammzellen im Knochenmark. Die Vorläuferzellen der B-Lymphozyten durchlaufen ihre Reifung zu Antigen-naiven B-Zellen im Knochenmark. Die Vorläuferzellen der T-Lymphozyten hingegen wandern aus dem Knochenmark in den Thymus ein und reifen dort zu naiven CD4 und CD8 T-Zellen heran.

Im Folgenden sollen B-Lymphozyten als Vorläufer der Antikörper-produzierenden Zellen und T-Lymphozyten als wichtige Bestandteile des adaptiven Immunsystems beschrieben werden.

3.2.2.1 Antikörper und B-Lymphozyten

Antikörper, die auch als Immunglobuline bezeichnet werden, sind Glykoproteine aus je zwei identischen leichten und schweren Proteinketten. Die leichte Kette ist über eine Disulfidbrücke mit der schweren Kette verbunden. Die schweren Ketten sind untereinander ebenfalls über Disulfidbrücken verknüpft. Jede Kette besteht aus einer konstanten und einer variablen Region. Die variablen Regionen der leichten und der schweren Kette bilden die spezifische Antigenbindungsstelle aus, während die konstante Region der schweren Kette die Zugehörigkeit zu einer Immunglobulinklasse bestimmt [27, 28].

Im Knochenmark unterliegen B-Zellen einer strengen Selektion, um eine Toleranz gegen körpereigene Strukturen zu erzeugen. Über den Blutkreislauf zirkulieren diese in sekundär lymphatische Gewebe, wie Milz, Lymphknoten und Mukosa-assoziiertes Lymphgewebe. Die naive B-Zelle trägt auf ihrer Oberfläche den B-Zell-Rezeptor, ein membranständiges Antikörpermolekül, welches Antigene spezifisch erkennen kann. Wird eine B-Zelle in den sekundären Lymphorganen durch Antigenkontakt aktiviert, vermehrt sich diese und

differenziert in Richtung einer Plasmazelle aus, die in diesem Stadium zur Bildung löslicher Antikörper in der Lage ist. Im Zuge der weiteren Entwicklung und Differenzierung der B-Zellen erfolgt die Einwanderung in primäre Follikel des Lymphgewebes, wo sich Keimzentren als Stätten der B-Zellproliferation ausbilden. In den Keimzentren findet zudem durch somatische Hypermutationen, die zu einer Veränderung der Aminosäuresequenz führt, eine Affinitätsreifung der Antikörpermoleküle statt, so dass sich deren Bindungseigenschaften zu spezifischen Antigenen im Verlauf der Induktion einer Immunantwort zunehmend verbessern [29]. Neben Antikörper-sezernierenden Plasmazellen werden Gedächtniszellen ausgebildet, die Immunglobuline als membranständige Moleküle auf der Zelloberfläche behalten. Diese membranständigen Immunglobuline werden auch als B-Zell-Rezeptor (BZR) bezeichnet. Gedächtniszellen sind langlebige, zirkulierende Zellen, die bei einem erneuten Kontakt mit denselben Antigenen schneller proliferieren und in Richtung Antikörper-sezernierenden Plasmazellen differenzieren.

Die B-Zelle ist zur vollständigen Aktivierung auf ein weiteres Signal, das von CD4 T-Helferzellen stammt, angewiesen. Hierzu nimmt die B-Zelle das an ihren Rezeptor gebundene Antigen über rezeptorvermittelte Endozytose auf. Die Antigene werden durch Proteasen in Peptide zerlegt, welche auf MHC Klasse II Moleküle geladen und auf der Zelloberfläche präsentiert werden. Aktivierte Antigen-spezifische T-Helferzellen erkennen mit ihrem spezifischen T-Zell-Rezeptor (TZR) den Peptid-MHC-Komplex der B-Zellen. Die B-Zelle erhält ein Aktivierungssignal über den CD40 Liganden, der an CD40 der B-Zelle bindet. Zudem induziert diese Bindung die Sekretion von Zytokinen durch T-Zellen, welche die Proliferation der B-Zellen und deren Differenzierung zu Gedächtniszellen oder hochaffinen Antikörper-sezernierenden Plasmazellen unterstützt. Diese weisen auf ihrer Zelloberfläche keine membrangebundene Immunglobuline auf, wie es bei der Expression des BZR der Fall ist. Stattdessen werden lösliche Antikörper in großen Mengen sezerniert. Durch diese Produktion gewährleisten Plasmazellen eine langanhaltende humorale Immunität gegen Pathogene.

Menschliche Antikörper sind eingeteilt in fünf Isotypen (IgM, IgD, IgA, IgE und IgG), welche sich in ihrer konstanten Region unterscheiden und eine Reihe von Effektorfunktionen vermitteln. Der IgD-Isotyp ist gering im Serum vorhanden und wird wie IgM auf naiven B-Zellen membranständig exprimiert. Der membranständige B-Zell-Rezeptor entspricht

einem IgM Molekül. Bei einem Primärkontakt mit Antigenen werden zunächst Antikörper des IgM-Subtyps sezerniert. Durch eine Genumlagerung in B-Zellen die durch T-Zell Zytokine ausgelöst wird, kommt es zum Klassenwechsel und damit zur Produktion und Sekretion der anderen Antikörperklassen [28, 30]. Der IgA-Isotyp kommt in Sekreten und auf Schleimhäuten vor und schützt vor Pathogenen, die über diese Eintrittspforten in den Körper gelangen. Der IgE-Isotyp ist im Blut nur gering konzentriert, sondern liegt an Mastzellen gebunden im Bindegewebe vor. IgE wirken zusammen mit Mastzellen bei der Abwehr von Parasiten und sind bei der Induktion von Allergien beteiligt. IgG sind die häufigsten Antikörper im Serum und extrazellulären Flüssigkeiten [31]. Je nach Lokalisation wirken die Antikörper bei verschiedenen Prozessen, wie der Neutralisation, Komplementaktivierung, Immunkomplexbildung oder Opsonierung mit. Einige dieser Isotypen werden auf Basis ihrer Struktur noch in weitere Subklassen (IgG1, IgG2, IgG3 und IgG4, IgA1 und IgA2) unterteilt [5].

3.2.2.2 T-Zellen

T-Lymphozyten werden im Knochenmark gebildet, reifen im Thymus heran und erkennen Antigene über membranständige T-Zell-Rezeptoren (TZR) [32]. T-Zell-Rezeptoren erkennen Antigene lediglich in Form von Peptiden, welche in körpereigenen Molekülen, die im Haupthistokompatibilitätskomplex (MHC) codiert werden, gebunden und auf der Zelloberfläche präsentiert werden. MHC-Moleküle sind polymorph, so dass eine Vielzahl verschiedener Antigene präsentiert und erkannt werden kann. Im Thymus erfolgt eine Selektion der T-Zellen mit T-Zell-Rezeptoren, die gewährleistet, dass nur das Erkennen von körpereigenen MHC-Molekülen und körperfremden Antigenen eine spezifische Immunantwort auslöst. Dies erfolgt durch negative Selektion, durch die T-Zellen mittels Apoptose eliminiert werden, die körpereigene, MHC-gebundene Peptide zu stark erkennen. Somit schützen die Selektionsmechanismen T-Zellen vor der Entwicklung einer Autoimmunität. Diese reifen, Antigen-naiven T-Zellen verlassen den Thymus und zirkulieren wie B-Zellen kontinuierlich über Blut- und Lymphgefäße durch sekundäre lymphatische Organe [33], bis sie auf ein entsprechendes Antigen treffen, welches in Form von Peptiden durch MHC-Moleküle einer Antigen-präsentierenden-Zelle (APZ) präsentiert wird. Zu den APZ gehören sowohl B-Zellen, Makrophagen, Monozyten und dendritische Zellen. Letztere stellen dabei die wichtigste Komponente zur Aktivierung naiver T-Zellen dar. Sie wandern nach Antigenkontakt im peripheren Gewebe zu sekundären lymphatischen Organen, wo sie

T-Zellen Antigene präsentieren [34]. Die Antigenbindung über den TZR stellt bei der Antigenpräsentation das erste Signal der T-Zellaktivierung dar. Zur vollständigen Aktivierung sind weitere kostimulatorische Signale notwendig, welche durch Membranmoleküle der APZ wie CD80/CD86 mit CD28 der T-Zelle vermittelt werden. Zusätzlich wird eine T-Zelle durch die Interaktion zwischen CD40L der T-Zelle und CD40 der APZ, sowie mittels Zytokine der APZ aktiviert [32]. Nach der T-Zellaktivierung kommt es zur Proliferation und Differenzierung der naiven T-Zelle zur antigenspezifischen Effektorzelle [5, 35], die je nach Differenzierungsstatus in zentrale T-Gedächtniszellen (T_{CM}), Effektor T-Gedächtniszellen (T_{EM}) oder End-differenzierte Effektor T-Gedächtniszellen (T_{EMRA}) eingeteilt werden [35].

Der TZR ähnelt vom Aufbau antigenspezifischen Immunglobulinen. Er besteht aus zwei nicht identischen Polypeptidketten mit jeweils einem konstanten, membranständigen, sowie einem variablen, peripheren Anteil, welche durch Disulfidbrücken verbunden sind. Analog zu B-Zellen entsteht die Vielfalt des TZR durch somatische Rekombination limitiert vererbter Gensegmente. Jedoch erkennt der TZR im Gegensatz zum BZR nur kurze Peptide, die in MHC-Molekülen gebunden werden (MHC-Restriktion). Zusätzlich ist der TZR mit einem CD3 Komplex assoziiert, welcher für die Weiterleitung des TZR-Signals ins Zellinnere verantwortlich ist [36].

Man unterscheidet T-Zellen in CD4 T-Helferzellen, die durch Zytokinsekretion andere Immunzellen beeinflussen oder in CD8 T-Zellen, die zytotoxisch aktiv sind. CD8 T-Zellen erkennen dabei Peptide von infizierten Zellen über MHC Klasse I Moleküle, die auf jeder kernhaltigen Zelle exprimiert werden. CD4 T-Helferzellen hingegen erkennen Peptide von extrazellulären Antigenen über MHC Klasse II Moleküle, die meist nur von professionellen Antigenpräsentierenden Zellen wie B-Zellen, dendritischen Zellen, Monozyten und Makrophagen exprimiert werden [37]. Anhand ihrer unterschiedlichen Funktionen werden CD4 T-Zellen in T-Helfer 1 (Th1) Zellen, welche die Zytokine IFN- γ , IL-2 und/oder TNF- α sezernieren und zur Abwehr von Pathogenen durch Unterstützung der Makrophagen beitragen und in Th2-Zellen, welche sich vor allem durch die Induktion von IL-4 auszeichnen [32, 38], unterteilt. Th2-Zellen sorgen für die Unterstützung der humoralen Immunität, da Th2-Zellen die Differenzierung von B-Zellen in Richtung Antikörper-sezernierende Plasmazellen unterstützen [32]. Zudem existieren weitere CD4 T-Zell Subtypen wie beispielsweise die regulatorischen T-Zellen, Th17-Zellen und folliculäre T-Helferzellen (Tfh)

[32, 39, 40]. Letztere spielen bei der B-Zell Aktivierung im Keimzentrum der sekundären lymphatischen Organe eine Rolle [32, 38]. Th17-Zellen produzieren vor allem IL-17 und IL-22 und führen zur Produktion und Reifung neutrophiler Granulozyten. Regulatorische T-Zellen hingegen inhibieren Immunantworten über immunsuppressiv wirkende Zytokine oder die Beeinflussung von APZ, so dass diese ihre stimulatorische Kapazität zur T-Zellaktivierung verlieren [32, 41].

Zytotoxische CD8 T-Zellen erkennen infizierte und maligne körpereigene Zellen und lysieren diese. Der zytotoxische Effekt wird durch die Ausschüttung von Molekülen wie Granzymen und Perforinen vermittelt, die direkt die Zelle schädigen oder durch die Bindung des Fas-Rezeptors an seinen Liganden die Apoptose der Zielzelle induzieren. Zytotoxische T-Zellen sezernieren zudem auch IFN- γ und TNF- α , welche direkt antivirale Mechanismen über die Aktivierung von Makrophagen induzieren. So hemmt IFN- γ die virale Replikation und führt zur verstärkten Expression von Molekülen, die die Präsentation von Antigenen im MHC Klasse I Präsentationsweg verstärken [42].

3.2.3 Vielfalt der MHC-Moleküle

MHC-Moleküle werden beim Menschen auch humanes Leukozyten Antigen (HLA) genannt und werden im Haupthistokompatibilitätskomplex (MHC, major histocompatibility complex) codiert. Der MHC ist auf Chromosom 6 im menschlichen Genom lokalisiert und besteht aus hoch polymorphen HLA Klasse I Genen (HLA-A, -B und -C), HLA Klasse II Genen (HLA-DR, -DQ und -DP), nicht-klassischen Klasse I Genen (HLA-E, -F und -G) und Klasse I ähnlichen Genen (MICA und MICB) [43]. Das MHC I Molekül ist unsymmetrisch aufgebaut und besteht aus einer schweren α -Kette, die nicht kovalent mit β 2-Mikroglobulin assoziiert ist. Die spezifische Bindung der Peptide findet in der Bindungsfurche statt, wobei Peptidfragmente einer Länge von ca. 9 Aminosäuren über Wasserstoffbrücken endständig in der Grube gebunden werden. Der Aufbau der MHC Klasse II Moleküle ist im Gegensatz zu den MHC Klasse I Molekülen symmetrisch. Sie bestehen aus einer α -Kette und einer nicht kovalent gebundenen β -Kette [43]. Die Peptidfragmente, die von MHC Klasse II Molekülen präsentiert werden, sind mit ≥ 15 Aminosäuren länger als die der Klasse I Moleküle und binden über den gesamten Bereich der Grube [32]. MHC Klasse II Moleküle werden normalerweise nur auf professionellen APZ exprimiert.

Da eine Vielzahl verschiedener Peptide erkannt werden muss, ist eine Vielfalt von MHC-Molekülen erforderlich. Jeder Mensch besitzt zwei Allele pro Genort, ein mütterlich und ein väterlich vererbtes Allel. Zusätzlich existieren verschiedene Allele für jeden HLA-Genort (Polygenie). So kann eine Person für HLA-A, -B, -C, -DR, -DQ, -DP bis zu 12 verschiedene MHC-Allotypen haben. Zudem sind HLA-Moleküle hochgradig polymorph, da viele Allele pro Genlocus vorhanden sein können (z.Bsp. HLA-A2, -A3, -A4, usw.). Dies bedingt, dass es zu einer hohen Vielfalt der MHC-Moleküle zwischen einzelnen Individuen kommt, die gewährleistet, dass grundsätzlich jedes Pathogen erkannt werden kann. Dies erfolgt je nach HLA-Ausstattung durch Erkennung unterschiedlicher Peptide und stellt sicher, dass sich ein bestimmter Erreger nicht in einer Population ausbreiten kann. Die hohe Vielfalt bedingt jedoch ebenfalls, dass HLA-Moleküle in ausgeprägter Weise humorale und zelluläre Abstoßungsreaktionen nach Transplantation auslösen können.

3.2.4 Die Antigenpräsentation

Die Präsentation von Peptiden in MHC Klasse I und II Molekülen auf der Zelloberfläche wird als Antigenpräsentation bezeichnet. Dabei unterscheiden sich die Prozessierungswege der Peptide, die über MHC Klasse I und MHC Klasse II Moleküle präsentiert werden.

3.2.4.1 Intrazelluläre Antigenprozessierung über MHC Klasse I Moleküle

Alle Viren replizieren in infizierten Zellen, da sie keinen eigenen metabolischen oder biosynthetischen Apparat besitzen. Dabei entstehen Proteine die für den Körper als fremd erkennbar sind und das Virus angreifbar machen. MHC Klasse I Moleküle präsentieren in der Regel Peptide an CD8 T-Zellen, die von im Zytosol synthetisierten Proteinen abstammen. Diese Proteine werden im Proteasom zu Peptidfragmenten abgebaut, die mittels des Transporters TAP (*transporter associated with antigen processing*) in das endoplasmatische Retikulum (ER) transportiert werden, wo die Beladung des MHC Klasse I Moleküls mit dem Peptid erfolgt (Abbildung 1A). Beladene MHC Klasse I Moleküle werden über den Golgi-Apparat auf die Zelloberfläche transportiert und dort als Peptid–MHC Klasse I Komplex präsentiert. Die Erkennung erfolgt durch spezifische CD8 T-Zellen [37, 44].

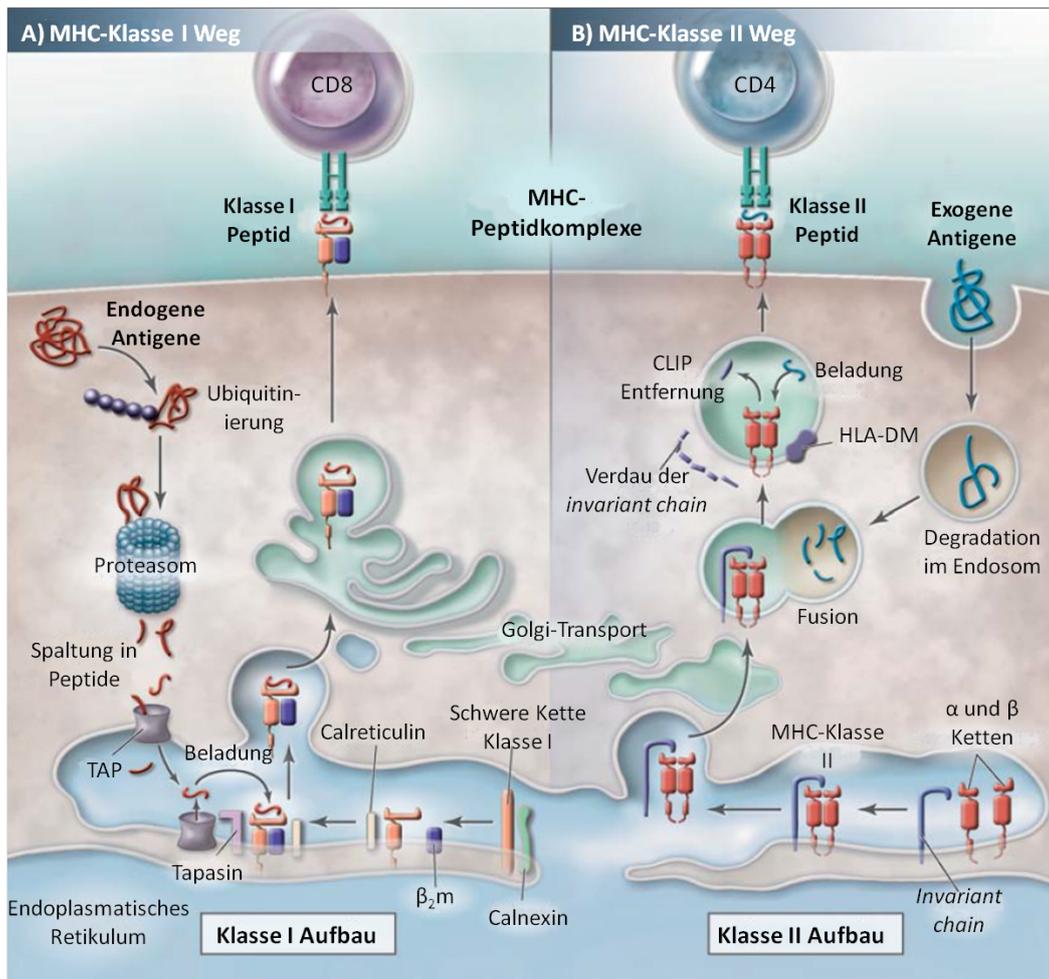


Abbildung 1: Schematische Darstellung der intrazellulären und extrazellulären Antigenprozessierung. (A) Bei der intrazellulären Antigenprozessierung werden endogene Antigene mittels Ubiquitin zur Degradierung markiert und im Proteasom werden diese ubiquitinylierten Proteine zu Peptid-Fragmenten prozessiert. Die Peptide werden dann mittels des TAP (*transporter associated with antigen processing*)-Komplexes ins endoplasmatische Retikulum (ER) transferiert. Im ER werden die Peptide an MHC Klasse I Moleküle gebunden. Der Prozess der Beladung findet mittels Tapasin und ER-Housekeeping Proteinen wie Calreticulin und ERp57 statt. Mittels des Golgi-Komplexes werden diese Peptid-beladenen MHC-Komplexe an die Zelloberfläche gebracht und dort T-Zellen präsentiert. **(B)** Bei der extrazellulären Antigenprozessierung werden exogene Antigene über Endozytose in die Antigenpräsentierende Zelle aufgenommen und in Endosomen degradiert. Die MHC-II-Moleküle werden über das Trans-Golgi-Netzwerk in das MHC-II-Kompartiment transportiert, wo durch Abbau der invarianten Kette und deren Spaltprodukt CLIP (*class II assoziierte invariante chain Peptid*) die Reifung der MHC-II-Moleküle stattfindet. Das nicht klassische MHC-II-Molekül HLA-DM (*human leucocyte antigen-DM*) ist für die Entfernung von CLIP und die Beladung der MHC-II-Moleküle mit Peptiden notwendig. Die Peptide der endozytierten Antigene werden an reife MHC Klasse II Moleküle gebunden und an die Zelloberfläche gebracht [45]. β_2m : β_2 -Microglobulin; CLIP: class II assoziierte invariante chain Peptid; MHC: Major histocompatibility complex; TAP: transporter associated with antigen processing. (Abbildung modifiziert nach [46]).

3.2.4.2 Extrazelluläre Antigenprozessierung über MHC Klasse II Moleküle

Peptide, die durch MHC Klasse II Moleküle präsentiert werden, stammen von Pathogenen außerhalb der Zellen ab (Abbildung 1B), die durch Phagozytose oder Rezeptor-vermittelte Endozytose aufgenommen und durch MHC Klasse II exprimierende professionelle APZ (wie dendritische Zellen, Makrophagen und B-Lymphozyten) prozessiert werden. Im Phagosom

entstehen Peptide, die nach Verschmelzung des MHC Klasse II Molekül-tragenden Vesikels mit dem Phagolysosom auf MHC Klasse II Moleküle geladen werden. Das Peptid-beladene MHC Klasse II Molekül wird dann an die Zelloberfläche transportiert, wo es von CD4 T-Zellen erkannt wird [37, 44].

3.2.4.3 Kreuzpräsentation

Bei der Kreuzpräsentation werden Antigene bzw. Proteine von extrazellulär aufgenommen, jedoch die daraus hervorgehenden antigenen Peptide über MHC Klasse I Komplexe den zytotoxischen CD8 T-Zellen auf dem endogenen Weg präsentiert. Durch Kreuzpräsentation können folglich auch exogen aufgenommene Antigene, die nicht in den APZ selber gebildet wurden, über MHC Klasse I Moleküle präsentiert werden [44]. Die Kreuzpräsentation ist vor allem bei denjenigen Virusinfektionen, welche die HLA-Expression der infizierten Zellen unterdrücken, sowie bei Tumoren mit verminderter HLA-Expression von Bedeutung [47]. In diesen Fällen ist die Aktivierung der zytotoxischen T-Zellen nur über exogen, von APZ aufgenommene und über Kreuzpräsentation präsentierte, Peptide der Viren/Tumorzellen möglich.

3.3 Immunologische Mechanismen der Abstoßungsreaktion

Neben der Immunabwehr von Pathogenen kann das Immunsystem auch Gewebemerkmale anderer Organismen als fremd erkennen. So kann es bei Transplantationen zu Immunantworten des Empfängers gegen Gewebemerkmale kommen, die sich zwischen Spender und Empfänger unterscheiden. Da HLA-Moleküle naturgemäß hoch polymorph sind, zählen diese zu den Molekülen, die in erster Linie Abstoßungsreaktionen vermitteln. Das Risiko einer Abstoßungsreaktion korreliert daher auch mit dem Grad der Nicht-Übereinstimmung in den HLA-Molekülen (HLA-Mismatche) zwischen Spender und Empfänger [12, 13].

3.3.1 Einteilung von Abstoßungsreaktionen

Abstoßungsreaktionen können humoral und/oder zellulär vermittelt sein und werden nach ihrem Mechanismus und ihrem zeitlichen Auftreten nach Transplantation in hyperakute, akute und chronische Abstoßungen eingeteilt. So tritt eine hyperakute Abstoßungsreaktion innerhalb von Minuten bis Stunden nach einer erfolgten Transplantation auf und wird durch präformierte HLA-spezifische Antikörper vermittelt. Diese Antikörper binden an das

Endothel, wodurch es zur Komplementaktivierung kommt, die zumeist zu Fibrinablagerungen in den Gefäßen des Transplantates und somit zum Gefäßverschluss führt. Eine akute Abstoßungsreaktion findet meist Tage bis Wochen nach einer Transplantation statt und ist häufig durch eine Infiltration von zytotoxischen T-Lymphozyten im Transplantat gekennzeichnet. Jedoch können auch Antikörper des Empfängers gegen Alloantigene der Epithelzellen des Transplantates auslösend sein. Chronische Abstoßungsreaktionen schließlich finden Monate bis Jahre nach der Transplantation statt und können ebenfalls sowohl humoral als auch zellulär vermittelt sein. Dabei geht ein kontinuierlich fortschreitender Verschluss der Gefäße des Transplantates mit einem allmählichen Funktionsverlust des Transplantates einher.

Eine humorale Abstoßung wird durch Antikörper des Empfängers vermittelt, die sich an Endothelzellen des Transplantates anlagern und Komplement aktivieren (Abbildung 2A) [46]. Durch die Komplementaktivierung kann es zur Koagulation bzw. zur Endothelzellnekrose des Spenderorgans kommen. Die Bedeutung des Komplements bei der Antikörper-vermittelten Abstoßungsreaktion zeigt sich zum Beispiel durch die Bindung von Antikörper an C1q, welches den ersten Schritt der klassischen Aktivierung der Komplementkaskade darstellt. Dabei zeigten Patienten, die nach ihrer Nierentransplantation Spender-spezifische Antikörper (Donor-spezifische Antikörper, DSA) ohne komplementbindende Komponente entwickelten, ein besseres fünf-Jahres Transplantatüberleben als Patienten die komplementbindende C1q DSA hatten (93% vs. 54%). Patienten ohne DSA hatten fünf Jahre nach ihrer Transplantation das beste Transplantatüberleben mit 94% [48, 49].

Im Gegensatz zu einer humoralen Abstoßungsreaktion wandern bei einer zellulär vermittelten Abstoßungsreaktion Empfängerlymphozyten über die Endothelzellen der Blutgefäße in das Spenderorgan ein. Falls die Empfängerlymphozyten auch die Basalmembran angreifen, kann dies bei einer Nierentransplantation zu einer irreversiblen Tubulitis führen (Abbildung 2B).

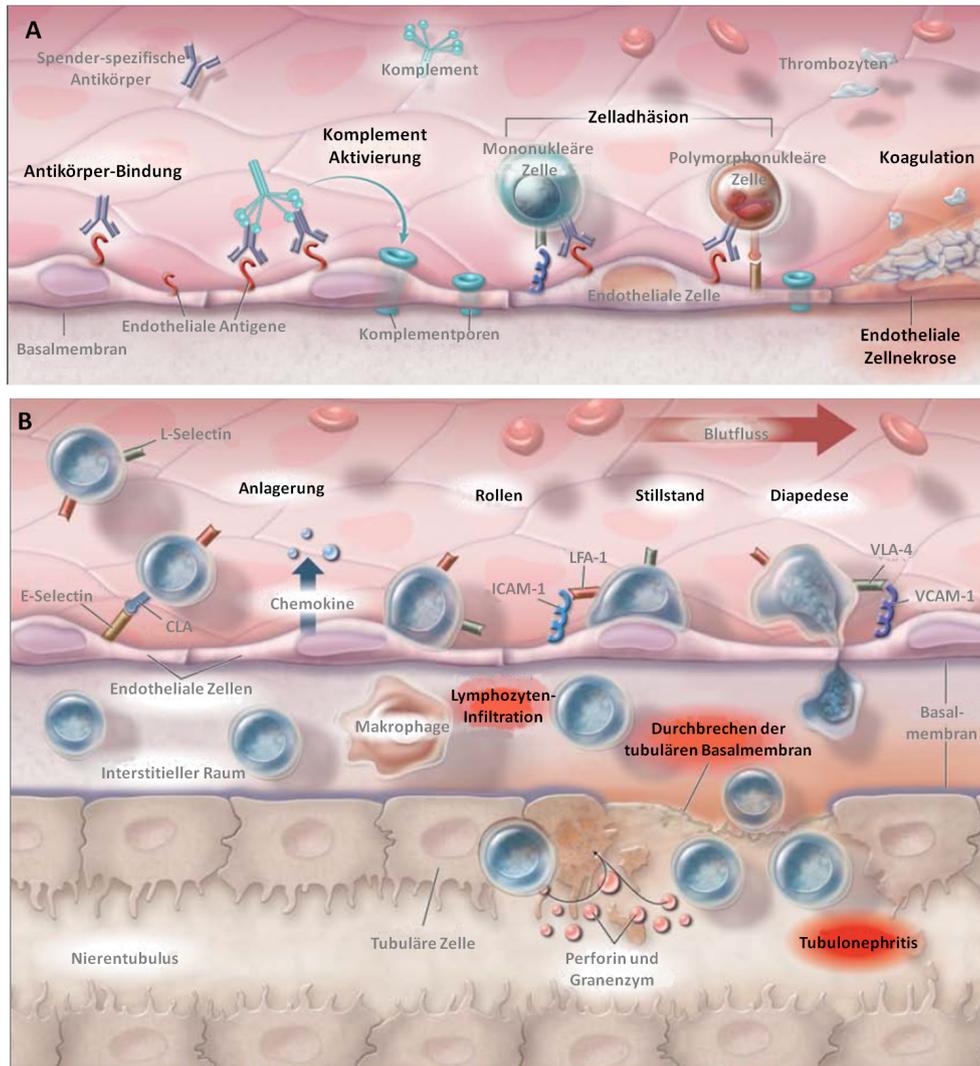


Abbildung 2: Einteilung von Abstoßungsreaktionen nach ihrem immunologischen Mechanismus in akute Antikörper-vermittelte und zellulär-vermittelte Abstoßungsreaktionen. (A) Bei akuten Antikörper-vermittelten Abstoßungsreaktionen binden Antikörper des Empfängers, die gegen Spender-Antigene gerichtet sind, an Spender-Antigene, die auf endothelialen Zellen im Transplantatgefäß exprimiert werden. Durch die anschließende Komplementaktivierung und Zelladhäsion kann es zur endothelialen Zellnekrose, gefolgt von Thrombozyten-Ablagerung und Koagulation kommen. **(B)** Eine zelluläre Abstoßungsreaktion entsteht durch eine initiale Bindung und Anlagerung der Effektor T-Lymphozyten (die Selektine und Integrine auf endothelialen Zellen binden) des Empfängers an das Transplantatepithel. Lymphozyten und andere Immunzellen gelangen in den interstitiellen Raum und können in den Tubulus eindringen, in dem sie lokale Gewebeverletzungen verursachen und somit zu einer Tubulitis führen können. ICAM-1: intercellular adhesion molecule 1; LFA-1: leukocyte-function associated antigen; VCAM-1: vascular-cell adhesion molecule 1; VLA-4: very late antigen 4. (Abbildung modifiziert nach [46]).

3.3.2 Direkte und indirekte Alloreaktion

Bei genauerer Betrachtung der Induktion alloreaktiver T-Zellen können Spenderantigene von dendritischen Zellen (DC) des Spenders oder des Empfängers präsentiert werden. Beide Mechanismen können die Induktion einer Abstoßungsreaktion auslösen. Die Präsentation der Spenderantigene durch APZ des Spenders wird als direkte Antigenpräsentation bezeichnet, während die Präsentation der Spenderantigene durch APZ des Empfängers als

indirekte Präsentation bezeichnet wird, da diese einer Aufnahme und Prozessierung der Spenderantigene bedarf. Zudem gibt es die semidirekte-allogene Antigenerkennung, bei der eine Überlappung zwischen dem indirekten und direkten Allogenerkennungsweg vorliegt. Alle drei Wege können unabhängig voneinander oder gleichzeitig auftreten (Abbildung 3) [43].

Bei der indirekten Allogenerkennung werden die T-Zellen des Empfängers durch Alloantigene, die prozessiert und durch Empfänger-HLA präsentiert werden, aktiviert, so dass dieser Prozess der Induktion einer Immunantwort auf Pathogene entspricht. Spenderantigene, die das transplantierte Organ verlassen, werden prozessiert und in HLA Klasse II Molekülen mittels der B-Zellen und DC des Empfängers präsentiert. Im indirekten Weg werden daher von aktivierten T-Lymphozyten Zytokine sezerniert, die verschiedene Effektorzellen, wie Makrophagen oder zytotoxische T-Lymphozyten, aktivieren und somit zur konsekutiven Destruktion des Transplantates und damit zur chronisch Abstoßung beitragen [43, 50, 51].

Bei der direkten Allogenerkennung erfolgt die Aktivierung der Empfänger T-Zellen durch Spender HLA-Peptidkomplexe. Die Antigenpräsentation wird vermittelt durch DC des Spenders, die aus dem transplantierten Organ stammen. Die Spender DC präsentieren den Empfänger T-Zellen intakte Spender-HLA-Peptidkomplexe. Wie bei der indirekten Präsentation hängt die Stärke der gegen das Transplantat gerichteten Immunantwort von der Frequenz der alloreaktiven T-Zellen des Empfängers ab, die während der ersten Wochen nach der Transplantation induziert werden. Die weitere Induktion einer Immunantwort durch direkte Präsentation lässt nach, sobald die Spender-APZ das Transplantat verlassen haben. CD4 T-Zellen, die durch den direkten Erkennungsweg aktiviert werden, sind in der Lage Effektor CD8 T-Zellen zur Unterstützung zu rekrutieren und fördern deshalb die Abstoßung des transplantierten Organs. Eine Aktivierung von B-Zellen und Produktion von Alloantikörpern findet im Kontext einer direkten Erkennung nicht statt, da es keine Interaktion zwischen T-Helferzellen und B-Zellen gibt [43].

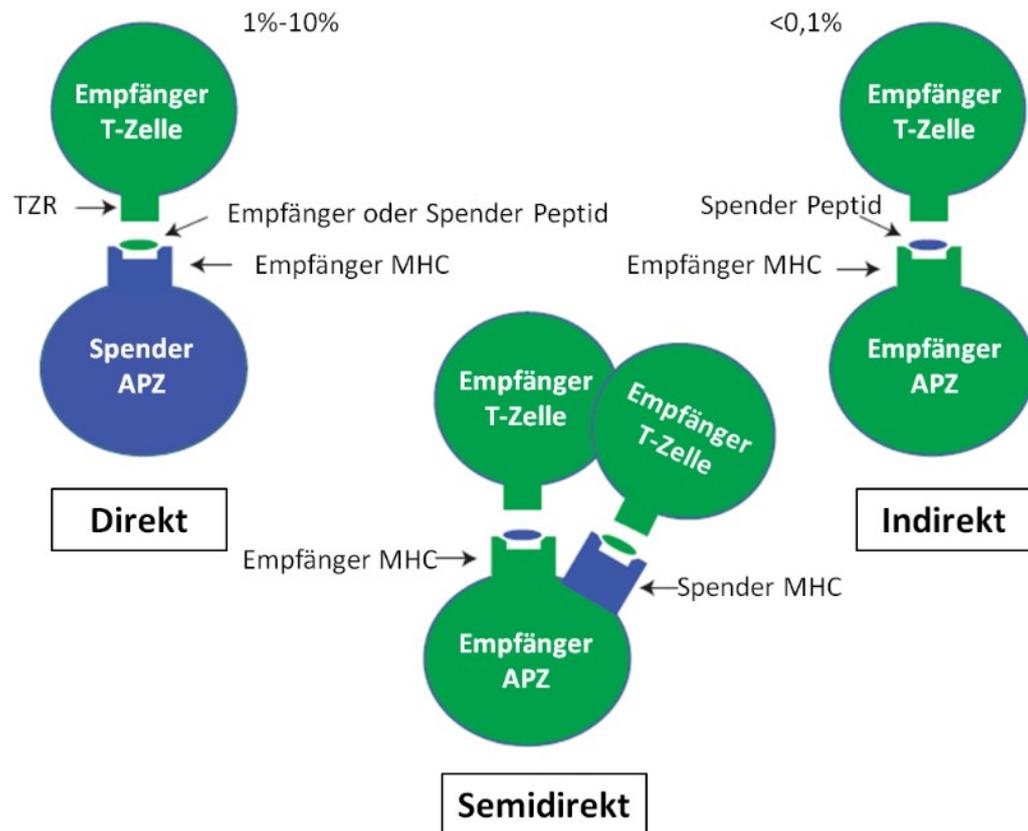


Abbildung 3: Schematische Darstellung der drei Alloantigen-Präsentationswege. Mechanismus der drei Alloantigen-Präsentationswege (direkter, indirekter und semidirekter Weg). Soweit bekannt sind die Frequenzen alloreaktiver T-Zellen für jeden Weg angezeigt. Bei der direkten Allogenerkennung erkennen T-Zellen des Empfängers Spender-MHC-Moleküle der Antigenpräsentierenden Zelle (APZ) des Spenders, die ihrerseits allogene Peptide des Spenders präsentiert. Beim indirekten Allogenerkennungsweg werden allogene Peptide des Spenders von APZ des Empfängers prozessiert und von Empfänger-MHC-Molekülen den CD4 T-Helferzellen präsentiert. Beim semidirekten Allogenerkennungsweg erkennen T-Zellen des Empfängers Spender-MHC-Moleküle oder aber auch Empfänger-MHC-Moleküle auf den APZ des Empfängers. Alle drei Wege führen zur Aktivierung von CD4 T-Zellen, die durch Zytokinsekretion weitere Immunzellen, wie zytotoxische CD8 T-Zellen, aktivieren. APZ: Antigenpräsentierende Zelle; MHC: Major histocompatibility complex; TZR: T-Zell-Rezeptor. (Abbildung modifiziert [52]).

Der semi-direkte Antigenerkennungsweg beruht auf der Beobachtung eines Transfers von intakten MHC-Molekülen zwischen Zellen [53, 54]. DC können sich intakte MHC Klasse I und II Moleküle über Exosome aneignen, die von anderen DCs sezerniert werden [55, 56]. Dabei nehmen die APZ des Empfängers Spender MHC Komplexe auf. Auf diese Weise können T-Zellen des Empfängers direkt durch Spender-MHC-Moleküle und indirekt durch Empfänger-MHC-Moleküle auf APZ des Empfängers aktiviert werden.

3.3.3 Präformierte und *de novo* induzierte Alloreaktivität

Eine zelluläre oder aber auch humorale Alloreaktivität eines Empfängers gegen das Spenderorgan kann bereits vor einer Transplantation vorhanden sein. Man spricht dann von einer präformierten Alloreaktivität. Falls sich die Alloreaktivität erst im Verlauf nach

Transplantation ausbildet, handelt es sich um eine *de novo* induzierte Alloreaktivität. Beide Formen der Alloreaktivität können zu Abstoßungsreaktionen führen.

3.3.4 Immunisierungsereignisse zur Induktion einer Alloreaktion

Das Ausmaß von sowohl präformierter als auch induzierter Alloreaktivität hängt von vorangegangenen Immunisierungsereignissen ab. Hierzu zählen stattgehabte Kontakte mit körperfremdem Gewebe, wie beispielsweise durch vorangegangene Bluttransfusionen, Schwangerschaften oder Transplantationen. Zudem können sowohl vorbestehende zelluläre als auch humorale Immunantworten gegen Infektionen kreuzreaktives Potential gegen Spenderantigene besitzen. Dabei kann die Stabilität und Natur der präformierten Alloreaktivität abhängig vom Immunisierungsereignis variieren [43].

3.3.4.1 Immunisierung durch vorangegangene Transfusionen

Interessanterweise liegt die Inzidenz für eine Alloimmunisierung in Folge einer Transfusion in der Normalbevölkerung bei weniger als 2% [43, 57]. Im Gegensatz dazu scheint ein Drittel der Transplantationskandidaten mit einer vorangegangenen Transfusion allo-sensibilisiert zu sein [58]. Dieser Unterschied kann dadurch zustande kommen, dass Transplantationskandidaten häufiger Bluttransfusionen erhalten und dadurch eher eine Immunantwort entwickeln als Nicht-Transplantierte [43]. Eine Transfusion alleine ist nur schwach immunogen. Eine Sensibilisierung auf HLA-Antigene mittels Bluttransfusionen benötigt sehr große Blutvolumina oder eine Vielzahl an Transfusionsereignissen, um persistent eine HLA-Allosensibilisierung zu induzieren [43].

3.3.4.2 Immunisierung durch vorangegangene Schwangerschaft

Erfolgreich verlaufene Schwangerschaften, Fehlgeburten und spontane Aborte können ebenfalls alloreaktive Immunantworten induzieren [43]. Anti-paternale Alloantikörper treten um die 28. Schwangerschaftswoche auf [43, 59]. Sensibilisierte Frauen haben häufiger Schwangerschaften durchlaufen als nicht-sensibilisierte Frauen. Bei einem Drittel bis nahezu der Hälfte der Frauen kommt es im Zuge der ersten Schwangerschaft nach Geburt des Kindes zu einer Allo-Immunisierung gemessen anhand des Auftretens von HLA-Antikörpern mittels Luminex-Messverfahren und die Immunisierungshäufigkeit nimmt mit zunehmender Anzahl an Schwangerschaften zu (erste Schwangerschaft 47,9% HLA-Antikörper vs. mehr als zwei Geburten 74%) [60]. Antikörper der HLA Klasse I treten etwas häufiger als Antikörper der

HLA Klasse II auf (86% versus 62%) [60]. Frauen, die nach einer Schwangerschaft eine Nierenlebenspende der Väter ihrer Kinder oder ihrer Nachkommen erhalten, zeigen höhere Abstoßungsraten als Frauen bei anderen Transplantationen [61, 62], da diese Frauen nach einer Transplantation wieder paternalen Antigenen ausgesetzt waren [43, 61].

Da Nachweisverfahren zur Existenz von gegen paternale Antigene gerichteter zellulärer Immunität derzeit nicht im klinischen Einsatz sind, ist die Entwicklung von zellulären Immunantworten von Frauen gegen den Vater ihrer Kinder vor, sowie im Verlauf und nach einer Schwangerschaft bislang nur unzureichend untersucht. Ein Ziel dieser Arbeit ist es daher ein Nachweisverfahren für zelluläre allogene Immunantworten zu etablieren und an verschiedenen Patientenkollektiven mit und ohne vorangegangene Sensibilisierungsereignisse zu testen.

3.3.4.3 Immunisierung durch vorangegangene Transplantationen

Da eine Transplantation selbst ein signifikantes immunisierendes Ereignis darstellt [43], kann diese bei wiederholter Transplantation zu einer präformierten Alloreaktivität vor der nachfolgenden Transplantation führen. Nicht-vorimmunisierte Transplantat-Empfänger einer Leber oder Niere entwickeln in 8-11% innerhalb des ersten Jahres nach Transplantation *de novo* induzierte Antikörper gegen Gewebemerkmale des Spenders (*de novo* Donorspezifische Antikörper, DSA) [63, 64]. Dieser Anteil steigt bei Betrachtung eines 10 Jahreszeitraums sogar auf 25% bei Nierentransplantationen an [63].

Vor diesem Hintergrund werden Patienten auf der NierenTransplantationswarteliste quartalweise auf präformierte alloreaktive Antikörper untersucht. Diese HLA-Antikörper können bei einer Zweittransplantation beispielsweise gegen HLA-Merkmale des Spenders der vorangegangenen Transplantation gerichtet sein. Falls HLA-Antikörper, die gegen ein ehemaliges Transplantat gerichtet waren, auftreten, werden diese meist für eine weitere Transplantation ausgeschlossen („unacceptable HLA-Antigens“) [65, 66]. Aufgrund der herrschenden Organknappheit, werden diese quartalweise Standardtestungen auf präformierte alloreaktive Antikörper allerdings derzeit routinemäßig nur bei Patienten auf der Warteliste für eine Niere und nicht bei anderen Organwartelisten durchgeführt. Wenngleich alloreaktive T-Zellen ebenfalls induziert werden könnten, gibt es derzeit kein routinetaugliches Verfahren, mit dem diese bereits vor Transplantation erfasst werden können.

3.3.4.4 Alloreaktion durch Kreuzreaktivität

Neben immunisierenden Ereignissen wie Transfusionen, Schwangerschaften und Transplantationen können auch vorangegangene Infektionen über den Mechanismus der Kreuzreaktivität zu einer Alloimmunität führen. Dabei hat ein Antikörper oder eine T-Zelle die Fähigkeit an Antigene zu binden die Ähnlichkeiten zwischen Erreger-Antigenen und Spender-Antigenen aufweisen. Im Fall einer Transplantation kann sich eine Immunität, die durch vorangegangene Infektionen zustande gekommen ist, durch kreuzreaktives Potential gegenüber Spenderantigenen nachteilig auf das Transplantatüberleben auswirken, da sowohl kreuzreaktive humorale als auch zelluläre Immunantworten zu einem erhöhten Risiko eines Abstoßungsereignisses nach einer Transplantation führen können [67-69].

3.4 Maßnahmen zur Verhinderung von Abstoßungen

Ein Ziel der Transplantationsmedizin ist die Verhinderung von Abstoßungsreaktionen nach Transplantation. Die derzeit gebräuchliche Therapie stellt die Gabe immunsuppressiver Medikamente dar, deren Anzahl und Dosierung in Abhängigkeit des transplantierten Organs und des Risikoprofils des Empfängers variieren.

Zudem können Abstoßungsreaktionen durch diagnostische Verfahren vor und nach Transplantation minimiert werden. Dies erfordert die Identifizierung von Risikofaktoren auf Seiten des Empfängers und des Spenders. Zudem setzt dies voraus, dass das Auftreten von Immunreaktionen des Empfängers gegen das Spenderorgan mittels verschiedener Methoden im klinischen Alltag vorhergesagt werden kann, um entsprechend therapeutisch einzugreifen.

3.4.1 Medikamentöse Immunsuppression

Durch eine immunsuppressive Therapie wird die körpereigene Immunreaktion nach einer Organtransplantation abgeschwächt. Diese Therapie wirkt unspezifisch und hemmt zum einen die präformierte Alloreaktivität. Zum anderen wird die Induktion einer Alloreaktivität unterdrückt. In der Regel ist eine immunsuppressive Therapie lebenslang notwendig, um das transplantierte Organ nicht abzustößen.

In der Regel werden im Rahmen einer immunsuppressiven Therapie drei bis vier Medikamente mit unterschiedlichen Wirkprinzipien in Kombination eingesetzt. Zu den am häufigsten in der Transplantationsmedizin verwendeten immunsuppressiven Medikamenten

zählen Calcineurininhibitoren, wie Cyclosporin A, das einen Komplex mit Cyclophilin, oder Tacrolimus (FK506), welches einen Komplex mit FK506 bindendem Protein (FKBP) in T-Lymphozyten bildet. Beide Medikamente inhibieren die Calciumbindung an Calcineurin und damit die Induktion der Phosphataseaktivität [32, 70]. Calcineurin löst die Signaltransduktion zur Expression von IL-2 in aktivierten Zellen aus, als Konsequenz der Calcineurininhibition unterbleibt die IL-2 Produktion und Expression des IL-2-Rezeptors, was eine Hemmung der klonalen Expansion und Differenzierung der aktivierten T-Zellen zur Folge hat [70, 71]. Zudem kommen Proliferationsinhibitoren wie Mycophenolatmofetil (MMF) oder Azathioprin zum Einsatz. Dabei wird die *de novo* Synthese von Purinen, und somit die DNA-Synthese, unterdrückt und eine T-Zellproliferation inhibiert [72, 73]. MMF hemmt nicht-kompetitiv reversibel die Inositolmonophosphatdehydrogenase, ein Schlüsselenzym der *de novo* Synthese von Purin. T- und B-Lymphozyten sind auf die *de novo* Synthese von Purin angewiesen, da sie unfähig sind den Wiederverwertungsstoffwechsel von Purin zu nutzen [72, 73]. Des Weiteren werden mTOR Inhibitoren (*mammalian Target of Rapamycin*) wie Rapamycin (Sirolimus oder Everolimus) eingesetzt, die die Signaltransduktionswege durch Komplexbildung mit dem Protein mTOR, das auch an FKBP bindet, inhibiert. Dieser Komplex von Rapamycin/FKBP blockiert die Aktivierung von mTOR, aber nicht von Calcineurin [32] und somit wird, ebenso wie unter Gabe von Antimetaboliten, die Proliferationsfähigkeit der Zellen unterbunden. Neben diesen proliferationshemmenden, immunsuppressiven Medikamenten werden Steroide wie zum Beispiel Prednisolon verabreicht. Diese hemmen unspezifisch eine Vielzahl von Komponenten des Immunsystems, wodurch auch erhebliche Nebenwirkungen induziert werden können [74].

In der Transplantationsmedizin werden zur Immunsuppression auch Antikörper eingesetzt. Unter diesen hat Basiliximab einen besonderen Stellenwert, ein chimärer nicht-depletierender IL-2 Rezeptor Antikörper. Basiliximab bindet dabei an die α -Kette des IL-2 Rezeptors (CD25) der T-Lymphozyten und blockiert somit das durch IL-2 vermittelte Proliferationssignal und hemmt selektiv die Vermehrung aktivierter T-Zellen [75-77].

Nicht-depletierende antagonistische Antikörper wie CTLA-4-Ig (Belatacept) blockieren die T-Zellaktivierung bzw. das Kostimulationssignal zwischen CD28, welches von naiven T-Zellen exprimiert wird, und CD80 oder CD86 auf den APZ und unterdrücken somit die Induktion von

Immunantworten [32, 78, 79], indem sie die frühe Lymphozytenaktivierung durch die Blockade des IL-2-Rezeptors hemmen.

Durch monoklonale CD20 Antikörper wie Rituximab, der gegen B-Zellen gerichtet ist und dadurch die Antikörperproduktion effektiv hemmt, sind Blutgruppeninkompatible Transplantationen bei Nieren-Lebendspenden möglich [80, 81]. Dabei wird eine B-Zell-Depletion mittels Apoptose, Komplement-abhängiger B-Zell Lyse und Antikörper-abhängiger Zell-vermittelter Zytotoxizität in Gang gesetzt [81].

Um eine Depletion alloreaktiver T-Zellen zu erzielen, kann vor einer Transplantation Antithymozytenglobulinantikörper (ATG) verabreicht werden, welches die präformierten alloreaktiven T-Zellen des Empfängers zerstört. Dieses Medikament kann auch nach einer Transplantation bei einem Verdacht auf eine akute zelluläre Abstoßungsreaktion zum Einsatz kommen und somit eine Transplantat-Abstoßung verhindern. Es besteht aus einem Gemisch polyklonaler Antikörper, die gegen Oberflächenantigene von T- und B-Lymphozyten, aber auch DCs, NK-Zellen und Makrophagen gerichtet sind [82-84].

Am Universitätsklinikum des Saarlandes in Homburg wird bei Nierentransplantierten generell ein Standardregime an immunsuppressiven Medikamenten verabreicht, das den Calcineurininhibitor FK506, MMF, Steroide und die Gabe eines IL-2 Rezeptorantikörpers umfasst [85].

3.4.2 Methoden zur Minimierung des Abstoßungsrisikos nach Transplantation

Standardverfahren zur Erfassung des humoralen Abstoßungsrisikos nach Transplantation

Um das Risiko einer Abstoßung zu minimieren kommen vor Transplantation standardmäßig verschiedene Methoden zum Einsatz um eine geeignete Spenderauswahl treffen zu können. So werden Patienten auf der NierenTransplantationswarteliste quartalweise auf das Vorhandensein von Panel-reaktiven Antikörpern (PRA) getestet. Hierunter fasst man Antikörper des Empfängers gegen ein Panel von mindestens 50 Blutspendern mit verschiedenen HLA-Antigenen zusammen [86-88]. Werden PRA gegen bestimmte HLA-Moleküle mit hoher Spezifität nachgewiesen, werden potentielle Spender mit diesen HLA-Allelen für eine Transplantation ausgeschlossen.

Liegt ein geeignetes Spenderangebot vor, so wird unmittelbar vor der Transplantation ein Crossmatch Test durchgeführt, um die humorale Reaktivität des Transplantatempfängers

gegen diese Spender-spezifischen Antigene zu messen. Dieses Testverfahren wird standardmäßig in der klinischen Routine vor einer Transplantation mitgeführt, um vor allem hyperakute Abstoßungsreaktionen zu verhindern. Ein negatives Crossmatch Testergebnis stellt somit die Voraussetzung für eine Transplantation laut den Richtlinien der BÄK dar [88].

Die Analyse der Antikörper erfolgt mittels mikrolymphozytotoxischer Tests, wie dem CDC-Crossmatch (complement depending crossmatch) oder dem Flow Crossmatch. Bei dem CDC-Crossmatch werden nach Inkubation des Empfängerserums mit den isolierten Lymphozyten des Spenders Komplementkomponenten hinzugefügt (Abbildung 4A). Kommt es nach der Komplementzugabe zu einer Spenderlymphozytenlyse, dann spricht dies dafür, dass beim Empfänger Antikörper gegen HLA-Antigene der Spenderzellen vorhanden sind [89, 90]. Durch die Zugabe von Dithiothreitol (DTT) kann ein falsch positives Testresultat durch IgM-Antikörper ausgeschlossen werden [90, 91], die im Kontext der humoralen Abstoßungsreaktion eine untergeordnete Rolle spielen. Beim Flow-Crossmatch werden Antikörper des Empfängers gegen Antigene auf Spenderzellen mittels Fluorochromgekoppelter anti-human IgG nachgewiesen [90, 92, 93].

Den mikrolymphozytotoxischen Tests stehen die Festphasen-Immunoassays gegenüber. Hierzu zählen der ELISA (*Enzyme-linked Immunosorbent Assay*) oder das Luminex-Messverfahren, mittels derer, wie im CDC-Crossmatch, das Vorhandensein präformierter HLA-Antikörper ermittelt werden kann [93]. Dabei werden HLA-Antigene des Spenders an eine feste Phase (beim ELISA an eine Mikrotiterplatte, beim Luminex an ein Mikro-Bead) gebunden und mit dem Serum des Empfängers versetzt. Sind im Empfängerserum Antikörper gegen die Spender HLA-Antigene vorhanden, kommt es zur Antigen-Antikörperbindung, die in beiden Systemen durch einen Sekundärantikörper mit Farb- oder Fluoreszenzreaktion detektiert wird (Abbildung 4B) [86, 94]. Das Luminex-Testverfahren ersetzt zunehmend die Methode des CDC-Crossmatches im klinischen Alltag. So erfolgt bereits ein großer Teil der PRA-Bestimmungen über das Luminex-Testverfahren, wenngleich die Richtlinien der Bundesärztekammer vorsehen, dass einmal im Jahr eine PRA-Bestimmung über eine (mikrolymphozytotoxische) Crossmatch-Methode erfolgen muss [88].

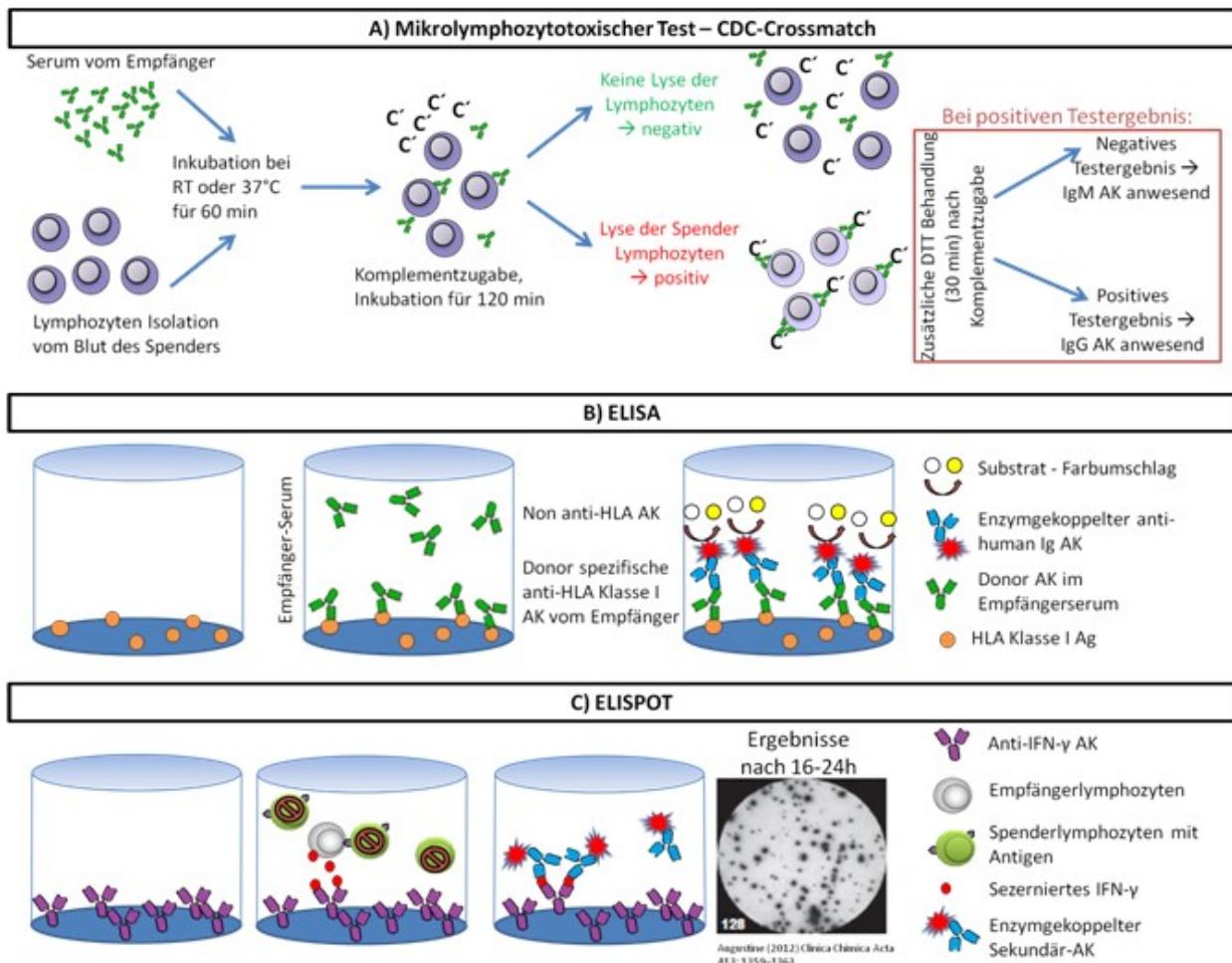


Abbildung 4: Schematische Darstellung verschiedener Testprinzipien zum Nachweis einer humoral- oder zellulär-vermittelten präformierten Alloreaktivität. (A) Mittels des Complement dependent Crossmatch (CDC) Testes können Spender-spezifische HLA-Antikörper detektiert werden. Lymphozyten vom Spender werden aufgereinigt und zusammen mit Serum des Empfängers (in dem sich AK befinden können) für 60 min inkubiert. Anschließend wird zu diesem Zell-AK Gemisch (Meerschweinchen-)Komplement hinzugefügt und für weitere 2 h inkubiert. Falls der Empfänger HLA-AK besitzt, die gegen die Spenderzellen gerichtet sind, kommt es zur Zelllyse der Spenderzellen (positiver Test). Um nachzuweisen, dass es sich auch tatsächlich um alloreaktive und nicht um autoreaktive AK handelt, erfolgt bei einem positiven Testergebnis eine weitere Behandlung des Zell-AK-Komplement-Gemisches für 30 min mit Dithiothreitol (DTT), welches die Disulfidbindungen in IgM-AK reduziert. Bleibt das Testergebnis positiv handelt es sich um IgG-AK (alloreaktive AK), ist es negativ, handelt es sich um IgM-AK. **(B)** Bei den beiden Festphasenimmunoassays, dem ELISA (*Enzyme-linked Immunosorbent Assay*) und dem Luminex-Messverfahren, zur Detektion präformierter HLA-AK, werden HLA-Antigene an eine feste Phase gebunden (beim ELISA an eine Platte und beim Luminex an einen Mikro-Bead), und anschließend das Serum des Empfängers hinzugefügt. Sind im Empfängerserum HLA-AK gegen den Spender vorhanden, kommt es zur Antigen-Antikörper-Bindung, die mittels Sekundäntikörper sichtbar gemacht werden kann (im ELISA: Enzymgekoppelte AK, die nach Substratzugabe einen Farbumschlag vermitteln; im Luminex-Messverfahren: Fluoreszenz-AK, die mittels Laser angeregt werden). **(C)** Mittels ELISPOT (*Enzyme-linked immunospot*)-Verfahren ist es möglich präformierte alloreaktive T-Zellen nachzuweisen. Empfänger- und Spenderlymphozyten werden isoliert. Die Spenderlymphozyten werden im Anschluss mittels Bestrahlung oder Mitomycin-Behandlung inaktiviert, so dass nur die alloreaktive Antwort der Empfängerzellen und nicht die der Spenderzellen erfasst wird. Falls eine Alloreaktion vorhanden ist, sezernieren alloreaktive Empfängerlymphozyten das Zytokin IFN- γ , das an die auf der Platte gebundenen anti-IFN- γ AK binden kann. Nach einem Waschschrift erfolgt die Detektion der IFN- γ sezernierenden Lymphozyten mittels eines Enzymgekoppelten Sekundäntikörpers. Jeder Spot zeigt dabei eine IFN- γ produzierende Zelle an. AK: Antikörper; CDC: Complement dependent Crossmatch; DTT: Dithiothreitol; ELISA: Enzyme-linked Immunosorbent Assay; ELISPOT: Enzyme-linked immunospot; HLA: Human leukocyte antigen; IFN- γ : Interferon gamma.

Experimentelle Verfahren zur Erfassung des zellulären Abstoßungsrisikos nach Transplantation

Trotz Existenz verschiedenster experimenteller Methoden gibt es bislang kein Verfahren zur Bestimmung einer präformierten zellulären Alloreaktivität in der klinischen Routine. Verschiedene Langzeit-Methoden zum Nachweis präformierter zellulärer Alloreaktivität setzen eine Proliferation von mehreren Tagen voraus. Hierzu zählen beispielsweise die Limiting Dilution Analyse [95-97] oder Proliferationsmethoden auf Basis von CFSE (*Carboxyfluorescein succinimidyl ester*) oder radioaktiver Nukleinsäurebestandteile [95]. Im Gegensatz zu diesen Langzeit-Methoden sind auch Kurzzeit-Methoden, wie zum Beispiel das ELISPOT (*Enzyme-linked immunospot*) Testverfahren etabliert [95]. Dabei werden isolierte Empfänger- und Spenderlymphozyten in einer gemischten Lymphozytenreaktion in einer Mikrotiterplatte über einen Zeitraum von 16-20 h stimuliert. Das durch alloreaktive T-Zellen sezernierte IFN- γ wird lokal am Plattenboden über einen anti-IFN- γ Antikörper gebunden. Nachfolgend wird der Anteil alloreaktiver T-Zellen über die lokale IFN- γ Produktion mittels eines Enzymgekoppelten Sekundärantikörpers als Spots sichtbar gemacht. Jeder Spot auf einer Platte steht dabei für eine IFN- γ produzierende Zelle (Abbildung 4C) [98, 99]. Damit lediglich die Reaktion des Empfängers gemessen werden kann, müssen die Spenderlymphozyten vor der Kokultur durch Bestrahlung oder durch Mitomycinbehandlung inaktiviert werden. Mit diesem Verfahren konnte bereits ein Zusammenhang zwischen dem Auftreten von zellulärer Alloreaktivität und akuten Transplantat-Abstoßungsereignissen gezeigt werden [99-106]. Die Notwendigkeit isolierter Zellen, die Inkubationsdauer von ca. 20 h sowie die Vorbehandlung der Spenderzellen bedingt jedoch, dass diese Technik bei einer Verstorbenenenspende zu aufwändig ist, um bereits vor einer Transplantation die Existenz präformierter alloreaktiver T-Zellen messen zu können. Vor diesem Hintergrund existiert derzeit keine Methode, die eine ausreichend schnelle Messung einer präformierten Alloreaktivität erlaubt, um diese Kenntnis in Therapieentscheidungen unmittelbar nach Transplantation einfließen zu lassen.

Mit Hilfe eines durchflusszytometrischen Stimulationsverfahrens können T-Zellen mit Spezifität gegen Pathogene innerhalb eines Arbeitstages gemessen werden. Diese Stimulationsmethode wurde bereits zum Nachweis alloreaktiver T-Zellen aus isolierten mononukleärer Zellen des peripheren Blutes (PBMCs) charakterisiert [107]. Die isolierten

Zellen von Empfänger und Spender werden dabei ebenfalls wie bei der ELISPOT Methode in einer gemischten Lymphozytenreaktion (MLR) zusammengegeben. Erste Ergebnisse aus meiner Diplomarbeit ließen schließen, dass das Verfahren auch direkt mit Vollblut durchgeführt werden kann. Aufgrund der kürzeren Inkubationszeit und der Möglichkeit zur Anwendung von Vollblut hat dieses Verfahren Potential zum klinischen Einsatz.

3.5 Zielsetzung dieser Arbeit

Ziel dieser Arbeit bestand darin, eine bereits in der Diplomarbeit in ersten Experimenten getestete durchflusszytometrische Methode zur Detektion präformierter alloreaktiver T-Zellen für die Anwendung aus kleinen Volumina von Vollblut weiterzuentwickeln und zu optimieren. Um die Häufigkeit einer präformierten Alloreaktivität in verschiedenen klinisch relevanten Probandenkollektiven zu charakterisieren, sollte das Verfahren zum Nachweis einer präformierten Alloreaktivität bei gesunden Probanden und bei Patienten auf der Warteliste für die Transplantation einer Niere, Leber und Lunge zur Anwendung kommen. Neben einer quantitativen Analyse alloreaktiver T-Zellen sollten diese zudem phänotypisch und funktionell charakterisiert werden. Weiterhin sollte die Hemmbarkeit der alloreaktiven T-Zellen auf immunsuppressive Medikamente getestet werden. Bei den Transplantationswarteliste Kandidaten sollte zusätzlich analysiert werden, ob ein Zusammenhang zwischen HLA-Mismatchen und präformierten alloreaktiven T-Zellen beobachtet werden kann. Zudem sollte im Falle einer Transplantation ein Zusammenhang zwischen der gemessenen präformierten Alloreaktivität und zellulären Abstoßungsereignissen ermittelt werden. In einem weiteren Teilprojekt wurde schließlich die Induktion alloreaktiver T-Zellen von Schwangeren gegen den jeweiligen Vater ihres Kindes im Querschnitt sowie bei Frauen vor, im Verlauf und nach der Schwangerschaft getestet.

Folgende Ziele sollten im Einzelnen verfolgt werden:

- Etablierung und Optimierung einer schnellen Methode zum Nachweis einer präformierten Alloreaktivität aus Vollblut
- Quantitative und phänotypische Charakterisierung einer präformierten Alloreaktivität bei Gesunden und bei Patienten auf der Transplantationswarteliste
- Assoziation einer präformierten Alloreaktivität mit epidemiologischen Charakteristika und Abstoßungsereignissen nach Transplantation

- Charakterisierung der Induktion einer Alloreaktivität einer schwangeren Frau gegen den Vater ihres Kindes

4 Material und Methoden

4.1 Material

4.1.1 Geräte und Hilfsmittel

Geräte und Hilfsmittel	Hersteller, Herstellersitz
48-, 96- Well Kulturplatten	Greiner Bio-One, Frickenhausen
Bestrahlungsanlage-STST-Gamma, Model OB 29/4	Steuerungstechnik und Strahlenschutz GmbH, Leipzig
Brutschrank HERAcell 150	Heraeus, Hanau
Brutschrank HERAcell 240i	Thermo Fisher Scientific, Langenselbold
Cell Cultur Dishes (Petrischale)	Greiner Bio-One, Frickenhausen
Cryo Gloves	Tempshield, Maine, USA
Cryo-Safe™ Cooler	Belart Products, Wayne, USA
Elektronische Pipettierhilfe (Pipetboy acu)	Integra Biosciences, Fernwald
FACS Canto II, FACS Canto A	BD Biosciences, Heidelberg
FACS Röhrchen, unsteril (5 ml)	Sarstedt, Nümbrecht
Folded Filters Grade: 3m/N	Sartorius, Göttingen
Heiz- und Rührblock: Yellowline MSH basic	Neolab, Heidelberg
Inkubations- und Inaktivierungsbad 1008	GFL, Burgwedel
Kolbenhubpipetten (10, 20, 100, 200, 1000µl)	Abimed, Langenfeld
MACS Mix Tube Rotator	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach
Mikroskop Olympus CKX31	Olympus, Hamburg
Multifunktionseller Plattenleser (Victor X4)	PerkinElmer, Rodgau
Multipipette (Abimed HC Discovery Comfort 50-300µl)	Abimed, Langenfeld

Geräte und Hilfsmittel**Hersteller, Herstellersitz**

Multipipetten plus	Eppendorf, Hamburg
Neubauer Zählkammer	Neolab Migge Laborbedarf, Heidelberg
Nunc CryoTube TM Vials	Thermo Fisher Scientific, Roskilde, Dänemark
Parafilm	Bemis, Neenah, USA
Pipettenspitzen (1000µl)	Sarstedt, Nümbrecht
Pipettenspitzen (20µl, 200µl)	Sarstedt, Nümbrecht
Pipettenspitzen für Kolbenhubpipetten	Sarstedt, Nümbrecht
Röhrchen Polypropylen Rundboden (5ml)	VWR, Darmstadt
Reagiergefäß 1,5ml	Sarstedt, Nümbrecht
Röhrchen Polypropylen (15, 50 ml Falcons)	Greiner Bio-One, Frickenhausen
Schüttelmixer Vortex Mixer 7-2020	NeoLab Migge Laborbedarf, Heidelberg
Serafol [®] ABO, Blutgruppenbestimmungskarte	Sifin, Berlin
Serologische Pipetten (2, 5, 10, 25 ml)	Sarstedt, Nümbrecht
Skalpell	Aesculap AG, Tuttlingen
S-Monovetten (LH-Lithiumheparin, K3E-EDTA, Z-Gel-Serum)	Sarstedt, Nümbrecht
Sterile Mullkompressen 10x10cm, 12-fach	Fink & Walter GmbH, Merchweiler
Sterile Werkbank (Hera Safe KS)	Thermo Fisher Scientific, Langenselbold
Sterile Werkbank (Hera Safe)	Heraeus, Hanau
Stickstofftank Chronos Biosafe	Messer Griesheim GmbH, Krefeld
Stickstofftank MVE Cryosystem 6000	Chart Inc Ball Ground, GA, USA
Stickstofftank Nachfülltank MVELab30	Chart Inc Ball Ground, GA, USA
Thermoskanne Modell Senator	Emsa GmbH, Emsdetten

Geräte und Hilfsmittel

Zentrifuge 5418

Hersteller, Herstellersitz

Eppendorf AG, Hamburg

Zentrifuge Thermo Scientific Megafuge 1.0R

Heraeus, Hanau

4.1.2 Chemikalien und Reagenzien

Chemikalien Reagenzien

Firma, Firmensitz

Anti-CMV-ELISA (IgG)

Euroimmun, Lübeck

Aqua destilliert (H₂O dest.)

Ecotainer® B.Braun, Melsungen

Bovines Serum Albumin (BSA)

Serva, Heidelberg

Brefeldin A (von *Penicillium brefeldianum*),

Sigma Aldrich, Steinheim

Stock: 5 mg/ml in Ethanol

Bromdesoxyuridin (BRDU)

Sigma Aldrich, Steinheim

CFDA-SE Lyophilisat

Invitrogen, Eugene, Oregon, USA

Dimethylsulfoxide(DMSO, C₂H₆OS)

Serva, Heidelberg

Essigsäure

Merck, Darmstadt; Sigma, Steinheim

Ethanol absolut

Apotheke des Universitätsklinikum des Saarlandes, Homburg

Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)

Sigma, Steinheim

FACS Clean

BD Biosciences, Heidelberg

FACS Flow

BD Biosciences, Heidelberg

FACS Rinse

BD Biosciences, Heidelberg

FACS Shutdown

BD Biosciences, Heidelberg

FicoLiteH (Ficoll)

Linaris, Wertheim-Bettingen

Fötale Kälberserum (FCS) zum Blockieren

Biochrom, Berlin

Fötale Kälberserum zur Benutzung in Zellkultur (FCS-Z)

BioWittacker, Combrex Bio Science, Verviers, Belgien; Mycoplex TM, PAA

Chemikalien Reagenzien

Humanes Serum Albumin (HSA)
Isopropylalkohol (2-Propanol)
Lysing Solution (10 x konzentriert, 1 x Verdünnung mit H₂O dest.)

Natriumazid (NaN₃)

Paraformaldehyd (PFA)

Penicillin/Streptomycin (P/S)

Phosphatgepufferte Salzlösung (PBS)

RPMI Medium 1640 + 1% L-Glutamin (Gln)

Saponin

Stickstoff flüssig (rembo)

Firma, Firmensitz

Laboratories GmbH, Pasching, Österreich

CSL-Behring, Marburg; Grifols, Frankfurt

Otto Fischer GmbH&Co.KG, Saarbrücken

BD Biosciences, Heidelberg

Serva Electrophoresis, Heidelberg

AppliChem, Darmstadt

Biochrom AG, Berlin; PPA Laboratories, Cölbe

PPA Laboratories, Cölbe; Sigma-Aldrich, Steinheim

Sigma, Steinheim

Sigma, Steinheim

Air Liquide Deutschland GmbH (MB), Krefeld

4.1.3 Medien und Puffer/Lösungen

Medium und Puffer/Lösungen

CFSE-Medium

Einfriermedium

FACS-Puffer

Labeling-Lösung

Medium

Saponin-Puffer

Zusammensetzung

RPMI; 1% Gln; 1% P/S; 5% FCS-Z

60% (RPMI; 1% Gln; 1% P/S; 0,5% HSA); 30% FCS-Z; 10% DMSO

PBS; 5% FCS; 0,5% BSA; 0,07% NaN₃

PBS; 0,1% HSA; 10mM CFDA-SE

RPMI; 1% Gln; 1% P/S; 0,5% HSA

FACS-Puffer; 0,1% Saponin

4.1.4 Antikörper

Antikörper (AK) können zur Stimulation von T-Zellen angewandt werden. Antikörper, die direkt oder indirekt mit Fluoreszenzfarbstoffen (Fluorochromen) konjugiert sind, können zum Nachweis von Oberflächenmarkern und intrazellulär akkumulierten Zytokinen verwendet werden (Tabelle 1). Bei allen AK handelt es sich um monoklonale AK der Firma BD Biosciences (Heidelberg) mit Ausnahme der monoklonalen Antikörper CD45-FITC (Klon BRA55), und CD45-APC (Klon MEM-28), die von der Firma Sigma-Aldrich (Steinheim) bezogen wurden.

Tabelle 1: Verwendete Antikörper zur durchflusszytometrischen Analyse oder zur Stimulation

Antigen	Konjugat	Herkunftsorganismus	Zielorganismus	Klon	Immunglobulin Klasse	Konzentration [mg/ml]
BrdU-DNAse	FITC	Maus	Mensch	B44	IgG1 k	0,01
CCR7	PE	Ratte	Mensch	3D12	IgG2 a-k	k. A.*
CD27	FITC	Maus	Mensch	L128	IgG1 k	0,008
CD28	un- konjugiert	Maus	Mensch	L293	IgG1 k	0,5
CD3	APC	Maus	Mensch	SK7	IgG1 k	k. A.*
CD4	APC	Maus	Mensch	SK3	IgG1 k	k. A.*
CD4	PE	Maus	Mensch	SK3	IgG1	k. A.*
CD4	PE-Cy7	Maus	Mensch	SK3	IgG1 k	0,012
CD45	APC	Maus	Mensch	HI30	IgG1 k	k. A.*
CD45	FITC	Maus	Mensch	HI30	IgG1 k	k. A.*
CD45	FITC	Maus	Mensch	BRA55	k. A.*	k. A.*
CD45	APC	Maus	Mensch	MEM-28	k. A.*	k. A.*
CD45RO	PE-Cy7	Maus	Mensch	UCHL1	IgG2 a-k	0,05
CD49d	un- konjugiert	Maus	Mensch	9F10	IgG1 k	1
CD62L	PE	Maus	Mensch	DREG56	IgG1 k	k. A.*

Antigen	Konjugat	Herkunfts- organismus	Ziel- organismus	Klon	Immun- globulin Klasse	Konzentration [mg/ml]
CD69	PE	Maus	Mensch	L78	IgG1	0,003
CD69	PerCP	Maus	Mensch	L78	IgG1	0,2
CD8	APC	Maus	Mensch	SK1	IgG1	0,05
CD8	PerCP	Maus	Mensch	SK1	IgG1	0,00625
CTLA-4	APC	Maus	Mensch	BNI3	IgG2 ak	k. A.*
IFN- γ	FITC	Maus	Mensch	4S.B3	IgG1 k	0,5
IFN- γ	PE	Maus	Mensch	4S.B3	IgG1 k	0,2
IL-2	PE	Ratte	Mensch	MQ1- 17H12	IgG2 a	k. A.*
IL-4	PE	Maus	Mensch	8D4-8	IgG1	0,2
TNF- α	PE	Maus	Mensch	MAB11	IgG1	0,2
TNF- α	V450	Maus	Mensch	MAB11	IgG1 k	k. A.*

*k. A.: keine Angaben von Seiten des Herstellers; APC, Allophycocyanin; BrdU, Bromdesoxyuridin; CCR, Chemokin Rezeptor Typ; CD, Cluster of Differentiation; CTLA, cytotoxic T-lymphocyte-associated Protein; FITC, Fluorescein Isothiocyanat; IFN, Interferon; IgG, Immunglobulin G; IL, Interleukin; PE, Phycoerythrin; PerCP, Peridinin-Chlorophyll-Protein; PTPRC, Rezeptor-Typ Tyrosin-Proteinphosphatase C (Protein tyrosine phosphatase, receptor type, C); TNF, Tumornekrosefaktor.

4.1.5 Antigene

Antigen

Firma, Firmensitz

Ko-Ag: Kontroll Antigen (in H₂O dest.,
Endkonzentration 32 μ l/ml)

Virion/Serion, Würzburg

CMV-Ag: Cytomegalovirus Antigen (in H₂O
dest., Endkonzentration 32 μ l/ml)

Virion/Serion, Würzburg

CMV-Ag: Cytomegalovirus Antigen für
Zellkulturversuche (in H₂O dest.,
Endkonzentration 32 μ l/ml)

BioWhittaker, Walkersville, USA

SEB: *Staphylococcus aureus* Enterotoxin B
(Stock 1mg/ml in H₂O dest.,
Endkonzentration 2,5 μ g/ml)

Sigma, Steinheim

4.1.6 Immunsuppressiva

Immunsuppressiva	Firma, Firmensitz
Cyclosporin A (Sandimmun), Infusionslösung 50 mg/l	Novartis Pharma GmbH, Nürnberg
Methylprednisolon (Urbason), Infusionslösung 16 mg	Sanofi Aventis, Frankfurt
Mycophenolatmofetil (CellCept), 500 mg	Roche, Welwyn Garden City, UK
Prednisolon mikronisiert	Fagron GmbH & Co.KG, Barsbüttel
Sirolimus (Rapamune), 5 mg/ml	Wyeth, Madison, New Jersey, USA
Tacrolimus (Prograf), Infusionslösung 5 mg/ml	Astellas Pharma, München

4.1.7 Software

Programm/Datenquellen	Anwendung
Eurotransplant	Datenrecherche
FACS Diva Version 6.1.3	Analyse und Auswertung von FACS Daten
Flow Jo 7.6.5	Auswertung von FACS Daten
Graphpad Prism 5.0/6.0	Statistik und Graphik
Microsoft Access 2003/07	Datenverwaltung
Microsoft Excel 2003/07	Datenverarbeitung
Microsoft Word 2003/07	Textverarbeitung
SAP	Datenrecherche

4.2 Probandenkollektive und Probenmaterialien

4.2.1 Probanden und Patienten

Im Rahmen der Teilprojekte dieser Dissertationsarbeit wurden mehrere Probandengruppen rekrutiert. Hierbei handelte es sich um immungesunde Kontrollprobanden (n=193) und um

Patienten auf der Warteliste für eine Nierentransplantation (60 Patienten mit HD (Hämodialyse), 21 Patienten mit CAPD (continuous ambulatory peritoneal dialysis, Bauchfelldialyse), 3 niereninsuffiziente Patienten ohne Dialyseersatzverfahren). Ebenso wurden Patienten auf der Warteliste für eine Leber- (n=41) und Lungentransplantation (n=36) rekrutiert. Ein Teil dieser Patienten wurde transplantiert und vor, sowie sechs und zwölf Monate nach Transplantation nachverfolgt (Abbildung 5).

Klinische Parameter und demographische Daten der transplantierten Patienten sind in Tabelle 2-4 erfasst. Bei Nieren-Lebendspenden wurden zudem die jeweiligen Lebendspender rekrutiert. Zudem wurden Frauen vor, im Verlauf während und nach Schwangerschaft sowie ihre Kindsväter rekrutiert, ebenso wie Paare, die sich in der Kinderwunschlinik aufgrund einer ungewollten Kinderlosigkeit vorstellten. Ein positives Votum der Ethikkommission der Ärztekammer des Saarlandes lag vor (Kennnummer 248/12) und alle Probanden erteilten ihr schriftliches Einverständnis zur Teilnahme an der Studie. Bei Verstorbenspenden standen mit Zustimmung der Ethikkommission nach erfolgreich abgeschlossener Transplantation Blut- und Milzproben von Verstorbenen zur Verfügung.

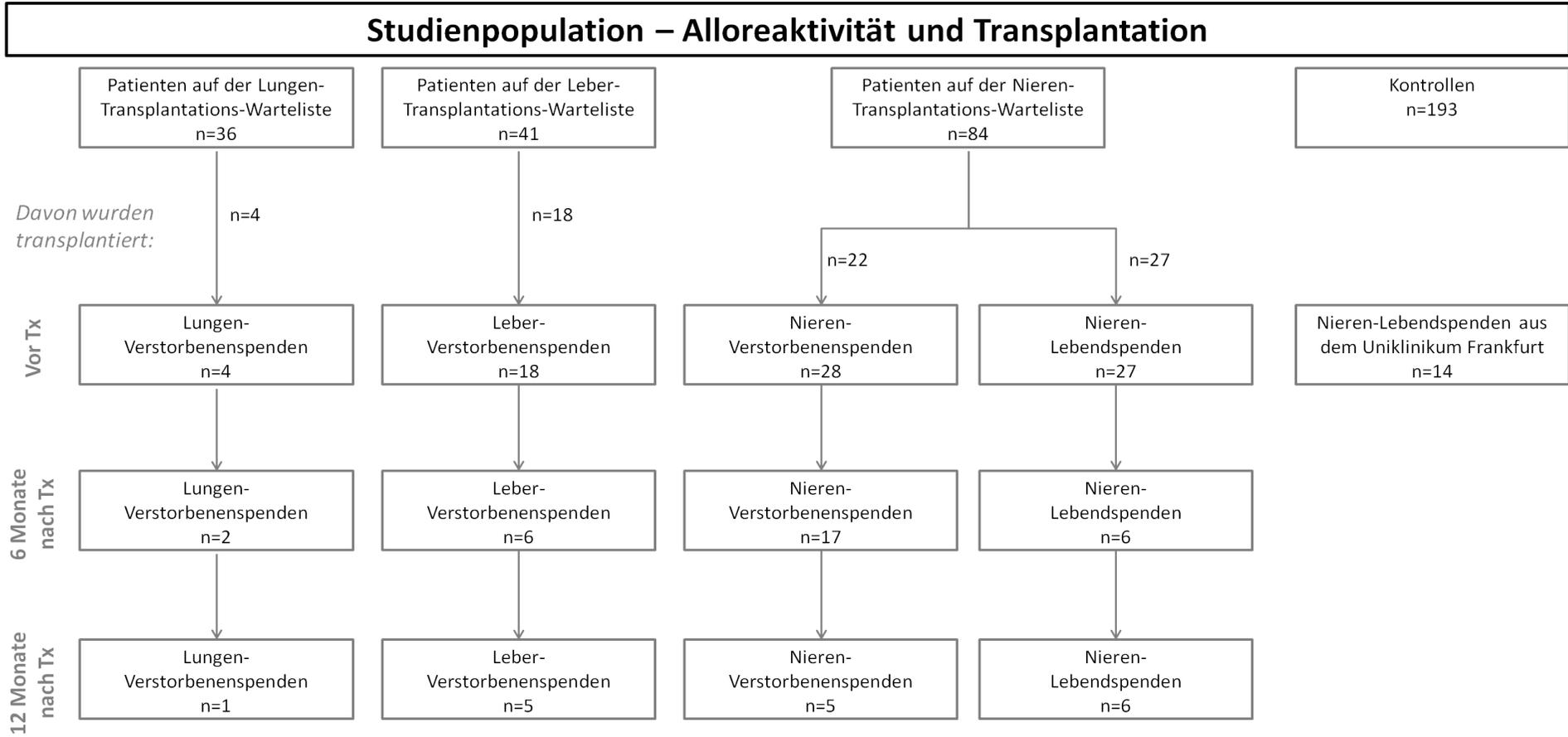


Abbildung 5: Übersichtsdarstellung des verwendeten Patienten- und Kontrollkollektives. Neben dem Kontrollprobandenkollektiv wurden drei verschiedene Patientengruppen, die auf der Transplantationswarteliste für eine Lunge, Leber oder Niere stehen, auf präformierte alloreaktive T-Zellen untersucht. Desweiteren wurde dargestellt, wie viele Probanden auf alloreaktive T-Zellen bei ihrer Transplantation und im Verlauf sechs und zwölf Monate nach der Transplantation untersucht wurden, wobei bei Nierentransplantationen zwischen Lebend- und Verstorbenspenden unterschieden wurde. n, Probandenanzahl; Tx, Transplantation.

Die Probanden wurden in Zusammenarbeit mit den Kliniken für Innere Medizin II, IV und V, der Klinik für Allgemein- und Viszeral-, Gefäß- und Kinderchirurgie, der Klinik für Urologie und der Klinik für Frauenheilkunde, Geburtshilfe und Reproduktionsmedizin am Universitätsklinikum Homburg rekrutiert. Desweiteren wurden im Rahmen einer Kooperation mit der Klinik für Nephrologie am Universitätsklinikum Frankfurt weitere Spender-Empfängerpaare einer Nierenlebendspende rekrutiert.

Tabelle 2: Demographische und klinische Daten der Patienten bei Nierentransplantationen

	Nieren-Empfänger n=55	Nieren-Spender n=49
Alter (Jahre), Mittelwert \pm SD	50,84 \pm 14,83	55,60 \pm 14,81
Geschlecht (weiblich), n (%)	18 (32,73%)	26 (53,06%)
Grund der Niereninsuffizienz, n (%)		
Glomerulonephritis	11 (20,00%)	
Tubulointerstitielle Nephritis	3 (5,45%)	
Diabetes Mellitus I oder II	6 (10,91%)	
Zystenniere	6 (10,91%)	
IgA Nephropathie	3 (5,45%)	
Systemische Sklerose	5 (9,10%)	
Vaskuläre Nephropathie	4 (7,27%)	
Unbekannt/Andere	17 (30,91%)	
Nierenersatzverfahren (HD/CAPD/ohne Dialyseersatzverfahren), n	43/10/2	
Zeit an der Dialyse (Jahre), Mittelwert \pm SD	3,44 \pm 3,34	
Erst-Transplantation, n (%)	52 (94,55%)	
Verstorbenenspenden, n (%)	28 (50,91%)	
CMV-Serostatus (positiv), n (%)	36 (65,45%)	30 (61,22%)

	Nieren-Empfänger n=55	Nieren-Spender n=49
HLA-A, -B, -DR Mismatche, Mittelwert \pm SD	3,05 \pm 1,35	
Panel-reaktive Antikörper (aktuell) positiv*, n (%)	6 (10,91%)	
Panel-reaktive Antikörper (maximum) positiv*, n (%)	8 (14,55%)	
Abstoßungsreaktion innerhalb des ersten Jahres nach Tx, n (%)	4 (7,27%)	
Zellulär	1/4	
Humoral	3/4	
Serum-Kreatinin-Wert nach einem Jahr [mg/dl], Mittelwert \pm SD	1,84 \pm 1,16	
eGFR [ml/min/1,73 m ²], Mittelwert \pm SD [#]	46,18 \pm 21,60	
Verstorben innerhalb des ersten Jahres nach Tx, n (%)	2 (3,64%)	

CAPD, „continuous ambulatory peritoneal dialysis“ Bauchfelldialyse; CMV, Cytomegalovirus; eGFR, glomeruläre Filtrationsrate; HD, Hämodialyse; HLA, humanes Leukozyten Antigen; n, Anzahl; SD, Standardabweichung; Tx, Transplantation; *Panel-reaktive Antikörper sind positiv ab $\geq 5\%$; [#]Daten lediglich von 47 Patienten verfügbar; alle Patienten waren Crossmatch negativ; 53 Patienten erhielten eine quadruple drug regiment bestehend aus Tacrolimus, Mycophenolat Mofetil, Steroiden und Basiliximab. Bei einem Patienten wurde Tacrolimus durch Cyclosporin A ersetzt, bei einem anderen Patienten durch Rapamycin. ABO inkompatible Patienten erhielten zusätzlich Rituximab; 5 Spenden waren ABO inkompatibel; 47 Patienten waren von Ethnizität kaukasisch/asiatisch/lateinamerikanisch und 8 Patienten afrikanisch/afroamerikanisch; 16 Patienten waren verwandt; 2 Patienten verstarben (Todesgrund: #1: hämorrhagischer und septischer Schock bei Pneumonie und unterer Gastrointestinaler-Blutung; #2: septischer Schock bei pAVK IV).

Tabelle 3: Demographische und klinische Daten der Patienten bei Lebertransplantationen

	Leber-Empfänger n=18	Leber-Spender n=18
Alter (Jahre), Mittelwert \pm SD	56,71 \pm 7,30	51,50 \pm 19,04
Geschlecht (weiblich), n (%)	4 (22,22%)	3 (16,67%)
Grund der Leberinsuffizienz, n (%)		

	Leber-Empfänger n=18	Leber-Spender n=18
Hepatozelluläres Karzinom ohne zirrhotische Leber	1 (5,56%)	
Leber-Zirrhosen	14 (77,78%)	
Subakute Hepatitis Virus B	1 (5,56%)	
Primär sklerosierende Cholangitis	1 (5,56%)	
Morbus Wilson	1 (5,56%)	
Tumorerkrankung der Leber (ja/nein/unbekannt), n	4/11/3	
Tumor mittels Chemotherapie behandelt, n	3/4	
MELD-Score, Mittelwert \pm SD	19,78 \pm 10,26	
Erst-Transplantation, n (%)	17 (94,44%)	
Verstorbenen Spenden, n (%)	18 (100%)	
CMV-Serostatus (positiv), n (%)	13 (72,22%)	12 (66,67%)
HLA-A, -B, -DR Typisierung vorhanden (ja), n (%)	11 (61,11%)	11 (61,11%)
HLA-A, -B, -DR Mismatche, Mittelwert \pm SD	4,36 \pm 1,03	
Abstoßungsreaktion innerhalb des ersten Jahres nach Tx, n (%)	4 (22,22%)	
Zellulär	4/4	
Humoral	0/4	
Retransplantation innerhalb des ersten Jahres nach Tx, n (%)	0 (0%)	
Verstorben innerhalb des ersten Jahres nach Tx, n (%)	4 (22,22%)	

CMV, Cytomegalovirus; HLA, humanes Leukozyten Antigen; MELD, Model of End Stage Liver Disease; n, Anzahl; SD, Standardabweichung; Tx, Transplantation; 0 Spenden waren ABO inkompatibel; alle Patienten waren von

Ethnizität kaukasisch/asiatisch/lateinamerikanisch; 4 Patienten verstarben (Todesgrund: zwei Patienten aufgrund von Multiorganversagen bei Sepsis; ein Patient aufgrund von Anhepatothopathie, marginales Spenderorgan und ein Patient aufgrund von Lungenversagen).

Tabelle 4: Demographische und klinische Daten der Patienten bei Lungentransplantationen

	Lungen-Empfänger n=4	Lungen-Spender n=4
Alter (Jahre), Mittelwert \pm SD	57,90 \pm 5,92	53,02 \pm 19,05
Geschlecht (weiblich), n (%)	0 (0%)	0 (0%)
Grund der Lungeninsuffizienz, n (%)		
Idiopathische Lungenfibrose	3 (75%)	
COPD/Emphysema	1 (25%)	
LAS, Mittelwert \pm SD	63,87 \pm 23,45	
Erst-Transplantation, n (%)	4 (100%)	
Verstorbenen Spenden, n (%)	4 (100%)	
CMV-Serostatus (positiv), n (%)	2 (50%)	3 (75%)
HLA-A, -B, -DR Typisierung vorhanden (ja), n (%)	3 (75%)	3 (75%)
HLA-A, -B, -DR Mismatche, Mittelwert \pm SD	5 \pm 1	
Abstoßungsreaktion innerhalb des ersten Jahres nach Tx, n (%)	2 (50%)	
FEV-1 ein Jahr nach Tx [l/s Einheit], Mittelwert \pm SD	2,35 \pm 0,83	
FEV-1 ein Jahr nach Tx [% vom Sollwert], Mittelwert \pm SD	73,37 \pm 32,78	
Verstorben innerhalb des ersten Jahres nach Tx, n (%)	1 (25%)	

CMV, Cytomegalovirus; COPD, chronisch obstruktive Lungenerkrankung; FEV-1, forced expiratory volume in 1 second, Einsekundenkapazität; HLA, humanes Leukozyten Antigen; LAS, Lung Allocation Score; n, Anzahl; SD, Standardabweichung; Tx, Transplantation; alle Patienten waren von Ethnizität kaukasisch/asiatisch/lateinamerikanisch; 0 Spenden waren ABO inkompatibel; 1 Patient verstarb aufgrund einer Sepsis mit pulmonalen Fokus.

4.2.2 Probenmaterialien und klinische Daten

Zur Charakterisierung einer zellulären Alloreaktivität wurde maximal 24 h vor Versuchsbeginn Vollblut (heparinisiertes Vollblut und/oder EDTA Vollblut) entnommen und bis zur weiteren Bearbeitung bei 4-8°C gelagert. Bei Blutproben, die außerhalb Homburgs gewonnen wurden, erfolgte der Transport innerhalb von 24 h bei 4-8°C. Von Verstorbenenspendern standen ausschließlich EDTA-Blut und ein Teilstück des Milzgewebes nach erfolgreich abgeschlossener Transplantation zur Verfügung.

Zur Typisierung des HLA-Status der Kontrollprobanden wurde einmalig ein Wangenraumabstrich und eine EDTA-Blutprobe abgenommen und dem kooperierenden HLA-Labor der Stefan-Morsch Stiftung (Birkenfeld) zugeleitet. Bei Patienten auf der Warteliste einer Leber- oder Lungentransplantation wurde eine EDTA-Blutprobe entnommen, aus der mononukleäre Zellen des peripheren Blutes (PBMC) aufgereinigt und ebenfalls an das HLA-Labor der Stefan-Morsch Stiftung übermittelt wurden. Die HLA-Typisierungsdaten der Empfänger auf der Transplantationswarteliste für eine Niere sowie die der Verstorbenenspender standen direkt durch Eurotransplant zur Verfügung, die der Lebendspender wurden im Rahmen der medizinisch indizierten HLA-Typisierung durch ein akkreditiertes HLA-Labor (Labor Thiele, Kaiserslautern) gewonnen und zur Verfügung gestellt.

Die Blutgruppen der Probanden und Patienten standen über die Krankenakten zur Verfügung. Bei immungesunden Probanden mit unbekannter Blutgruppe wurde diese mittels einer Serafol ABO Karte bestimmt.

Die Daten zur Bestimmung der Panel-reaktiven Antikörper (PRA) standen quartalweise bei vorimmunisierten Patienten auf der Nieren-Transplantationswarteliste über die Krankenakte nach Routinebestimmung durch ein akkreditiertes Labor (Labor Thiele, Kaiserslautern) zur Verfügung. Die Bestimmung erfolgte mittels eines Standard mikrolymphozytotoxischen Tests wie dem Komplement-bindenden Zytotoxizitätstest (CDC) oder einer Festphasenmethode wie einem Enzym gekoppelten Immunsorbent-Assay (ELISA) oder einem Luminex-Messverfahren. Lagen erhöhte PRA Werte vor, wurden diese weiter spezifiziert mittels Luminex Messverfahren.

4.3 Methoden

4.3.1 Isolation von mononukleären Zellen des peripheren Blutes oder der Milz

Mononukleären Zellen des peripheren Blutes (PBMC) oder der Milz (MMC) wurden mittels Dichtegradientenzentrifugation über einen Ficoll-Gradienten isoliert. Zur Isolierung von PBMC wurden pro Röhrchen jeweils 5 bis maximal 12 ml Vollblut (Lithium-Heparin, EDTA Vollblut) in ein 50 ml Falcon überführt und mit PBS-0,02% EDTA auf 35 ml aufgefüllt. Die Probe wurde anschließend mit 13 ml Ficoll unterschichtet und bei 1306 g 20 min ohne Bremse zentrifugiert, um einen für die Zelltrennung erforderlichen Dichtegradienten auszubilden, bei dem die Erythrozyten und Granulozyten sedimentieren. Die Intermediärschicht zwischen Ficoll und wässriger Lösung enthält die mononukleären Zellen, die aus Lymphozyten (B-, T- und NK-Zellen) und Monozyten bestehen. Diese wurden mittels einer 5 ml Stab-Pipette abpipettiert und in ein steriles 50 ml Falcon überführt. Zur Entfernung des überschüssigen Ficolls erfolgte ein Waschschriff mit 50 ml PBS-0,02% EDTA durch Zentrifugation bei 677 g für 10 min. Anschließend wurde das Pellet in mit 30 ml PBS-0,02% EDTA resuspendiert und erneut gewaschen (Zentrifugation: 301 g, 10 min). Falls zwei Ansätze desselben Probanden vorhanden waren, wurden diese zunächst in einem Röhrchen vereint. Das Pellet wurde schließlich in 1-6 ml Medium (RPMI; 0,5% HSA; 1% P/S; 1% Gln) resuspendiert [45].

Zur Isolierung von MMC wurde das Milzgewebe eines verstorbenen Organspenders steril in eine Petrischale überführt und ein Stück in der Größe 1x1x1 cm zur weiteren Verarbeitung abgetrennt. Das übrige Material wurde zurück in die Transporttube befördert und bei 4-8°C steril aufbewahrt. Das abgetrennte Milzgewebe wurde mit zwei sterilen Skalpellenspitzen so klein wie möglich zerschnitten und mit 4 ml sterilem PBS versetzt um ein Austrocknen zu verhindern. Anschließend wurde das Zell-PBS-Gemisch durch eine sterile Mullkompressen in ein 50 ml Falcon filtriert, um größere Gewebestücke zu entfernen. Die Petrischale wurde mit weiteren 4-8 ml PBS ausgespült und erneut über die Mullkompressen filtriert. Diese Zellsuspension wurde anschließend auf 35 ml mit PBS-0,02% EDTA aufgefüllt und mit Ficoll unterschichtet. Die Isolierung der MMC erfolgte nach Zentrifugation und Waschschriffen wie oben beschrieben.

4.3.2 Zellzahlbestimmung von PBMC oder MMC

Die Bestimmung der Zellzahl einer Suspension von PBMC oder MMC erfolgte mittels einer Neubauerzählkammer. Falls die Zellzahl von frisch isolierten PBMC bestimmt werden sollte, wurden 10 µl der Zellsuspension 1:10 mit 3% Essigsäure verdünnt. Die Essigsäure führt zur Lyse der noch in der Suspension verbliebenen Erythrozyten, die ansonsten bei der Zählung in der Kammer fälschlicherweise leicht mit Lymphozyten verwechselt werden können. Bei Zellsuspensionen, bei denen ein gewisser Anteil von nicht intakten Zellen zu erwarten ist (beispielsweise nach Auftauen von eingefrorenen Zellen), wird vor dem Zählen eine Verdünnung mit Trypanblaulösung durchgeführt. Hierzu werden 10 µl der Zellsuspension 1:2 mit 0,04%-iger Trypanblau-Lösung gemischt. Trypanblau färbt Zellen, deren Zellmembran beschädigt ist und dient daher zur Unterscheidung von intakten und nicht intakten Zellen. Bei der Quantifizierung vitaler Zellen werden weiße Zellen gezählt.

Etwa 10 µl der verdünnten Zellsuspension werden in die Zählkammer gefüllt. Die Zellzahl in der Zählkammer wird ermittelt, indem mindestens drei von vier großen Quadraten ausgezählt und der Mittelwert berechnet wird. Der Mittelwert der Zellzahl multipliziert mit 10^4 ergibt die Zellzahl pro Milliliter. Anschließend muss die ermittelte Zellzahl noch mit dem Verdünnungsfaktor multipliziert werden, um die exakte Zellzahl zu erhalten.

4.3.3 Einfrieren von isolierten PBMC oder MMC

Zum Einfrieren der PBMC oder MMC wurden $5-15 \cdot 10^6$ Zellen in ein Kryoröhrchen überführt und bei 353 g 10 min zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und die Zellen wurden in 1,5 ml sterilen Einfriermedium (60% RPMI-0,5% HSA-1% P/S-1% Gln; 30% FCS-Z; 10% DMSO) resuspendiert. Bei Zellen, die einer HLA-Typisierung zugeführt wurden, wurde das reine Zellpellet ohne Einfriermedium eingefroren. Die Kryoröhrchen wurden in einem Cryo-Safe-Cooler überführt und für einen Tag bei -80°C gelagert. Dies gewährleistet einen schonenden, allmählichen Abkühlungsprozess der Zellen. Zur längerfristigen Lagerung wurden die Zellen bis zur weiteren Verwendung in einen Stickstofftank überführt.

4.3.4 Auftauen von isolierten PBMC oder MMC

Zum Auftauen der im Stickstofftank eingefrorenen Zellen wurden diese möglichst rasch in 25 ml, auf 37°C erwärmtem Medium (RPMI-0,5% HSA-1% P/S-1% Gln) resuspendiert. Die Zellen wurden bei 244 g für 10 min zentrifugiert und der Überstand verworfen. Nach Zugabe

von 15 ml Medium folgte ein weiterer Zentrifugationsschritt (10 min bei 244 g). Abschließend wurde das Pellet in 1,5-6 ml Medium aufgenommen und die Zellzahl intakter Zellen mittels Trypanblaufärbung bestimmt.

4.3.5 Stimulation alloreaktiver T-Zellen

Zum Nachweis alloreaktiver T-Zellen einer Person A (Reaktant) gegen Zellen einer Person B (Stimulator) wurde ein Verfahren verwendet, bei dem PBMC zweier Probanden in einer gemischten Lymphozytenreaktion (Mixed Lymphocyte Reaction, MLR) zusammengegeben und stimuliert werden [107]. Besitzt Person A alloreaktive T-Zellen gegen Zellen der Person B, werden diese aktiviert und produzieren Zytokine. Umgekehrt können auf diese Weise auch alloreaktive T-Zellen der Person B gegen Person A nachgewiesen werden. Aktivierung und Zytokininduktion werden nachfolgend mittels Durchflusszytometrie detektiert. Zur späteren Unterscheidung der Zellen der beiden Probanden in der durchflusszytometrischen Analyse werden die Zellen des Stimulators mit einem Antikörper gegen den Pan-Leukozytenmarker CD45 vorgefärbt. Dieses bereits für die Anwendung in PBMC publizierte Testverfahren [107] wird im Folgenden näher beschrieben. Im Rahmen meiner Diplomarbeit [45] und dieser Dissertation wurde eine Modifikation dieses Verfahrens etabliert, das den Nachweis alloreaktiver T-Zellen direkt aus dem Vollblut erlaubt. Allgemeine Modifikationen dieses Vollblutverfahrens im Vergleich zur Stimulation von PBMC sind in Abschnitt 4.3.5.2 beschrieben.

4.3.5.1 Stimulation alloreaktiver T-Zellen aus isolierten mononukleären Zellen des peripheren Blutes

Pro Stimationsansatz werden $0,5-1 \cdot 10^6$ PBMC des Reaktanten in Rundboden-Polypropylenröhrchen überführt und bei 353 g für 7 min zentrifugiert. Der Überstand wird abgesaugt und in 225 μ l Medium resuspendiert. Parallel werden $0,5-1 \cdot 10^6$ PBMC des Stimulators für 30 min bei Raumtemperatur (RT) im Dunkeln mit einem Fluorochrom-markierten AK angefärbt. Hierzu werden die Zellen in einem Gesamtvolumen von 50 μ l (0,5 μ l anti-CD45 AK in 49,5 μ l PBS) aufgenommen und inkubiert. Im Anschluss wurden die Zellen mit 4 ml PBS gewaschen (Zentrifugation 353 g, 7 min), um nicht gebundene Fluorochrom-gekoppelte AK zu entfernen, und in 225 μ l Medium resuspendiert.

Zur Stimulation wurden 225 µl ungefärbte Zellsuspension des Reaktanten und 225 µl vorgefärbte Zellsuspension des Stimulators in Rundboden-Polypropylenröhrchen gemischt. Eine Stimulation mit autologen, vorgefärbten Zellen diente jeweils als Negativkontrolle. Zusätzlich wurden weitere Kontrollstimulationen mit vorgefärbten Third-Party Stimulatorzellen, die von weiteren unabhängigen Personen stammten, mitgeführt, so dass für jeden Reaktanten das Ausmaß alloreaktiver T-Zellen gegen Stimulatorzellen im Vergleich zur autologen Negativkontrolle mitbestimmt werden konnte. Zu jedem Stimulationsansatz wurde je 1 µg/ml der kostimulatorisch wirkenden Antikörper anti-CD28 und anti-CD49d hinzugegeben, um eine optimale Stimulation zu erzielen. Nach intensivem Mischen wurden die Ansätze für 5 min bei 252 g zentrifugiert, um die Zell-Zell-Interaktion am Boden des Röhrchens zu beschleunigen. Der Überstand wurde danach nicht abgenommen, sondern die zentrifugierten Zellen wurden direkt für 30 min im Brutschrank inkubiert. Alle Inkubationsschritte im Brutschrank erfolgten bei 37°C und 6% CO₂ mit lose angeschraubtem Deckel. Danach wurde das Zellpellet resuspendiert und erneut für 5 min bei 252 g zentrifugiert. Der Überstand wurde wiederum nicht abgenommen. Die Zellen wurden für weitere 1,5 h im Brutschrank inkubiert. Danach wurden 10 µg/ml Brefeldin A hinzugegeben, um die Sekretion der Zytokine zu verhindern. Die Zellen wurden erneut bei 252 g für 5 min zentrifugiert und für weitere 4 h im Brutschrank inkubiert. Nach Ablauf der Gesamtinkubationszeit von 6 h erfolgte die Fixierung der PBMC. Hierzu wurde zu jeder Probe zunächst 2 mM EDTA hinzugegeben, um Zell-Zell Interaktionen zu lösen. Die Proben wurden für 10 s auf einem Schüttelmixer intensiv durchmischt und für 15 min bei RT im Dunkeln inkubiert. Nach der Inkubation wurden 2 ml PBS-0,02% EDTA hinzugefügt und die Proben bei 353 g für 7 min abzentrifugiert. Nach Abnahme des Überstands erfolgte die Fixierung des Zellpellets mit 300 µl einer vorgewärmten (37°C) 4% PFA-Lösung, welche nach exakt 5 min durch Zugabe von 2 ml kaltem FACS-Puffer abgestoppt wurde. Die Proben wurden bei 353 g für 7 min zentrifugiert und der Überstand abgehoben. Anschließend wurden die Zellen in 200 µl FACS-Puffer aufgenommen und entweder sofort gefärbt oder bis zur Färbung am Folgetag über Nacht bei 4°C im Kühlschrank gelagert.

4.3.5.2 Stimulation alloreaktiver T-Zellen aus Vollblutproben

Zum Nachweis alloreaktiver T-Zellen im Vollblut wird von jeweils zwei Probanden heparinisieretes Vollblut benötigt. Ähnlich wie bei der Verwendung isolierter PBMC (4.3.5.1)

wurden die Zellen des Stimulators mit CD45 Antikörper vorgefärbt, um später die Zellen der beiden Personen mittels Durchflusszytometrie unterscheiden zu können. Anschließend wurde ebenfalls durch Mischen der beiden Vollblutproben eine MLR durchgeführt.

Vor der Stimulation der Vollblutproben ist eine Waschprozedur notwendig um bei den Stimulatorzellen ungebundene Antikörper zu entfernen. Zudem war es wichtig, sowohl bei den Zellen des Reaktanten als auch des Stimulator störende Serumbestandteile wie Isoagglutinine zu entfernen (Abbildung 6A) [45]. Dazu wurde zunächst je ein 15 ml Falcon mit 500 µl Blut des Stimulators bzw. 700 µl Blut des Reaktanten gewogen und das jeweilige Ausgangsgewicht notiert. Zur Vorfärbung der Stimulatorprobe wurde direkt in jedes Röhrchen 0,5 µl CD45 Antikörper hinzupipettiert, durchmischt und für 30 min bei RT im Dunkeln inkubiert. Anschließend wurden sowohl die Reaktanten- als auch Stimulatorproben mit je 14 ml PBS versetzt und bei 353 g für 10 min zentrifugiert. Der Waschpuffer wurde mittels einer Wasserstrahlpumpe vorsichtig knapp bis zur Erythrozytenschicht abgesaugt, ohne diese zu entfernen. Die Proben wurden erneut mit 14 ml Medium (RPMI-0,5% HSA-1% P/S-1% Gln, Zentrifugation 353 g, 10 min) gewaschen. Nach vorsichtigem Absaugen des Überstandes wurden die 15 ml Falcons erneut gewogen und auf ihr notiertes Ausgangsgewicht mit Medium aufgefüllt. Erst dann wurden 500 µl der Reaktantenprobe eines Ansatzes zu den entsprechenden 500 µl der Stimulatorprobe des gleichen Ansatzes hinzugefügt (Gesamtmenge an Zellsuspension bzw. Vollblut in einem Ansatz: 1 ml; Abbildung 6A). Zu jedem Stimulationsansatz wurde ein Gemisch kostimulatorisch wirkender Antikörper (1 µg/ml anti-CD28 und 1 µg/ml anti-CD49d) hinzugefügt, durchmischt und anschließend für 2 h im Brutschrank (37°C, 6% CO₂, mit lose angeschraubtem Deckel) inkubiert. Nach der Zugabe von 10 µg/ml Brefeldin A inkubierten die Ansätze für weitere vier Stunden im Brutschrank (37°C, 6% CO₂, mit lose angeschraubtem Deckel).

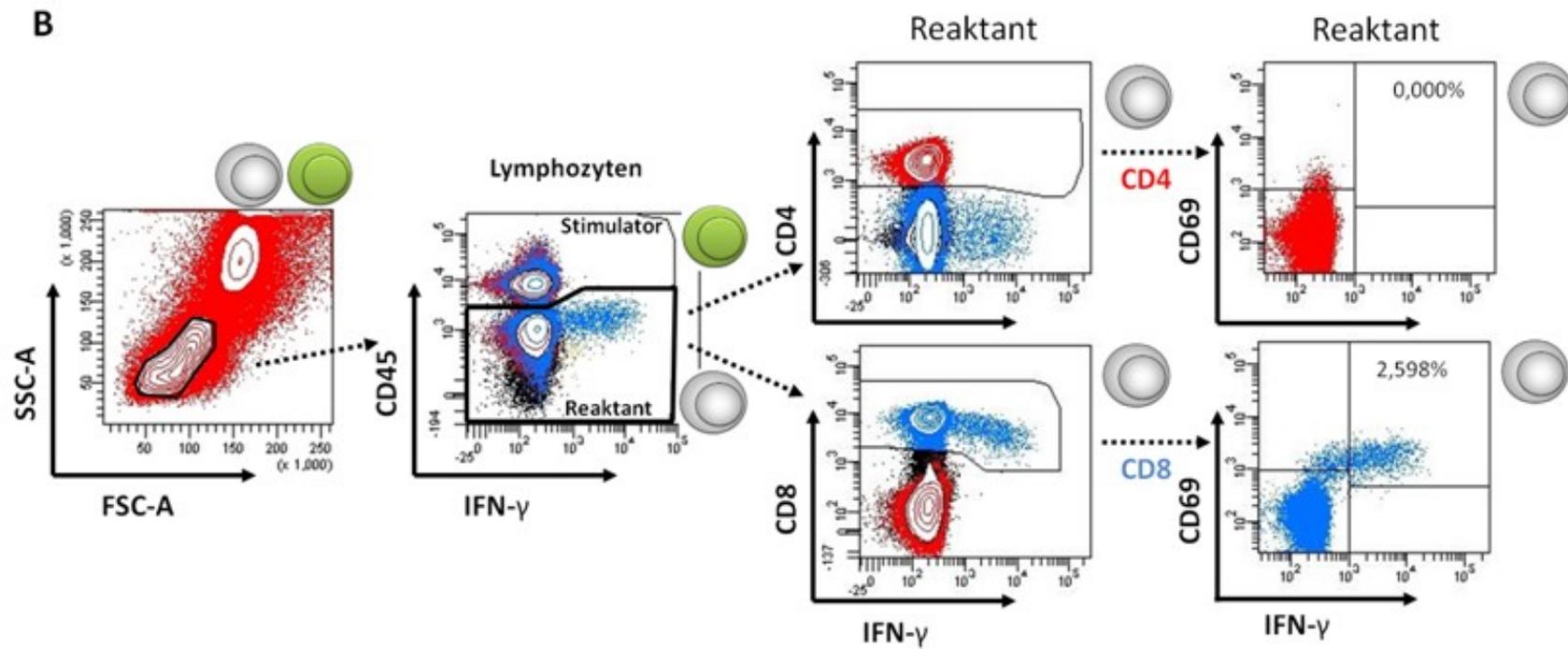
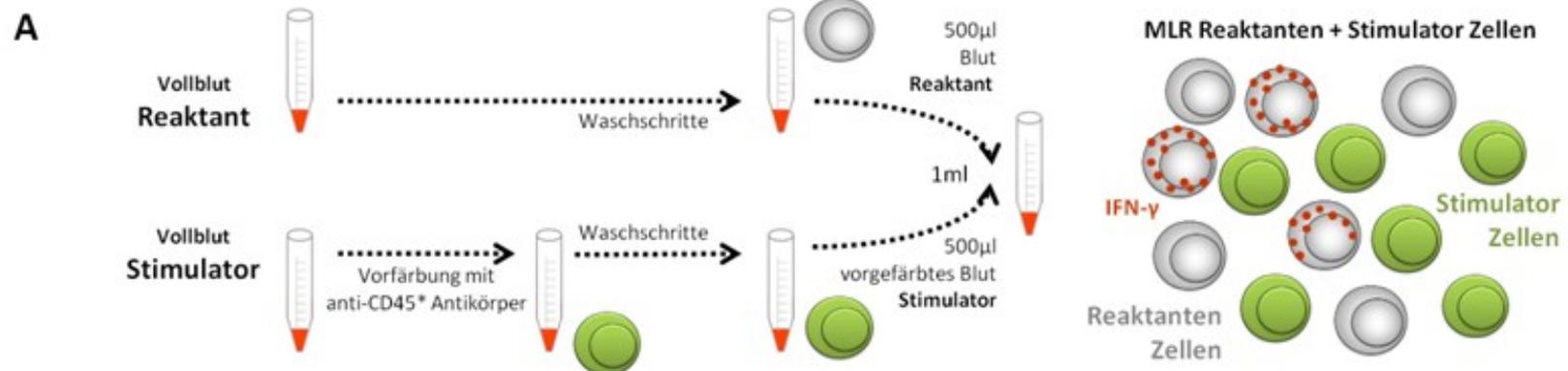


Abbildung 6: Darstellung des Vollblutverfahrens und Festlegung der Gating-Strategie zum Nachweis alloreaktiver T-Zellen. (A) Die Zellen des Spenders („Stimulator“ – grüne Zellen) werden mit dem Pan-Leukozytenmarker CD45 *in vitro* vorgefärbt, um in der durchflusszytometrischen Analyse zwischen Zellen des Spenders und Empfängers („Reaktant“ – graue Zellen) unterscheiden zu können. Nach zwei Waschschritten (siehe Abschnitt 4.3.5.2) erfolgte die Stimulation der Reaktanzellen mit den Stimulatorzellen wie in einer Mixed Lymphocyte Reaction (MLR). Alloreaktive T-Zellen können nach einer Inkubationszeit von insgesamt 6 h, wobei 2 h nach Stimulationsbeginn Brefeldin A zur Zytokinakkumulation in der Zelle hinzugefügt wurde, durch die intrazelluläre Induktion des Zytokins Interferon-gamma (IFN- γ – rote Punkte) nachgewiesen werden. **(B)** Alle Zellen wurden im Durchflusszytometer nach ihrer Granularität (SSC) und ihrer Größe (FSC) graphisch dargestellt und die Lymphozytenregion eingegrenzt („gegated“). Ein Punkt entspricht in der „Dotplot“-Darstellung einer einzelnen Zelle bzw. die Dichtegradien in der „Densityplot“-Darstellung der Häufigkeit von Zellen einer bestimmten Eigenschaft. Die Lymphozyten wurden in CD45 vorgefärbte („Stimulator“ – grüne Zellen) und ungefärbte („Reaktanten“ – graue Zellen) Zellen eingeteilt. Beispielhaft wurden hier die Zellen des Reaktanten in CD4 und CD8 positive T-Zellen und zur Erfassung ihrer funktionellen Eigenschaften anhand ihrer Expression des Aktivierungsmarkers CD69 und der Induktion des Zytokins IFN- γ unterteilt. Alloreaktive T-Zellen wurden somit definiert als CD69 und IFN- γ (oberer rechter Quadrant) doppelt positive Zellen. CD: Cluster of Differentiation; FSC: Forward scatter; IFN- γ : Interferon gamma; SSC: Side Scatter. (Abbildung reproduziert aus Originalpublikation zu dieser Arbeit [108]).

Im Anschluss erfolgte die Fixierung der Zellen. Hierzu wurde zunächst 2 mM EDTA zu den stimulierten Ansätzen gegeben und jeweils 10 s auf einem Schüttelmixer durchmischt. Nach einer Inkubation von 15 min bei RT im Dunkeln wurde 9 ml Lysingsolution pro ml Vollblut zur Erythrozytenlyse und zur Fixierung der Leukozyten hinzugefügt. Nach weiteren 10 min Inkubation bei RT im Dunkeln und anschließender Zentrifugation bei 353 g für 10 min wurde der Überstand abgenommen und die Zellen wurden in 2 ml FACS-Puffer resuspendiert. Nach einem zweiten Zentrifugationsschritt (10 min bei 353 g) wurden die Zellpellets in 200 µl/Probe FACS-Puffer resuspendiert. Die Zellen wurden dann entweder direkt gefärbt oder über Nacht bei 4°C im Kühlschrank aufbewahrt. Bei einigen Experimenten, bei denen aus einem Ansatz zwei verschiedene Färbungen durchgeführt werden sollten, wurde das Zellpellet jeweils in 400 µl FACS-Puffer aufgenommen.

4.3.5.3 Hemmung der Alloreaktivität durch immunsuppressive Medikamente in vitro

Bei ausgewählten Experimenten wurde die Stimulation alloreaktiver T-Zellen in Anwesenheit immunsuppressiver Medikamente durchgeführt. Dazu wurde das Vollblut unmittelbar nach Zugabe der kostimulatorischen Antikörper mit Immunsuppressiva wie FK506 (Tacrolimus; 20 ng/ml), Cyclosporin A (Sandimmun/Sirolimus; 250 ng/ml) oder Prednisolon (1600 ng/ml) in physiologischen Konzentrationen versetzt. Die anschließende Stimulation und Fixierung der Proben erfolgte wie unter Abschnitt 4.3.5.2 beschrieben.

4.3.5.4 Bestimmung alloreaktiver T-Zellen im Vollblut mittels Stimulation durch PBMC

Zur longitudinalen Analyse alloreaktiver T-Zell Messungen vor und im Verlauf nach Transplantation wurde frisch erhaltenes heparinisiertes Vollblut des Empfängers (Reaktanten) auf alloreaktive T-Zellen gegen den Spender (Stimulator) untersucht. Spender-PBMC oder MMC wurden zum Zeitpunkt der Transplantation eingefroren und im Verlauf nach Auftauen als Stimulatorzellen eingesetzt. Parallel wurden PBMC von drei weiteren unabhängigen Personen als irrelevante „Third-Party Stimulatoren“ eingesetzt. Als Negativkontrolle dienten eingefrorene PBMC des Empfängers selbst.

Eingefrorene PBMC des Spenders, dreier Third-Party Probanden und des Empfängers (Stimulatoransätze) wurden laut Protokoll 4.3.4 aufgetaut. Im Anschluss wurden $1 \cdot 10^6$ Zellen pro Stimulatoransatz mit 0,5 µl Pan-Leukozytenmarker CD45 vorgefärbt. Nach einer

Inkubationszeit von 30 min bei RT im Dunkeln wurden die Zellen mit 3 ml PBS gewaschen (Zentrifugation: 353 g, 10 min), der Überstand verworfen und die Zellen in 225 µl Medium (RPMI; 0,5% HSA; 1% P/S; 1% Gln) resuspendiert. Das frisch erhaltene Vollblut des Empfängers (Reaktant) blieb ungefärbt und wurde wie bereits beim Vollblutverfahren beschrieben zweimal gewaschen (einmal mit PBS, einmal mit Medium (siehe 4.3.5.2)). Anschließend erfolgte eine MLR, bei der die Zellen aus dem Vollblut des Empfängers mit den eingefrorenen PBMCs des Spenders in Polypropylenröhrchen stimuliert wurden. Nach Zugabe von 500 µl Vollblut des Empfängers zu 225 µl ($1 \cdot 10^6$ eingefrorenen PBMCs) des Spenders wurde zu jedem Stimulationsansatz ein Gemisch kostimulatorischer Antikörper (1 µg/ml anti-CD28 und 1 µg/ml anti-CD49d) hinzugefügt. Anschließend wurden die Proben durchmischt, stimuliert, inkubiert und wie oben behandelt (siehe 4.3.5.2).

Zusätzlich zu den alloreaktiven Messungen aus Reaktanten-Vollblut mit Stimulator-PBMC wurde eine Positivkontrolle mittels *Staphylococcus aureus* Enterotoxin B (SEB) mitgeführt. Hierzu wurde 250 µl frisches Vollblut des Empfängers mit dem Superantigen SEB (2,5 µg/ml) stimuliert und zusätzlich $1 \cdot 10^6$ eingefrorene PBMCs mit Superantigen stimuliert (siehe 4.3.6). Durch diese polyklonale Stimulation mit SEB konnte überprüft werden, ob die eingefrorenen PBMCs funktionell intakt und in der Lage waren Zytokine zu produzieren.

4.3.5.5 Waschschritte bei Verwendung von Ethylendiamintetraessigsäure-(EDTA)-Blut bei einer Vollblut-Stimulation

Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA) fängt als Calciumkomplexbildner die für die Signaltransduktion essentiellen Calciumionen aus dem Blut ab. Bei der Verwendung von EDTA als Antikoagulant musste das Vollblut daher vor einer spezifischen Stimulation gewaschen werden. Um zu testen, inwieweit auch EDTA Proben zum Nachweis spezifischer T-Zellen nach Stimulation geeignet sind, wurde die EDTA-Vollblutprobe zunächst mit 14 ml PBS und ein zweites Mal mit 14 ml Medium (RPMI; 0,5% HSA; 1% P/S; 1% Gln) gewaschen (Zentrifugation: 353 g, 10 min) und der Überstand verworfen, bevor eine Stimulation durchgeführt wurde.

4.3.6 Stimulation antigenspezifischer und polyklonaler T-Zellen

Als Positivkontrolle der T-Zellreaktion wurde eine Stimulation mit *Staphylococcus aureus* Enterotoxin B (SEB; 2,5 µg/ml) mitgeführt. Bei SEB handelt es sich um ein Superantigen, das eine Aktivierung der T-Lymphozyten unabhängig von einer spezifischen Antigenbindung und unter Umgehung der Prozessierung durch antigenpräsentierende Zellen einen MHC-T-Zell-Rezeptor Crosslink vollzieht und somit zu einer starken T-Zell Reaktion, gemessen an der Zytokinausschüttung, führt. Diese Stimulation diente als Positivkontrolle und erlaubte eine Kontrolle darüber, ob die Stimulationsbedingungen korrekt waren bzw. ob die T-Zellen eines Probanden funktionell intakt und zur Zytokinproduktion in der Lage waren. In einigen Fällen wurde zusätzlich mit Cytomegalievirus Antigen (CMV-Ag) und zugehörigem Kontroll-Antigen (Ko-Ag) stimuliert. Bei Stimulationen mit diesem Antigen, das aus einem Lysat CMV-infizierter Fibroblasten gewonnen wurde, zeigen die Probanden eine Immunreaktion, die vor Stimulation Kontakt mit CMV-Erregern hatten und somit eine spezifische T-Zell Immunantwort ausgebildet hatten. Die entsprechende Stimulation mit dem Kontroll-Antigen, das aus einem Lysat nicht infizierter Fibroblasten besteht, diente als Negativkontrolle, um mögliche Unspezifitäten zu identifizieren und wurde später von der CMV- bzw. SEB-Messung subtrahiert.

Ähnlich wie die Stimulation alloreaktiver T-Zellen erfolgt die Stimulation in heparinisiertem Vollblut in Anwesenheit der kostimulatorisch wirkenden Antikörper (1µg/ml anti-CD28 und anti-CD49d). Die Ansätze wurden mit den entsprechenden Antigenen versetzt (je 32 µl/ml Ko-Ag oder CMV-Ag; 2,5 µg/ml SEB) und für 2 h im Brutschrank bei 37°C und 6% CO₂ mit lose angeschraubtem Deckel inkubiert. Danach wurde 10 µg/ml Brefeldin A zugegeben und für weitere 4 h im Brutschrank inkubiert. Im Anschluss erfolgte die Fixierung der Zellen wie unter Abschnitt 4.3.5.2 beschrieben.

4.3.7 Bestimmung der T-Zellproliferation

4.3.7.1 T-Zellproliferation mittels einer Carboxyfluorescein Succinimidyl Ester Proliferations-Methode

Um die T-Zellproliferation nach spezifischer Stimulation zu untersuchen, wurde ein Carboxyfluorescein Succinimidyl Ester (CFSE) Proliferationsverfahren durchgeführt. CFSE

wird von der Zelle aufgenommen und bindet kovalent an intrazelluläre Amine. Proportional zu jeder Zellteilung vermindert sich die CFSE-Fluoreszenzintensität der jeweiligen Tochterzelle im Vergleich zur Vorläuferzelle.

$5 \cdot 10^6$ PBMC der Reaktanten und Stimulatoren (4.3.1) wurden in PBS-0,1% humanes Serum Albumin (HSA) resuspendiert. Die Stimulatorzellen wurden zur Inaktivierung mit 30 Gray bestrahlt und verloren damit ihre Fähigkeit zur Proliferation. Die Zellsuspension des Reaktanten wurde mit 10 mM CFSE (MoBiTec, Göttingen) in PBS-0,1% HSA für 10 min markiert. Anschließend wurde die Zellsuspension drei Mal mit Medium, gefolgt von je einer 10 minütigen Inkubationszeit bei 37°C unter ständiger Bewegung auf einem MACS-Roller, gewaschen. Anschließend wurden die Zellen des Reaktanten und des Stimulators in je 150 µl Medium (RPMI; 1% Gln; 1% P/S; 5% FCS-Z) aufgenommen. Die Stimulation erfolgte als gemischte Lymphozytenreaktion in einer 48 Well-Kulturplatte mit 300.000/Well CFSE-gefärbte Reaktantenzellen und 300.000/Well bestrahlten ungefärbten Stimulatorzellen (insgesamt 600.000 PBMCs/Well) im Brutschrank bei 37°C und 6% CO₂. Autologe Kontrollen dienten dabei als Negativkontrollen. Positivkontrollstimulationen wurden mittels SEB (2,5 µg/ml), oder bei CMV-seropositiven Probanden mittels CMV-Antigen (BioWhittaker; 32 µl/ml) durchgeführt. Die Kultur der PBMCs erfolgte über einen Zeitraum von sieben Tagen. Zwischen Tag 3 und Tag 4 wurde ein Medienwechsel durchgeführt. Dazu wurden 150 µl verbrauchtes Medium vorsichtig abgenommen und durch 150 µl frisches, auf 37°C erwärmtes Medium (RPMI; 1% Gln; 1% P/S; 5% FCS-Z) ersetzt. Die Analyse der Proliferation fand an Tag 5 und Tag 7 statt. Dazu wurden 150 µl Überstand vorsichtig abgenommen und verworfen. In den übrigen 150 µl wurden die Zellen resuspendiert und in FACS-Röhrchen überführt. Mit 250 µl PBS wurden die Wells noch ausgespült, um den Zellverlust so gering wie möglich zu halten. Danach erfolgte die Zugabe von 2 mM EDTA, eine Durchmischung der Probe von 10 s auf dem Schüttelmixer und im Anschluss eine Inkubation von 15 min bei RT im Dunkeln. Nach der Inkubation wurden 2 ml FACS-Puffer hinzugefügt und 7 min bei 353 g zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und die Zellen wurden nach Färbeprotokoll 9 (siehe Tabelle 6) behandelt.

4.3.7.2 T-Zellproliferation mittels Bromdesoxyuridin (BrdU)-Proliferations-Verfahren

Zur Analyse der Proliferation unter Verwendung von Vollblutproben wurde ein

Bromdesoxyuridin-(BrdU-) Proliferationsverfahren durchgeführt, mit dem die Proliferation bereits nach zwei bis drei Tagen gemessen werden kann. Das Prinzip dieser Methode beruht auf dem Einbau des Thymidin-Analogons BrdU während der DNA-Synthese. Durch Zugabe eines DNase gekoppelten anti-BrdU Antikörpers kann der Einbau von BrdU in einer neusynthetisierten DNA als Korrelat einer Zellteilung nachgewiesen werden, da sich der Einbau von BrdU proportional zur Menge neusynthetisierter DNA- bzw. zur Proliferation einer Zelle verhält. Die Analyse der Proliferation nach Stimulation kann zudem mit der Analyse der Zytokinproduktion verknüpft werden. Die Anwendung des Verfahrens aus Vollblut erlaubt zudem die Möglichkeit, den Einfluss immunsuppressiver Medikamente auf die Fähigkeit zur Proliferation von T-Zellen zu quantifizieren.

In einem Volumen von 450 µl heparinisierten Vollblut erfolgte die Stimulation der T-Zellen in einem 15 ml Falcon Röhrchen in Anwesenheit von je 1 µg/mL anti-CD28 und anti-CD49d mit 2,5 µg/mL *Staphylococcus aureus* Enterotoxin B (SEB). Um den Effekt von Immunsuppressiva auf die Proliferation zu messen, erfolgte die Stimulation in An- und Abwesenheit von *in vitro* zugegebenen immunsuppressiven Medikamenten (Cyclosporin A (175; 800; 4000 ng/ml), Tacrolimus (10; 50; 250 ng/ml), Methylprednisolon (100; 1000; 10.000 ng/ml), Mycophenolsäure (MPA; 0,33; 1; 3 µmol/l) und Rapamycin (10; 100; 1000 ng/ml)). Die Proben wurden für 32 h im Brutschrank bei 37°C und 6% CO₂ mit lose angeschraubten Deckeln stimuliert. Nach 28 h Inkubation wurden je 500 µM BrdU (Sigma-Aldrich, Steinheim) pro Ansatz hinzugegeben. Nach weiteren 4 h Inkubation wurde 10 µg/ml Brefeldin A hinzugefügt und für weitere 2 h inkubiert. Anschließend wurden die Zellen wie bereits unter 4.3.5.2 beschrieben fixiert. Die Proben wurden entweder sofort gefärbt laut Färbeprotokoll 12 (siehe Tabelle 6) und durchflusszytometrisch analysiert oder bis zur Färbung bei 4°C gelagert.

4.3.8 Durchflusszytometrische Analyse

Die stimulierten Proben wurden im Anschluss an die Fixierung mit verschiedenen Gemischen Fluorochrom-markierter Antikörper gefärbt. Ein Nachweis intrazellulär akkumulierter Zytokine erforderte dabei eine Permeabilisierung der Zellen mit Saponin. Die gefärbten Zellen wurden anschließend mittels Durchflusszytometrie analysiert.

Die Durchflusszytometrie (FACS, fluorescence activated cell sorting) ist eine lasergestützte Methode zur Bestimmung der spezifischen Lichtstreuungs- und Fluoreszenzeigenschaften von Zellen, die zuvor mit geeigneten Antikörpern markiert wurden. Über eine Kapillare wird die Zellsuspension durch Überdruck in eine Messküvette eingebracht. Dies erfolgt durch hydrodynamische Fokussierung bei der die Zellen durch eine sie umgebende Trägerflüssigkeit stark beschleunigt werden, so dass einzelne Zellen sequenziell die Laserstrahlen passieren, wo diese erfasst, analysiert und klassifiziert werden. Wenn eine Zelle mit Laserlicht interagiert, kommt es zu einer für eine Zellpopulation typischen Beugung oder Streuung des Lichtstrahls, die von Fotodetektoren erfasst wird. Das Vorwärtsstreulicht (FSC, forward scatter) liefert dabei Informationen über die Größe der Zellen und wird durch Beugung des Lichtes hervorgerufen. Das Seitwärtsstreulicht (SSC, side scatter) vermittelt Informationen über Granularität der Zellen und wird durch Brechung des Lichtes hervorgerufen. Die so ermittelten Größen- und Granularitätseigenschaften jeder Zelle können in einem zweidimensionalen Diagramm wiedergegeben werden und dienen der Identifizierung von Zellsubpopulationen. Durch zusätzliche Behandlung der Zellen mit einem Fluorochrom-gekoppelten Antikörper können einzelne Zellen einer Population oder Subpopulation genauer identifiziert und charakterisiert werden. Dies kann über Anfärben Zelltyp-spezifischer Oberflächenmoleküle oder aber nach Permeabilisierung der Zellmembran durch Detektion intrazellulär lokalisierter Antigene erfolgen. Die Fluorochrome werden durch den Laser angeregt und emittieren das Licht in Form von Photonen längerer Wellenlänge, die durch ein optisches System gemessen werden können. Da verschiedene Fluorochrome trotz gleicher Anregungswellenlänge unterschiedliche charakteristische Emissionswellenlängen besitzen, ist es möglich, mit einem Laser mehrere verschieden gekoppelte Antikörper zu unterscheiden und dadurch simultan unterschiedliche Zelleigenschaften zu untersuchen [45]. Die in dieser Arbeit angewandten Fluorochrome mit ihren physikalischen Eigenschaften sind in Tabelle 5 dargestellt.

Tabelle 5: Fluorochrom-Spezifität eingeteilt nach Fluoreszenz Emissionsfarbe, Anregungswellenlänge des Fluorochroms, Anregungswellenlänge des Lasers und Emissionsmaximum

Fluorochrom	Fluoreszenz Emissionsfarbe	Optimale Anregungswellenlänge (nm)	Anregungswellenlänge des Lasers (nm)	Maximale Emissionwellenlänge (nm)
BD Horizon™ V450	Blau	404	405	448
BD Horizon™ V500	Grün	415	405	500
FITC	Grün	494	488	519
PE	Gelb	496, 564	488, 532, 561	578
APC	Rot	650	633, 635, 640	660
PerCP	Rot	482	488, 532	678
PerCP-Cy™5.5	Dunkelrot	482	488, 532	695
PE-Cy™7	Infrarot	496, 564	488, 532, 561	785
BD APC-H7	Infrarot	650	633, 635, 640	785

(Tabelle modifiziert nach [109])

4.3.8.1 Durchflusszytometrische Färbung

Nach Abschluss der Stimulation und Fixierung lagen die Zellen in einem Volumen von 200 µl FACS Puffer pro geplanten Färbeansatz vor. Jeweils 200 µl der Zellsuspension wurde in FACS-Röhrchen überführt und in 2 ml Saponinpuffer (FACS Puffer mit 0,07% Saponin) für 10 min bei RT inkubiert. Die Inkubation erfolgte im Dunkeln, da die Ansätze bereits mit einem Fluorochrom-gekoppelten Oberflächen-Antikörper (CD45) vorbehandelt waren. Durch die Zugabe von Saponin wurde die Zellenmembran für AK permeabilisiert, um eine intrazelluläre Bindung an akkumulierte Zytokine ermöglichen zu können. Nach der Inkubation wurden die Röhrchen für 10 min bei 353 g zentrifugiert und der Überstand entfernt. Pro Ansatz wurden 50 µl AK-Mischung (Tabelle 6) hinzupipettiert, die ebenfalls 0,07% Saponin enthielt. Die Proben wurden durchmischt und für 30 min im Dunkeln inkubiert. Im Anschluss wurden die Zellen mit 3 ml FACS-Puffer gewaschen, um freie nicht gebundene Fluorochrom-gekoppelte AK zu entfernen. Nach der Zentrifugation der Proben bei 353 g für 7 min wurde der

Überstand abgesaugt. Zur Fixierung des gefärbten Zustandes wurden die Zellen in 150 µl 1% PFA aufgenommen, durchmischt und bis zur durchflusszytometrischen Analyse bei 4°C im Kühlschrank gelagert.

In Tabelle 6 sind die einzelnen Antikörper-Mischungen der verwendeten Färbungen aufgelistet. Alle Antikörpermengen wurden zuvor austitriert, so dass eine ausreichende Sättigung der Bindung gewährleistet wurde. Färbung 1 und 2 (Tabelle 6) dienten als Standardfärbung zum Nachweis alloreaktiver T-Zellen. Da die Firma Sigma den zur Vorfärbung verwendeten CD45-FITC Antikörper aus dem Programm genommen hatte, wurde die Standardfärbung 1, die vorwiegend in der Diplomarbeit zur Anwendung kam, auf Färbung 2 umgestellt (ab 31.5.2012). Zur näheren phänotypischen und funktionellen Charakterisierung alloreaktiver T-Zellen wurden bei ausgewählten Experimenten die Färbungen 3-8 durchgeführt. Färbung 9 kam zur Analyse der Proliferation über das CFSE-Proliferationsverfahren zum Einsatz. Für den Nachweis von CMV-spezifischen T-Zellen wurde Färbung 10 durchgeführt. Zur Ermittlung der Reaktivität von T-Zellen nach einer polyklonalen Stimulation mit SEB wurde Färbung 11 und zur Ermittlung der Proliferationsfähigkeit mittels BrdU-Proliferationsverfahren Färbung 12 verwendet. Bei allen Färbungen (Ausnahme Färbung 9) handelt es sich um intrazelluläre Färbungen, die in Gegenwart von 0,07% Saponin durchgeführt wurden.

Tabelle 6: Zusammensetzung der in dieser Arbeit angewandten Antikörper-Mischungen

Färbung 1 (CD45-FITC Vorfärbung –bis 30.05.2012)		
Antikörper	Konjugat	Menge [µl]
CD8	APC	0,5
CD4	PE-Cy7	0,5
CD69	PerCP	2
IFN-γ	PE	0,3
SAP 5%		1
FACS-Puffer		45,7
Summe		50

Färbung 2 (CD45-APC Vorfärbung –ab 31.05.2012)		
Antikörper	Konjugat	Menge [µl]
CD8	PerCP	4
CD4	PE-Cy7	0,5
CD69	PE	2
IFN-γ	FITC	0,5
SAP 5%		1
FACS-Puffer		42
Summe		50

Färbung 3 (phänotypische und funktionelle Charakterisierung alloreaktiver T-Zellen)		
Antikörper	Konjugat	Menge [µl]
CD8	PerCP	4
CD4	PE-Cy7	0,5
IL-2	PE	2
IFN-γ	FITC	0,5
SAP 5%		1
FACS-Puffer		42
Summe		50

Färbung 4 (phänotypische und funktionelle Charakterisierung alloreaktiver T-Zellen)		
Antikörper	Konjugat	Menge [µl]
CD8	PerCP	4
CD4	PE-Cy7	0,5
TNF-α	PE	0,5
IFN-γ	FITC	0,5
SAP 5%		1
FACS-Puffer		43,5
Summe		50

Färbung 5 (phänotypische und funktionelle Charakterisierung alloreaktiver T-Zellen)		
Antikörper	Konjugat	Menge [µl]
CD8	PerCP	4
CD45-RO	PE-Cy7	2
CCR7	PE	3
IFN-γ	FITC	0,5
SAP 5%		1
FACS-Puffer		39,5
Summe		50

Färbung 6 (phänotypische und funktionelle Charakterisierung alloreaktiver T-Zellen)		
Antikörper	Konjugat	Menge [µl]
CD8	PerCP	4
CD4	PE-Cy7	0,5
CD27	FITC	4
IFN-γ	PE	0,3
SAP 5%		1
FACS-Puffer		40,2
Summe		50

Färbung 7 (phänotypische und funktionelle Charakterisierung alloreaktiver T-Zellen)		
Antikörper	Konjugat	Menge [µl]
CD8	PerCP	4
CD4	PE-Cy7	0,5
CD62L	PE	8
IFN-γ	FITC	0,5
SAP 5%		1
FACS-Puffer		36
Summe		50

Färbung 8 (phänotypische und funktionelle Charakterisierung alloreaktiver T-Zellen)		
Antikörper	Konjugat	Menge [µl]
CD8	PerCP	4
CD4	PE-Cy7	0,5
IL-4	PE	0,5
IFN-γ	FITC	0,5
SAP 5%		1
FACS-Puffer		43,5
Summe		50

Färbung 9 (CFSE-Proliferationsverfahren alloreaktiver T-Zellen)		
Antikörper	Konjugat	Menge [µl]
CD4	PE	4
CD8	PerCP	6
CD3	APC	1
FACS-Puffer		39,0
Summe		50

Färbung 10 (Färbung CMV-spezifischer T-Zellen)		
Antikörper	Konjugat	Menge [µl]
CD4	PE-Cy7	1
CD69	PerCP	2
IL-2	PE	2
IFN-γ	FITC	0,5
CTLA-4	APC	2
TNF-α	V450	1
SAP 5%		1
FACS-Puffer		40,5
Summe		50

Färbung 11 (polyklonale Stimulation mit SEB nur bei Daten aus Abbildung 22 angewandt)		
Antikörper	Konjugat	Menge [µl]
CD4	APC	0,5
CD69	PerCP	2
IFN-γ	FITC	0,5
SAP 5%		1
FACS-Puffer		46,0
Summe		50

Färbung 12 (BrdU-Proliferationsverfahren)		
Antikörper	Konjugat	Menge [µl]
BrdU-Dnase	FITC	12
CD8	PerCP	4
CD4	APC	0,5
IFN-γ	PE	0,3
SAP 5%		1
FACS-Puffer		32,2
Summe		50

4.3.8.2 Auswertung der FACS Messungen

Für die Messung und Analyse der gefärbten Proben wurde ein FACS Canto II Durchflusszytometer verwendet, mit dem es möglich ist bis zu acht Parameter gleichzeitig zu analysieren, und ein FACS Canto A Durchflusszytometer, mit dem bis zu sechs Parameter gleichzeitig analysiert werden können. Zur computergestützten Messung und Auswertung der Daten wurde das Softwareprogramm FACS Diva Software Version 6.1.3 und das Softwareprogramm FlowJo Version 7.6.5 genutzt. Die Klassifizierung der einzelnen Zellen und deren Subpopulationen in den Softwareprogrammen erfolgte mittels „Dotplot“- und „Densityplot“-Darstellung von Streulichtsignalen und Fluoreszenzeigenschaften. Mittels Histogramm können Eigenschaften eindimensional dargestellt werden. Bei jeder Probe wurden CD4 und CD8 T-Zellen durchflusszytometrisch erfasst und mittels einer festgelegten Gating-Strategie ausgewertet. Dabei wurden zunächst die Zellen nach ihrer Granularität (SSC) und ihrer Größe (FSC) graphisch dargestellt, sodass es möglich war auf die Lymphozytenpopulation zu gaten. Anschließend wurden dann je nach Experiment Subpopulationen von CD4 und CD8 T-Zellen wie beispielsweise alloreaktive CD4 und CD8 T-Zellen näher charakterisiert (siehe Abbildung 6B).

4.3.9 Bestimmung des CMV-Serostatus durch ELISA

Zur Bestimmung des CMV-Serostatus einzelner Probanden wurde ein anti-CMV-Enzymelinked Immunosorbent Assay (ELISA) durchgeführt, bei dem CMV spezifische Immunglobuline vom Typ IgG nachgewiesen werden. Der Test wird im Mikrotiterplattenformat durchgeführt, die mit gereinigten Antigenen von CMV beschichtet sind. Falls sich spezifische Antikörper der Klasse IgG in der Plasmaprobe des Probanden befinden, binden diese an das CMV-Antigen. Nach Waschen ungebundener Plasmaantikörper wird ein Enzymgekoppelter anti-Human-IgG Sekundärantikörper hinzugefügt. Nach Zugabe des Substrates kommt es zum Farbumschlag. Die Farbintensität stellt dabei ein Maß für die Menge an IgG dar. Der Test wurde nach den Anweisungen des Herstellers (Euroimmun, Lübeck) durchgeführt.

Die Reagenzien des anti-CMV-ELISAs wurden 30 min vor Beginn der Durchführung auf Raumtemperatur gebracht. Der 10-fach konzentrierte Waschpuffer wurde 1:9 mit destilliertem Wasser verdünnt. Falls sich im konzentrierten Waschpuffer Salzkristalle

befanden, wurde der Puffer auf 37°C erwärmt und vor dem Verdünnen gut durchmischt. Eingefrorene Plasmaproben der Probanden wurden aufgetaut und im Verhältnis 1:101 mit Probenpuffer verdünnt. Um einen quantitativen Test durchzuführen, wurden zusätzlich zur Positiv- und Negativkontrolle drei Kalibratoren (200, 20 und 2 RE/ml (IgG human)) mitgeführt. In je ein Reaktionsgefäß wurden 100 µl der zuvor genannten Bestandteile (Positiv-, Negativkontrolle, Kalibrator 1-3 und die verdünnten Plasmaproben) pipettiert und 30 min bei RT inkubiert. Im Anschluss wurden die Reagenzgefäße geleert und drei Mal mit je 300 µl verdünnten Waschpuffer gewaschen. Dabei wurde der Waschpuffer bei jedem Waschzyklus 30-60 s im Reagenzgefäß belassen und anschließend ausgeschüttet. Am Ende des dritten Waschschruttes wurde die Mikrotiterplatte mit der Öffnung nach unten kräftig auf Vliespapier ausgeschlagen, um Waschpufferreste vollständig zu entfernen. Im nächsten Schritt wurden 100 µl Peroxidase-markiertes anti-human-IgG in die Reagenzgefäße gegeben und für 30 min bei RT inkubiert. Im Anschluss wurden die Reagenzgefäße wiederum geleert und drei Mal wie zuvor gewaschen. Danach erfolgte eine Zugabe von 100 µl Chromogen/Substrat-Lösung. Nach 15 min Inkubation bei RT im Dunkeln wurden 100 µl Stopplösung in die Reagenzgefäße (gleiche Reihenfolge und Geschwindigkeit wie bei Chromogen/Substrat-Lösungs Zugabe) pipettiert. Innerhalb von 30 min nach dem Abstoppen der Reaktion erfolgte die photometrische Auswertung der Farbintensität bei 450 nm Messwellenlänge und einer Referenzwellenlänge zwischen 620 und 650 nm am multifunktionellen Plattenleser (Victor X4).

4.3.10 Datenverwaltung

Zur Verwaltung der Messergebnisse sowie der relevanten Patienten-Charakteristika und der klinischen Daten wurde eine Microsoft Access Datenbank erstellt. Die CMV-ELISA-Daten wurden mittels Microsoft Excel ausgewertet.

4.3.11 Statistische Analyse

Die statistischen Analysen erfolgten mit Hilfe des GraphPad Prism-Programms Version 5.0 und 6.0. Der nicht parametrische Mann-Whitney-Test wurde verwendet, wenn kontinuierliche Variablen zweier Gruppen miteinander verglichen wurden. Für entsprechende Analysen von mehr als zwei Gruppen kam der Kruskal-Wallis Test mit Dunn's

Multiple Comparison Post-Test zum Einsatz. Die Abhängigkeit für zwei oder mehr kategoriale Variablen wurde mittels des Fisher's exact Test bzw. Chi-Quadrat Test ermittelt. Der gepaarte t-Test kam zum Einsatz bei einem Vergleich eines Probanden gegen zwei unterschiedliche Stimulatoren zum gleichen Messzeitpunkt. Bei den Korrelationsanalysen fand der Spearman Test Verwendung. Bei sich wiederholenden Messungen wurde der Variationskoeffizient (CV) einer einzelnen Messreihe ermittelt und aus allen CVs der mittlere CV mit seiner dazugehörigen Standardabweichung bestimmt. Bei parametrischen Daten (Alter, Dauer der Dialyse) wurde der ungepaarte t-Test angewandt. Alle p-Werte unter 0,05 wurden als signifikant angesehen.

Für die statistischen Berechnungen alloreaktiver T-Zell Frequenzen im Rangsummentest wurde nach Abzug der Autokontrolle ein Wert von je einer halben CD4 und CD8 T-Zelle als Minimalwert festgelegt. Hierzu wurde zunächst der Mittelwert aus allen CD4 und CD8 T-Zell Messungen der Reaktanten (CD45 ungefärbten) ermittelt (n=3146). Bei den CD4 Messungen wurden im Mittel 52963 CD4 T-Zellen gemessen, bei den CD8 Messungen 32562 CD8 T-Zellen. Der Minimalwert lag folglich bei CD4 T-Zell Messungen bei 0,00095% und bei CD8 T-Zell Messungen bei 0,00155%. Alle Werte unter diesen Werten wurden für die statistische Analyse auf Null gesetzt.

4.3.12 Festlegung der Nachweisgrenze für alloreaktive T-Zellen

Damit ein Messergebnis qualitativ als positiv oder negativ ("alloreaktiv" bzw. "nicht alloreaktiv") eingestuft werden konnte, wurde aus 1330 (bzw. 2660) gemessenen Paarkombinationen eine Nachweisgrenze (NG) für alloreaktive CD4 und CD8 T-Zellen festgelegt. Eine Abschätzung der Nachweisgrenze erfolgte anhand der Verteilung des prozentualen Anteils alloreaktiver T-Zellen nach Subtraktion der autologen Stimulation (Stimulationen bei denen die eigenen Zellen in vorgefärbter Form als Stimulatorzellen dienten). Bei Proben mit negativem Messergebnis konnte davon ausgegangen werden, dass der Reaktant gegenüber dem Stimulator keine oder nur eine sehr geringe Alloreaktivität aufwies, und dass der Unterschied zwischen auto- und alloreaktiver Probe durch die dem Verfahren eigene Variabilität der Messergebnisse bedingt war. Diese negativen Messergebnisse stellten somit eine Hälfte einer um Null normalverteilten Stichprobe dar, deren doppelte Standardabweichung als Nachweisgrenze für die Alloreaktivitäts-

Bestimmung gewertet wurde. Um das 95% Konfidenzintervall abzudecken, wurde die Nachweisgrenze durch die doppelte Standardabweichung der Variabilität festgelegt. Somit ergaben sich für die Vollblut-Messungen eine NG von 0,015% für alloreaktive CD4 T-Zellen und von 0,023% für alloreaktive CD8 T-Zellen.

Bei den PBMC Proben wurde das gleiche Verfahren angewandt. Eine Nachweisgrenze von 0,035% konnte dabei für alloreaktive CD4 und von 0,032% für alloreaktive CD8 T-Zellen ermittelt werden.

Bei einigen wenigen Proben lagen keine zugehörigen autologen Messungen eines Reaktanten am selben Tag vor. In diesen Fällen wurden entsprechende Kontrollwerte aus parallel am selben Tag durchgeführten Negativkontrollen extrapoliert, indem aus mindestens vier verschiedenen Messungen eines Reaktanten der kleinste Wert als Negativkontrolle angenommen wurde. Standen keine vier unterschiedlichen Third-Party Stimulationen eines Reaktanten zur Verfügung, konnte demnach keine Negativkontrolle extrapoliert werden und die Messungen des Reaktanten von diesem Tag wurden ausgeschlossen.

5 Ergebnisse

5.1 Entwicklung eines Vollblutverfahrens zum Nachweis und zur Charakterisierung alloreaktiver T-Zellen bei Gesunden und Patienten mit Niereninsuffizienz

In unserer Abteilung wurde bereits 2004 eine durchflusszytometrische Methode zum Nachweis präformierter alloreaktiver T-Zellen entwickelt, bei der isolierte PBMC von Empfänger und Spender in einer gemischten Lymphozytenreaktion inkubiert wurden [107]. Dieses Testprinzip wurde in der folgenden Arbeit aufgegriffen und auf die Anwendung direkt aus Vollblut weiterentwickelt.

5.1.1 Alloreaktive T-Zellen lassen sich direkt aus dem Vollblut nachweisen

Zur Stimulation alloreaktiver CD4 und CD8 T-Zellen wurden 500 µl heparinisiertes Blut des Empfängers (Reaktant) mit 500 µl Zellsuspension des Spenders (Stimulator) versetzt. Die Zellen des Spenders wurden zuvor in einem Volumen von 700 µl mit dem Pan-Leukozytenmarker CD45 vorgefärbt (Abbildung 6A), um die Zellen des Reaktanten und die des Stimulators bei der nachfolgenden durchflusszytometrischen Analyse unterscheiden zu können. Alloreaktive T-Zellen wurden als CD4 oder CD8 T-Zellen über die Expression des Aktivierungsmarkers CD69 und des Zytokins IFN- γ identifiziert (Abbildung 6B). Eine Stimulation mit autologen, vorgefärbten Zellen diente jeweils als Negativkontrolle. Abbildung 7A und B zeigt typische Beispiele von je drei Probanden mit keinem, einem mäßigen bis hin zu einem hohen prozentualen Anteil alloreaktiver CD4 und CD8 T-Zellen. Die Dotplots der autologen Kontrolle sind ebenfalls dargestellt. Zur Etablierung dieser Methode wurde Vollblut von 190 gesunden Probanden und von 84 Patienten auf der Transplantationswarteliste (21 Patienten mit CAPD, 60 Hämodialysepatienten und 3 niereninsuffiziente Patienten ohne Dialyseersatzverfahren) herangezogen. Die Proben wurden jeweils paarweise in einer gemischten Lymphozytenreaktion (MLR, *Mixed Lymphocyte Reaction*) stimuliert, so dass für jeden Probanden jeweils das Ausmaß alloreaktiver T-Zellen gegen Stimulatorzellen von im Median 3 (IQR 8) verschiedenen Probanden im Vergleich zur jeweils autologen Negativkontrolle analysiert werden konnte.

Somit ergaben sich insgesamt 274 autologe Stimulationen und 1882 alloreaktive T-Zell Messungen (Abbildung 7C).

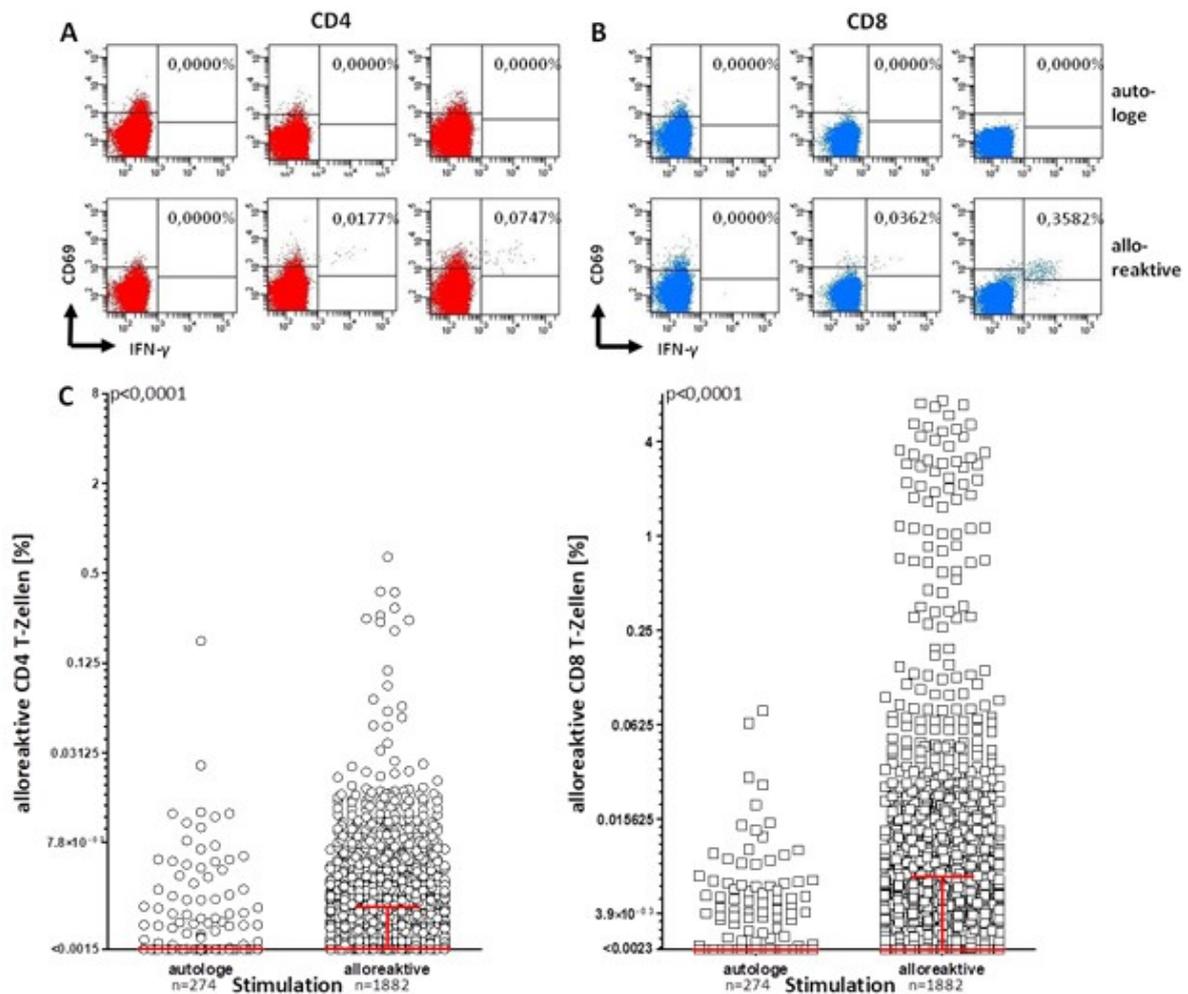


Abbildung 7: Alloreaktive T-Zellen sind mittels des Vollblutverfahrens nachweisbar. Exemplarische Dotplot-Darstellungen einer durchflusszytometrischen Analyse zeigen den Nachweis alloreaktiver CD4 (A) und CD8 (B) T-Zellen einer autologen (obere Dotplotreihe) und einer alloreaktiven Stimulation (untere Dotplotreihe) eines Reaktanten durch die intrazelluläre Akkumulation von IFN- γ und der Induktion von CD69. Der prozentuale Anteil alloreaktiver T-Zellen ist im oberen rechten Quadranten dargestellt. Dabei zeigt der Reaktant in der linken Spalte keine Alloreaktivität und die Reaktanten in der mittleren bzw. rechten Spalte eine mäßige hin zu einer hohen Alloreaktivität. (C) Durch eine paarweise Kombination von 190 immungesunden Probanden und 84 Patienten auf der Transplantationswarteliste für eine Niere (21 Patienten mit CAPD, 60 Hämodialysepatienten und 3 niereninsuffiziente Patienten ohne Dialyseersatzverfahren) fand eine durchflusszytometrische Analyse alloreaktiver CD4 und CD8 T-Zellen statt. Somit ergaben sich 274 autologe Messungen durch die Kombination der ungefärbten Zellen eines jeden Probanden mit den eigenen CD45 vorgefärbten Zellen und weitere 1882 Messungen durch die paarweise Testung des Probanden mit im Median 3 (IQR 8) weiteren Probanden („Third-Party Stimulatoren“). Alloreaktive T-Zellen zeigten signifikant höhere Frequenzen nach einer Stimulation mit einem Third-Party Stimulator im Gegensatz zur Stimulation mit autologen Zellen (CD4: 0,00% (IQR 0,0012%) vs 0,0015% (IQR 0,0036%), $p < 0,0001$; CD8: 0,00% (IQR 0,0023%) vs 0,0027% (IQR 0,0082%), $p < 0,0001$). Der Mann-Whitney Test wurde zur Signifikanzberechnung von autologen und alloreaktiven T-Zell Messungen verwendet. Die Daten zeigen die Mediane und den interquartilen Range (IQR). CAPD, continuous ambulatory peritoneal dialysis „Bauchfelldialyse“; IFN, Interferon. (Abbildung modifiziert und reproduziert aus Originalpublikation zu dieser Arbeit [108]).

Der Prozentsatz IFN- γ produzierender, CD69 positiver CD4 und CD8 T-Zellen nach einer autologen Stimulation war allgemein sehr niedrig und unterschied sich signifikant von der medianen T-Zell Frequenz nach einer alloreaktiven Stimulation mit „Third-Party“ Stimulatorzellen (CD4 $p < 0,0001$; CD8 $p < 0,0001$; Abbildung 7C). In allen weiteren Analysen wurde die jeweilige Frequenz der autologen Stimulation immer von der einer alloreaktiven Stimulation subtrahiert, um eine etwaige unspezifische Hintergrundreaktion auszuschließen.

5.1.2 Alloreaktive CD8 T-Zellen dominieren über alloreaktive CD4 T-Zellen

Generell war die Frequenz alloreaktiver CD8 T-Zellen signifikant höher als die alloreaktiver CD4 T-Zellen (siehe Abbildung 7C, median CD8: 0,0027% (IQR 0,0082%) versus CD4: 0,0015% (IQR 0,0036%); $p < 0,0001$). Nach Subtraktion des prozentualen Anteils von reaktiven T-Zellen nach autologer Stimulation von der allogenen Stimulation wurde eine Nachweisgrenze (NG) für alloreaktive CD4 und CD8 T-Zellen über die zweifache Standardabweichung der Varianz einer um Null normalverteilten Stichprobe von 880 Proben ermittelt. Diese liegt bei 0,015% für alloreaktive CD4 T-Zellen und bei 0,023% für alloreaktive CD8 T-Zellen (s. 4.3.12).

Bei Verwendung dieser Grenzwerte zeigten 9,51% aller Messungen eine CD8 T-Zell Alloreaktivität über der Nachweisgrenze, während dies lediglich bei 2,66% aller CD4 T-Zell Messungen der Fall war (Tabelle 7). Interessanterweise zeigte nur ein geringer Anteil von 1,01% sowohl eine CD4 als auch CD8 T-Zell Alloreaktivität über der Nachweisgrenze (Tabelle 7).

Tabelle 7: Anteil von Probanden mit alloreaktiven CD4 und/oder CD8 T-Zellen über bzw. unter der Nachweisgrenze

Alloreaktive T-Zellen Anzahl der Proben (n, %)	CD8 \geq NG	CD8 < NG	Gesamt
CD4 \geq NG	19 (1,01%)	31 (1,65%)	50 (2,66%)
CD4 < NG	160 (8,50%)	1672 (88,84%)	1832 (97,34%)
Gesamt	179 (9,51%)	1703 (90,49%)	1882 (100%)

NG, Nachweisgrenze

5.1.3 Phänotypische und funktionelle Charakterisierung alloreaktiver CD8 T-Zellen

Höhere Frequenzen alloreaktiver CD8 T-Zellen im Vergleich zu CD4 T-Zellen (siehe Abbildung 7C) veranlassten uns dazu, uns für weitere detaillierte phänotypische und funktionelle Analysen auf alloreaktive CD8 T-Zellen zu konzentrieren. Zudem wurde die Hemmbarkeit alloreaktiver CD8 T-Zellen durch immunsuppressiv wirkende Medikamente analysiert. Hierzu wurden 14 Kontrollen und 4 Patienten herangezogen. Die alloreaktiven CD8 T-Zellen zeigten einen differenzierten Effektor-Memory T-Zell Typ, der durch eine fehlende Expression der Oberflächenmoleküle CD27, CD62L und CCR7 charakterisiert war (Abbildung 8A). Zur funktionellen Charakterisierung alloreaktiver CD8 T-Zellen wurde die Induktion weiterer Zytokine nach Stimulation untersucht. Neben dem Zytokin IFN- γ produzierten alloreaktive CD8 T-Zellen die Zytokine TNF- α und IL-2. Wie bei IFN- γ produzierenden Zellen war der Prozentsatz TNF- α bzw. IL-2-produzierender CD8 T-Zellen dabei höher nach alloreaktiver Stimulation als nach autologer Stimulation (TNF- α $p < 0,0001$; IL-2 $p = 0,0083$, Abbildung 8B). Demgegenüber unterschied sich der prozentuale Anteil IL-4 produzierender CD8 T-Zellen nicht nach einer alloreaktiven und einer autologen Stimulation ($p = 0,9549$; Abbildung 8B), so dass nicht von einer spezifischen Induktion von IL-4 bei allogener Stimulation auszugehen ist.

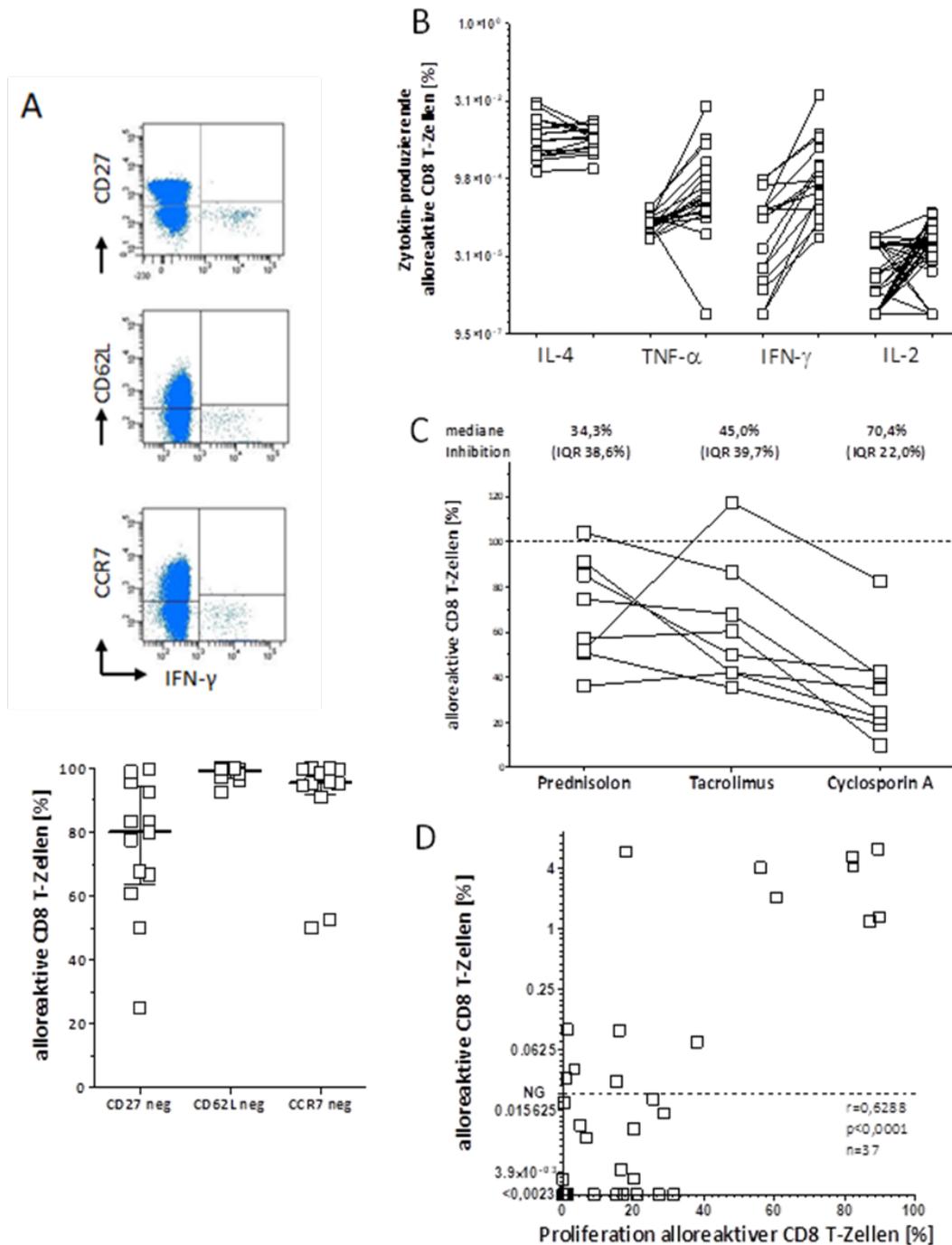


Abbildung 8: Charakterisierung alloreaktiver CD8 T-Zellen. (A) Exemplarische Dotplots einer durchflusszytometrischen Analyse zeigen die Expression der Oberflächenmoleküle CD27, CD62L und CCR7 im Zusammenhang mit der Zytokinausschüttung von IFN-γ zur phänotypischen Charakterisierung alloreaktiver CD8 T-Zellen bei immungesunden Probanden. Es wurde die gleiche Auswertstrategie wie bei den alloreaktiven CD4 und CD8 T-Zellen (siehe Abbildung 6B) angewandt, lediglich der T-Zell Aktivierungsmarker CD69 wurde durch die verschiedenen Oberflächenmoleküle bzw. Zytokine ersetzt. Die phänotypische Analyse alloreaktiver T-Zellen fand mittels isolierter mononukleärer Zellen aus dem peripheren Blut (PBMC) statt. Um eine robuste Aussagekraft zu erhalten, wurden lediglich Messungen mit mindestens zehn IFN-γ positiven CD8 T-Zell Events in die Analyse eingeschlossen. Die Oberflächenmoleküle CD27 (Median 80,0% (IQR 30,4%)), CD62L (Median 99,2% (IQR 3,0%)) und CCR7 (Median 95,6% (IQR 7,8%)) wurden auf alloreaktiven CD8 T-Zellen vorwiegend

nicht exprimiert. **(B)** Die funktionelle Analyse alloreaktiver CD8 T-Zellen wurde mittels der Induktion der Zytokine IFN- γ , TNF- α , IL-2 und IL-4 bei 16 bis maximal 59 Paarkombination, die sich aus 14 gesunden Probanden und vier Patienten auf der Transplantationswarteliste für eine Niere zusammensetzten, mittels einer PBMC-Stimulation untersucht. Auf der x-Achse ist für jedes Zytokin jeweils links die autologe und rechts die alloreaktive Messung dargestellt. Nur alloreaktive Messungen mit mindestens zehn IFN- γ positiven CD8 T-Zell Events wurden eingeschlossen. **(C)** In Vollblutproben von einem Kontrollprobanden und sechs niereninsuffizienten Patienten wurden *in vitro* der immunsuppressive Effekt von Calcineurininhibitoren und Steroiden auf alloreaktive T-Zellen untersucht. Alloreaktive CD8 T-Zellen wurden in An- und Abwesenheit folgender *in vitro* zugefügten immunsuppressiven Medikamenten in physiologischen Konzentrationen, Prednisolon (1600 ng/ml), Tacrolimus (20 ng/ml) und/oder Cyclosporin A (250 ng/ml), durchflusszytometrisch analysiert. Der inhibitorische Effekt immunsuppressiver Medikamente bezieht sich prozentual auf den Anteil nachweisbarer alloreaktiver CD8 T-Zellen in Relation zur Messung in Abwesenheit von immunsuppressiven Medikamenten (nur Lösungsmittel Ethanol zugesetzt). Diese Messung ohne immunsuppressive Medikamente wurde auf 100% gesetzt (gepunktete Linie). Die mediane Inhibition wurde mit interquartilen Range (IQR) dargestellt. Die Ergebnisse einer alloreaktiven Stimulation derselben Probandenpaarung unter Zugabe unterschiedlicher immunsuppressiver Medikamente wurden durch Linien verbunden. **(D)** Die Befähigung alloreaktiver CD8 T-Zellen zur Proliferation wurde mittels der Carboxyfluorescein-Succinimethyl-Ester-(CFSE)-Methode erfasst und mit der alloreaktiven Kurzzeit-Stimulation im Vollblutansatz bei sieben immungesunden Probanden und acht niereninsuffizienten Patienten (5 HD und 3 CAPD) verglichen. Bei der Auswertstrategie zur Erfassung der alloreaktiven Proliferation wurden zunächst Lymphozyten mittels Vorwärts- und Seitwärts-Streulicht identifiziert. Im Anschluss wurden diese auf CD3 positive Zellen eingegrenzt und diese dann in CD8 oder CD4 positive T-Zellen unterteilt, die anhand ihres CFSE-Signals als proliferierend oder nicht-proliferierend eingeteilt werden konnten (Daten nicht gezeigt). Jeder Reaktant wurde im Median gegen 2 (IQR 3) verschiedene Stimulatoren getestet, somit ergaben sich 37 alloreaktive Stimulationen. Die Proliferation und die Kurzzeit-Stimulation alloreaktiver CD8 T-Zellen derselben Paarkombination wurden am selben Tag durchgeführt. Es war eine gute Korrelation der alloreaktiven CD8 T-Zellen in der Kurzzeit-Stimulation und den proliferierenden T-Zellen, die sieben Tage nach Stimulation geerntet wurden, zu beobachten (Spearman $r=0,6288$; $p<0,0001$). Der Korrelationskoeffizient wurde mittels des Spearman-Testes berechnet. Die gepunktete Linie stellt die Nachweisgrenze (NG) alloreaktiver CD8 T-Zellen bei der Kurzzeitstimulation dar (CD8: 0,023%). CAPD, continuous ambulatory peritoneal dialysis „Bauchfelldialyse“; HD, Hämodialyse; NG, Nachweisgrenze. (Abbildung teilweise reproduziert aus Originalpublikation zu dieser Arbeit [108]).

Um das Ansprechen alloreaktiver CD8 T-Zellen auf immunsuppressive Medikamente zu untersuchen, wurde der immunsuppressive Effekt von Prednisolon, Tacrolimus und Cyclosporin A auf alloreaktive CD8 T-Zellen *in vitro* untersucht. Hierzu wurden Vollblutproben von einem Kontrollprobanden und sechs Patienten (8 Paarkombinationen), die eine deutliche Frequenz alloreaktiver CD8 T-Zellen zeigten, in An- und Abwesenheit von Prednisolon (1600 ng/ml), Tacrolimus (20 ng/ml) und Cyclosporin A (250 ng/ml) in ihren physiologischen Konzentrationen stimuliert. Prednisolon führte zu einer 34,3%-igen (IQR 38,6%) Reduktion der alloreaktiven CD8 T-Zell Frequenzen. Die Hemmwirkung durch die Calcineurininhibitoren war dagegen etwas stärker ausgeprägt (Tacrolimus um 45,0% (IQR 39,7%) und Cyclosporin A um 70,4% (IQR 22,0%); Abbildung 8C). Diese Ergebnisse zeigen, dass alloreaktive CD8 T-Zellen durch gängige, bei Nierentransplantation eingesetzte immunsuppressive Medikamente hemmbar sind. CD4 T-Zellen wurden in den jeweiligen Messungen ebenfalls angefärbt. Alloreaktive CD4 T-Zellen waren jedoch bei diesen

Probanden nicht nachweisbar (Daten nicht gezeigt), so dass die Analyse der Hemmwirkung der Immunsuppressiva lediglich für CD8 T-Zellen möglich war.

Um nachzuweisen, inwieweit alloreaktive CD8 T-Zellen zur Proliferation befähigt sind, wurde die Proliferation nach sieben Tagen Stimulation in einem CFSE-Assay gemessen und mit der Frequenz alloreaktiver CD8 T-Zellen nach Kurzzeit-Stimulation verglichen (n=37 Stimulationsreaktionen). Dabei konnte eine gute Korrelation der CD8 T-Zell Frequenzen mit der CD8 T-Zellproliferation beobachtet werden (Spearman $r=0,6288$; $p<0,0001$; Abbildung 8D).

5.1.4 Stabilität alloreaktiver T-Zell Frequenzen im zeitlichen Verlauf

Um die Stabilität von alloreaktiven T-Zell Messungen über die Zeit zu beurteilen, wurde von 20 Kontrollen und 24 Patienten (insgesamt 453 Paarkombinationen) nach einem mittleren Abstand von $112,8\pm 111,3$ Tagen eine erneute Bestimmung alloreaktiver T-Zellen durchgeführt. Dabei zeigte sich bei alloreaktiven CD4 T-Zell Frequenzen lediglich eine schwache aber signifikante Korrelation zwischen den beiden Messzeitpunkten ($r=0,302$; $p<0,0001$), während alloreaktive CD8 T-Zellen eine starke Korrelation aufwiesen ($r=0,613$; $p<0,0001$; Abbildung 9A).

Des Weiteren wurden innerhalb eines Jahres 24 Paarkombinationen an fünf verschiedenen Zeitpunkten im Abstand von $92,3\pm 35,5$ Tagen erneut untersucht. Trotz geringer Fluktuationen insbesondere bei niedrig-frequenten Messungen wurden ähnliche prozentuale Anteile alloreaktiver CD4 und CD8 T-Zellen über die Zeit beobachtet (Abbildung 9B). Diese Ergebnisse weisen auf eine interindividuelle Stabilität der alloreaktiven T-Zellen über die Zeit hin.

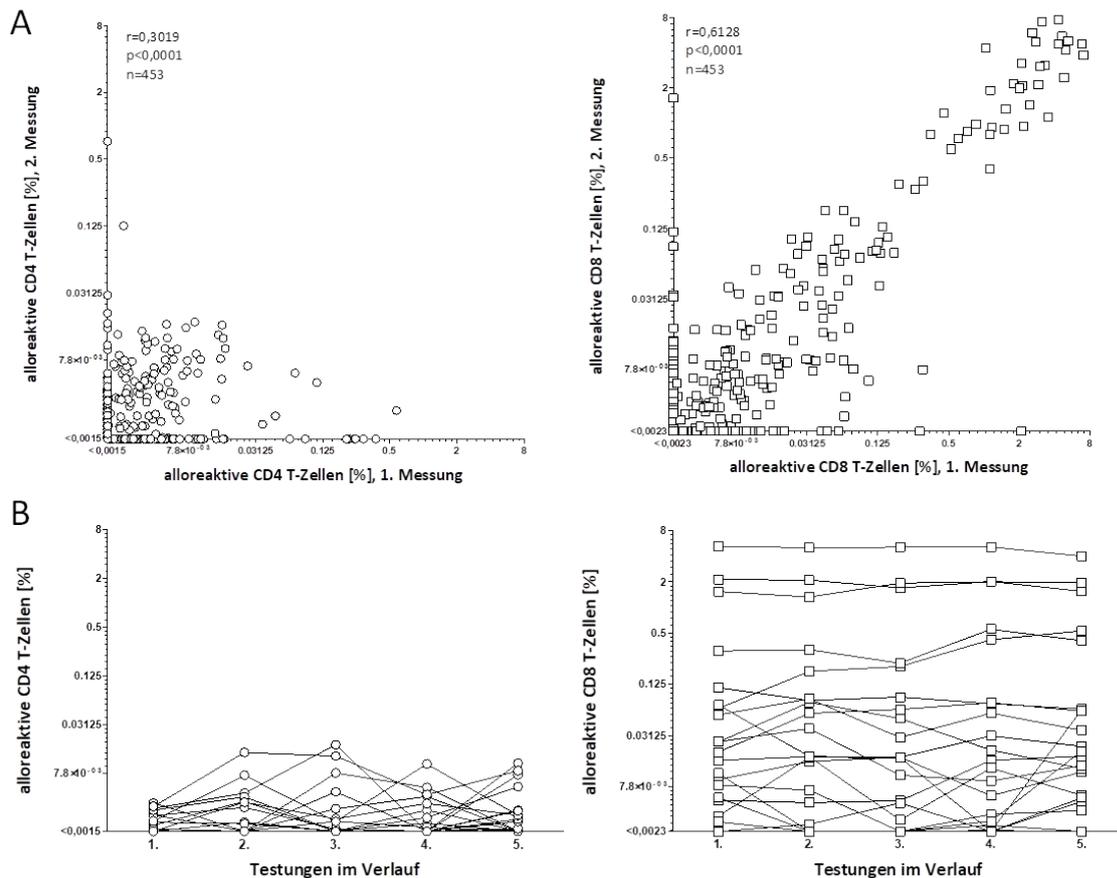


Abbildung 9: Alloreaktive T-Zellen bleiben im zeitlichen Verlauf stabil messbar. (A) Alloreaktive T-Zellen von 453 Paarkombinationen, erhalten aus Kombinationen von 20 immungesunden Probanden und 24 Patienten auf der Transplantationswarteliste für eine Niere, wurden in einem mittleren Abstand von $112,8\pm 111,3$ Tagen ein weiteres Mal bestimmt, indem erneut Vollblut der jeweiligen Paarkombination erhalten wurde. Zur Korrelationsanalyse zwischen den zwei verschiedenen Messzeitpunkten diente der Spearman Test, der eine signifikante Korrelation zwischen der ersten und zweiten Messung sowohl für alloreaktive CD4 als auch CD8 T-Zellen zeigte (CD4 $p<0,0001$; $r=0,3019$; CD8 $p<0,0001$; $r=0,6128$). **(B)** Innerhalb eines Jahres (jede Analyse lag im Mittel $92,3\pm 35,5$ Tage auseinander) wurden drei Kontrollen und sieben Patienten (24 Paarkombinationen) fünf Mal auf das Vorhandensein alloreaktiver CD4 und CD8 T-Zellen erneut getestet. Auch hierbei wurde zu jeden Messzeitpunkt erneut Blutmaterial derselben Paarkombination erhalten. Alloreaktive Messungen derselben Paarkombinationen, die über fünf verschiedene Zeitpunkte erhoben wurden, sind durch Linien verbunden. Bei sich wiederholenden Messungen wurde der Variationskoeffizient (CV) einer einzelnen Messreihe ermittelt und aus allen CVs der mittlere CV mit seiner dazugehörigen Standardabweichung bestimmt (CD4: $0,0023\pm 0,0019$; CD8: $0,3975\pm 1,0849$; siehe auch 4.3.11). (Abbildung reproduziert aus Originalpublikation zu dieser Arbeit [108]).

5.1.5 Alloreaktive T-Zell Frequenzen treten häufiger bei Patienten mit Niereninsuffizienz als bei immungesunden Probanden auf

Im Folgenden wurden alloreaktive CD4 und CD8 T-Zell Frequenzen von gesunden Kontrollpersonen ($n=1044$ Messungen) mit niereninsuffizienten Patienten auf der Transplantationswarteliste ($n=838$ Messungen) verglichen. Hier zeigten Patienten signifikant

höhere alloreaktive T-Zell Frequenzen als Kontrollen (CD4: $p < 0,0001$; CD8: $p < 0,0001$; Abbildung 10A/B). Ebenso konnte ein höherer prozentualer Anteil alloreaktiver CD4 und CD8 T-Zellen über der Nachweisgrenze bei Patienten im Gegensatz zu Kontrollen beobachtet werden (CD4: 4,06% versus 1,53%, $p = 0,0008$; CD8: 14,80% versus 5,27%, $p < 0,0001$; Abbildung 10A und B).

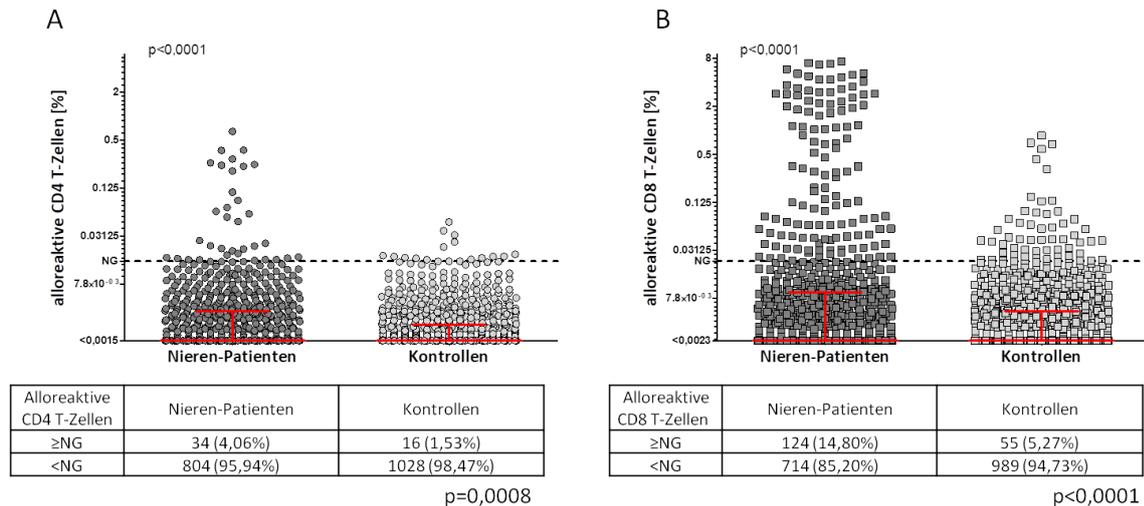


Abbildung 10: Patienten auf der Transplantationswarteliste für eine Niere weisen höhere alloreaktive CD4 und CD8 T-Zell Frequenzen auf als immungesunde Probanden. Bei Betrachtung alloreaktiver CD4 (A) und CD8 (B) T-Zellen der beiden verschiedenen Probandengruppen zeigten 838 stimulatorische Reaktionen von 84 Patienten auf der Transplantationswarteliste für eine Niere („Patienten“) eine ausgeprägtere zelluläre Alloreaktivität (CD4 $p < 0,0001$; CD8 $p < 0,0001$) im Gegensatz zu 1044 alloreaktiven Messungen von 193 immungesunden Probanden („Kontrollen“) gegen Third-Party Stimulatoren (die sich sowohl aus Kontrollen als auch aus Patienten zusammensetzten). Ebenso zeigten Patienten einen größeren Anteil alloreaktiver CD4 und CD8 T-Zellen über der Nachweisgrenze (NG) im Vergleich zu Kontrollen (CD4 $p = 0,0008$; CD8 $p < 0,0001$). Die Daten der alloreaktiven T-Zell Frequenzen sind dargestellt mittels Median mit interquartilen Range (IQR). Zur quantitativen Analyse alloreaktiver T-Zell Frequenzen der beiden Probandengruppen wurde der Mann-Whitney Test angewandt. Bei der qualitativen Analyse des Auftretens alloreaktiver T-Zellen über der NG wurde der Fishers Exact Test verwendet. Die gestrichelte Linie stellt die NG zum einen für alloreaktive CD4 (0,015%), zum anderen für alloreaktive CD8 T-Zellen (0,023%) dar. (Abbildung modifiziert und reproduziert aus Originalpublikation zu dieser Arbeit [108]).

Desweiteren wurde untersucht, inwieweit sich Kontrollen und Patienten quantitativ in der Verteilung alloreaktiver CD4 und CD8 T-Zell Frequenzen unterscheiden. Abbildung 11A und B zeigt die Verteilung alloreaktiver CD4 und CD8 T-Zell Frequenzen in derselben Stimulationsreaktion. Insbesondere bei Patienten gab es Stimulationsreaktionen mit einer hohen Frequenz alloreaktiver CD8 T-Zellen, bei denen keine alloreaktiven CD4 T-Zellen nachweisbar waren (Abbildung 11A). Zudem waren bei Patienten Stimulationsreaktionen vorhanden, bei denen sowohl CD4 als auch CD8 T-Zellen nachweisbar waren. Diese beiden

Reaktionsmuster fanden sich interessanterweise nicht bei gesunden Kontrollen (Abbildung 11B).

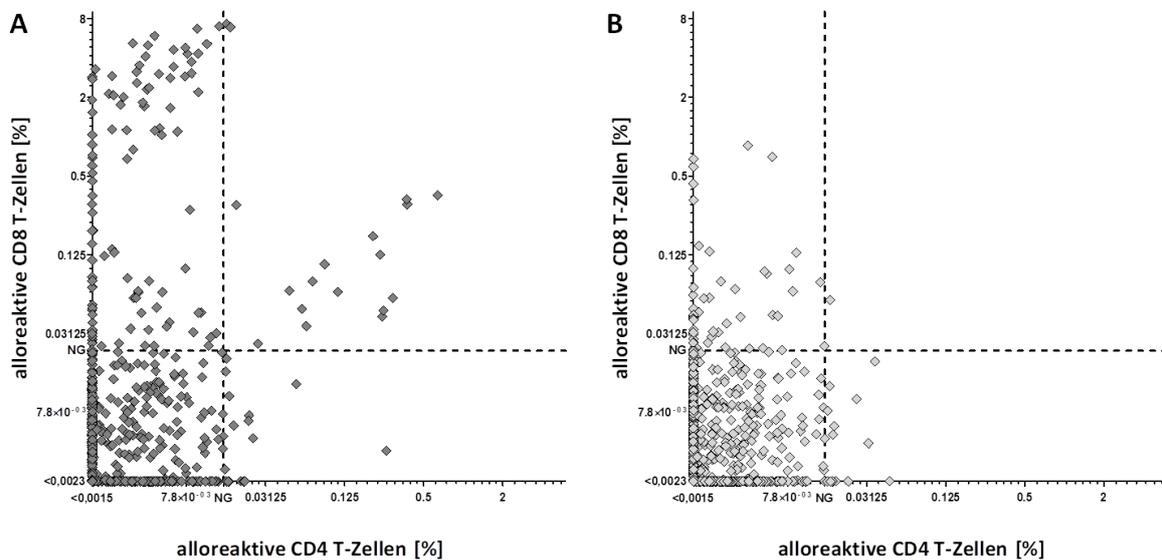


Abbildung 11: Quantitative Unterschiede in der Verteilung alloreaktiver CD4 und CD8 T-Zellen bei Patienten auf der Transplantationswarteliste für eine Niere und immungesunden Probanden. Zur Analyse der unterschiedlichen Verteilung alloreaktiver CD4 und CD8 T-Zellen wurde das gleiche Probandenkollektiv wie in Abbildung 10 verwendet. Die CD4 und CD8 T-Zellen derselben Stimulationsreaktion wurden jeweils gegeneinander bei Patienten (A) und Kontrollen (B) aufgetragen. Dabei zeigten einzig Messungen von Patienten (im Gegensatz zu Kontrollen) ein gleichzeitiges Auftreten von alloreaktiven CD4 und CD8 T-Zellen über der Nachweisgrenze, ebenso wie fast ausschließlich nur Messungen von Patienten sehr hohe ($\geq 0,23$) alloreaktive CD8 T-Zell Frequenzen aufwiesen. Die gestrichelten Linien stellen die NG zum einen für alloreaktive CD4 (0,015%), zum anderen für alloreaktive CD8 T-Zellen (0,023%) dar. NG, Nachweisgrenze. (Abbildung modifiziert und reproduziert aus Originalpublikation zu dieser Arbeit [108]).

Die 838 Messungen in Abbildung 10A und B wurden durch Stimulation von Blutproben von 84 Patienten mit Stimulatorzellen von mindestens zwei verschiedenen Third-Party Stimulatoren (Median 7 (IQR 8)) gewonnen. Um das alloreaktive Potential bei jedem einzelnen Patienten in Abhängigkeit eines potentiellen Spenders abschätzen zu können, wurde die Frequenz alloreaktiver T-Zellen gegen diese einzelnen Stimulatorzellen separat für jeden Patienten ermittelt und dargestellt (Abbildung 12). Hierbei zeigten 5 von 84 Patienten (5,95%) sehr hohe Frequenzen alloreaktiver CD8 T-Zellen gegen nahezu alle Stimulatoren. Demgegenüber wiesen 26 von 84 (30,95%) Patienten eine detektierbare CD8 Alloreaktivität gegen lediglich eine geringe Anzahl an Stimulatoren auf. In der letzten Gruppe von Patienten schließlich (53/84; 63,10%) war bei keiner der Messungen eine Reaktion gegen die gewählten Stimulatoren detektierbar (Abbildung 12).

Bei Betrachtung alloreaktiver CD4 T-Zellen zeigte ebenfalls die größte Gruppe an Patienten keine Alloreaktivität (70/84; 83,33%). Alloreaktive CD4 T-Zellen gegen lediglich eine geringe Anzahl von Stimulatoren waren bei 14 von 84 Patienten zu beobachten (16,67%). Demgegenüber war bei keinem Patient eine CD4 T-Zell Alloreaktivität gegen eine Mehrzahl der Stimulatoren feststellbar (0/84; 0%; Daten nicht gezeigt), so dass diese Beobachtung lediglich für alloreaktive CD8 T-Zellen zuzutreffen scheint.

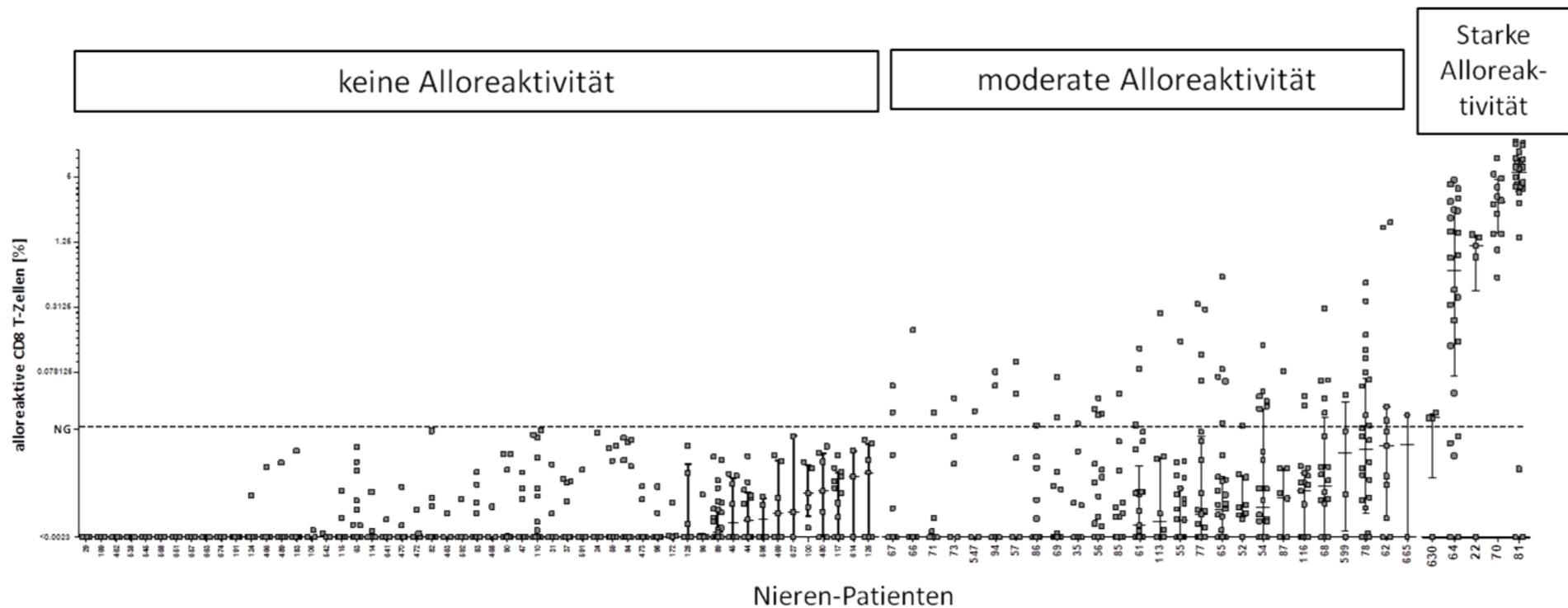


Abbildung 12: Interindividuelle Analyse alloreaktiver T-Zellen bei Patienten auf der Transplantationswarteliste für eine Niere. Die alloreaktiven CD8 T-Zell Frequenzen eines jeden Patienten auf der Transplantationswarteliste für eine Niere (n=84; jede Zahl auf der x-Achse entspricht einem Patient) wurden einzeln gegen mindestens zwei verschiedene Third-Party Stimulatoren (Median 7 (IQR 8)) erfasst. Insgesamt wurden 838 Messungen durchgeführt (siehe auch Abbildung 10). Es entstanden drei verschiedene Alloreaktivitäts-Gruppen bei Patienten. In der ersten Gruppe waren bei keinem Patienten alloreaktive CD8 T-Zellen über der NG gegen seine Third-Party Stimulatoren messbar („keine Alloreaktivität“). In der zweiten Gruppe zeigten Patienten eine CD8 T-Zell Alloreaktivität gegen einige Third-Party Stimulatoren (Median alloreaktiver CD8 T-Zellen lag unterhalb der NG; „Moderate Alloreaktivität“) und in der dritten Gruppe wiesen Patienten eine starke CD8 T-Zell Alloreaktivität (Median alloreaktiver CD8 T-Zellen eines jeden Patienten lag über der NG; „Starke Alloreaktivität“) gegen beinahe alle getesteten Third-Party Stimulatoren auf. Die Daten der alloreaktiven T-Zell Frequenzen sind dargestellt mittels Median mit interquartilen Range (IQR). Die gestrichelte Linie stellt die NG für alloreaktive CD8 T-Zellen (0,023%) dar. Die Zahlen der x-Achse repräsentieren das Kürzel des jeweiligen anonymisierten Patienten. NG, Nachweisgrenze. (Abbildung modifiziert und reproduziert aus Originalpublikation zu dieser Arbeit [108]).

5.1.6 Assoziation zwischen der Anzahl an HLA-Mismatchen und dem Auftreten alloreaktiver T-Zellen

Da die Anzahl an Mismatchen von HLA-Molekülen (HLA-MM) zwischen Spender und Empfänger mit einer Beeinträchtigung des Transplantat-Überlebens einhergeht [12, 110] wurden alloreaktive CD4 und CD8 T-Zell Frequenzen mit der Anzahl an HLA-A, -B und -DR-Mismatchen assoziiert (Abbildung 13). Hierfür wurden alle Stimulationsreaktionen herangezogen, für die eine HLA-Typisierung vorlag (1581 Messungen von 57 Kontrollen und 84 Patienten). Da nur wenige Messungen mit einer geringen Anzahl von 0, 1 oder 2 MM vorhanden waren, wurden diese Messungen in einer Gruppe mit 0-2 MM zusammengefasst. Es zeigte sich, dass der Anteil an Messungen mit alloreaktiven CD4 oder CD8 T-Zellen über der Nachweisgrenze in dieser Gruppe am geringsten war und in den Gruppen mit höherer Mismatch-Anzahl signifikant anstieg ($p=0,0271$; Abbildung 13A). Bei quantitativer Betrachtung der CD4 und CD8 T-Zell Frequenzen zeigten sich ebenfalls signifikant geringere alloreaktive CD4 und CD8 T-Zell Frequenzen bei Messungen mit 0-2 MM im Vergleich zu Messungen mit einer höheren Anzahl an Mismatchen (CD4 $p=0,0002$; CD8 $p=0,0054$; Abbildung 13B und C). Interessanterweise zeigten sich zwischen den Gruppen mit mehr als 3 MM keine wesentlichen Unterschiede in der Frequenz alloreaktiver CD4 und CD8 T-Zellen. Zusammenfassend lässt sich daher eine signifikante Assoziation alloreaktiver T-Zell Frequenzen mit HLA-MM nachweisen, wenngleich eine hohe Anzahl von HLA-MM auf individueller Ebene nicht eine Alloreaktivität vorhersagen kann.

Bei einer separaten Betrachtung der Assoziation von HLA-MM auf alloreaktive CD4 und CD8 T-Zellen bei Kontrollen und Patienten nach Niereninsuffizienz war bei Kontrollen ebenfalls ein deutlicher Zusammenhang zwischen der Frequenz alloreaktiver CD4 T-Zellen und CD8 T-Zellen und der Anzahl der HLA-MM zu beobachten (CD4: $p=0,0022$; 743 Messungen, Abbildung 14A), wenngleich dieser Zusammenhang für alloreaktive CD8 T-Zellen weniger stark ausgeprägt war ($p=0,0443$, Abbildung 14A). Auch qualitativ konnte ein signifikanter Zusammenhang zwischen dem Anteil an Messungen über der Nachweisgrenze mit einer ansteigenden HLA-A/-B/-DR-MM Anzahl festgestellt werden ($p=0,0101$; Daten nicht gezeigt).

Ähnliches gilt auch für Patienten mit Niereninsuffizienz, bei denen sowohl bei der Frequenz der CD4 T-Zellen als auch bei CD8 T-Zellen ein signifikanter Zusammenhang mit der Anzahl der HLA-MM bestand (CD4: $p=0,0481$; CD8: $p=0,0151$; 838 Messungen, Abbildung 14B).

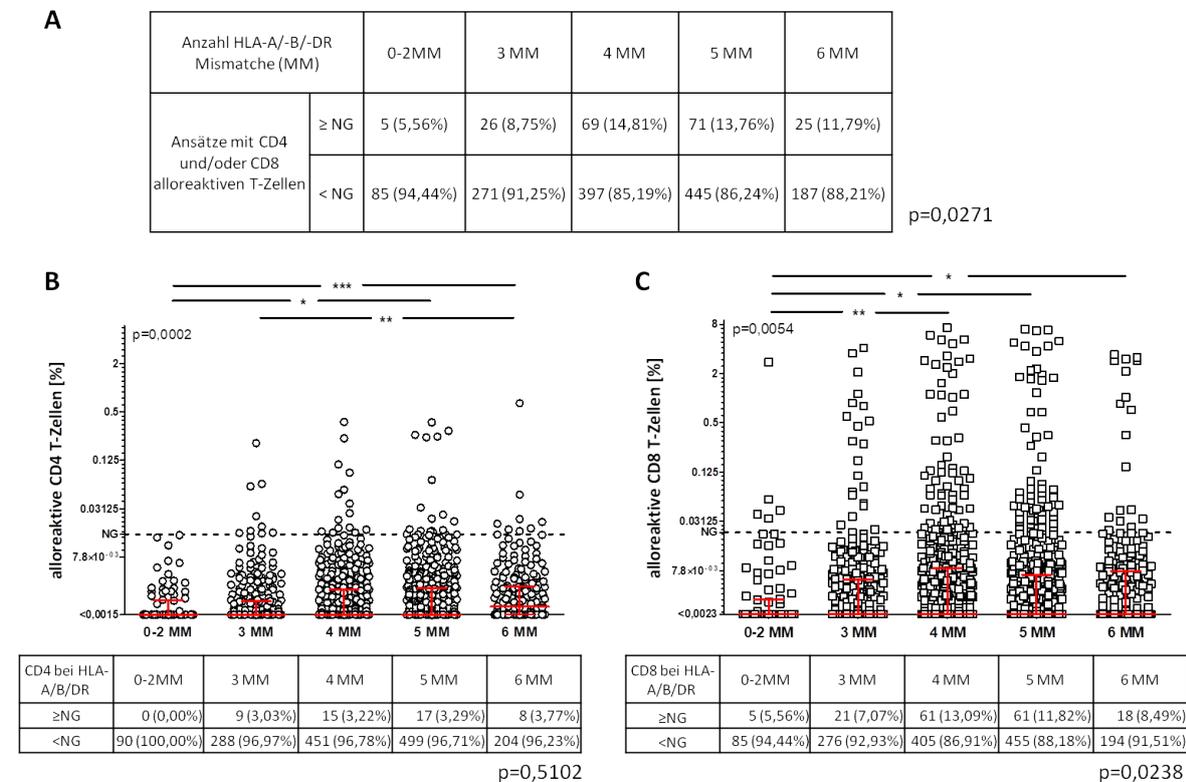


Abbildung 13: Zusammenhang alloreaktiver T-Zellen mit der Anzahl an HLA-A/-B/-DR Mismatches. Bei der Analyse von 1581 alloreaktiven CD4 und/oder CD8 T-Zell Messungen von 57 immungesunden Probanden und 84 Patienten der Transplantationswarteliste für eine Niere wurde der Zusammenhang mit der Anzahl an HLA-A/-B/-DR-Mismatches (MM) des Reaktanten gegen den Stimulator untersucht. Da nur wenige Messungen mit einer geringen Anzahl von 0, 1 oder 2 HLA-A/-B/-DR-MM vorhanden waren, wurden diese Messungen in einer Gruppe von 0-2 MM zusammengefasst. **(A)** Bei einer qualitativen Analyse konnte festgestellt werden, dass die geringste Anzahl alloreaktiver T-Zellen über der Nachweisgrenze (NG) bei Paarkombinationen mit einer geringen HLA-MM Anzahl vorhanden waren ($p=0,0271$). Bei der separaten quantitativen Analyse alloreaktiver CD4 und CD8 T-Zell Frequenzen im Zusammenhang mit der Anzahl an HLA-A/-B/-DR-MM waren sowohl bei CD4 **(B)** als auch bei CD8 **(C)** T-Zellen signifikant die niedrigsten alloreaktiven T-Zell Frequenzen bei einer geringen HLA-A/-B/-DR-MM Anzahl (CD4 $p=0,0002$; CD8 $p=0,0054$) nachweisbar. Jedoch war bei einer separaten qualitativen Analyse alloreaktiver CD4 und CD8 T-Zellen über der NG nur ein Zusammenhang mit steigender HLA-MM Anzahl bei alloreaktiven CD8 T-Zellen beobachtbar (CD4 $p=0,5102$; CD8 $p=0,0238$). Die gestrichelten Linien stellen die NG zum einen für alloreaktive CD4 (0,015%), zum anderen für alloreaktive CD8 T-Zellen (0,023%) dar. Zur qualitativen Analyse des Zusammenhangs der Anzahl alloreaktiver T-Zellen über der NG und der HLA-MM Anzahl wurde der Chi-Square Test verwendet. Bei der quantitativen Analyse sind die Daten mittels Median und interquartilen Range (IQR) dargestellt und es wurde der Kruskal-Wallis Test mit einem anschließenden Dunn's post Test über die einzelnen Gruppen bei aufgetretener Signifikanz herangezogen. NG, Nachweisgrenze; MM, Mismatch; HLA, Humanes Leukozyten Antigen; * $p<0,05$; ** $p<0,01$; *** $p<0,001$. (Abbildung modifiziert und reproduziert aus Originalpublikation zu dieser Arbeit [108]).

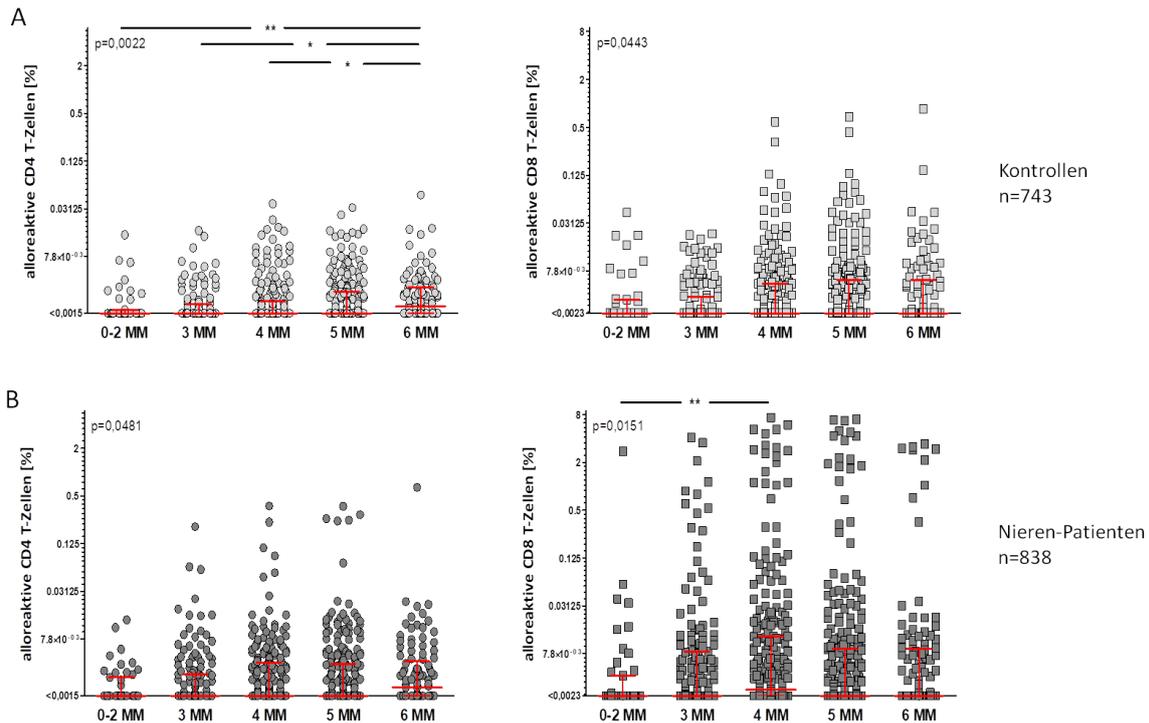


Abbildung 14: Das Auftreten alloreaktiver T-Zellen im Zusammenhang mit der Anzahl an HLA-A/-B/-DR-Mismatchen bei immungesunden Probanden und niereninsuffizienten Patienten. Bei separater Untersuchung des Zusammenhangs des Auftretens alloreaktiver CD4 und CD8 T-Zellen und der Anzahl an HLA-A/-B/-DR-Mismatchen (MM) bei immungesunden Probanden („Kontrollen“) und niereninsuffizienten Patienten („Patienten“) konnte bei 743 alloreaktiven CD4 T-Zell Stimulationen von 57 Kontrollen **(A)** ein signifikanter Anstieg in der T-Zell Frequenz mit steigender HLA-A/-B/-DR-MM Zahl beobachtet werden ($p=0,0022$). **(B)** Bei 838 alloreaktiven CD8 T-Zell Messungen von 84 Patienten konnte bei den alloreaktiven CD8 T-Zell Frequenzen ein signifikanter Anstieg zwischen der Anzahl von 0-2 MM hinzu 4 MM HLA-A/-B/-DR gezeigt werden ($p=0,0151$). Da nur wenige Messungen mit einer geringen Anzahl von 0, 1 oder 2 HLA-A/-B/-DR-MM vorhanden waren, wurden diese Messungen in einer Gruppe von 0-2 MM zusammengefasst. Alle Daten zeigen den Median mit interquartilen Range (IQR). Für die quantitative Analysen wurde der Kruskal-Wallis Test mit anschließenden Dunn’s post Test verwendet. HLA, Humanes Leukozyten Antigen; MM, Mismatch; * $p<0,05$; ** $p<0,01$; *** $p<0,001$.

5.1.7 Untersuchung weiterer Einflussfaktoren auf die Entwicklung einer zellulären Alloreaktivität

Abgesehen von der Anzahl der HLA-MM eines Reaktanten gegen Stimulatorzellen können auch andere Faktoren wie das Alter, das Geschlecht, die bisher verbrachte Zeit an der Dialyse, Panel-reaktive Antikörper (PRA), vorangegangene Transplantationen, Schwangerschaften und Bluttransfusionen oder der CMV-Infektionsstatus einen Einfluss auf die Entwicklung präformierter alloreaktiver T-Zellen haben. Hierzu wurde der Einfluss dieser Parameter bei Patienten mit einer moderaten bis starken CD8 T-Zell Alloreaktivität ($n=31$, Einteilung siehe Abbildung 12) im Vergleich zu Patienten ohne CD8 Alloreaktivität untersucht

(n=53, Tabelle 8). Dabei konnte für keinen der genannten Parameter ein signifikanter Einfluss festgestellt werden. Dies zeigt auch, dass eine zelluläre CD8 Alloreaktivität unabhängig von humoralen Komponenten wie dem PRA Nachweis aufzutreten scheint.

Tabelle 8: Parameter, die möglicherweise das Auftreten alloreaktiver CD8 T-Zellen beeinflussen können

	Keine Alloreaktivität n=53	Starke/Moderate Alloreaktivität n=31	p-Wert
Alter [Jahre] Mittelwert (±SD)	48,24±2,028	49,97±2,276	0,5868
Weibliches Geschlecht n (%)	18/53 (33,96%)	16/31 (51,61%)	0,1665
Dialysedauer [Jahre] Mittelwert (±SA)	3,160±0,3040	4,324±0,7997	0,1116
Vorausgegangene Transplantationen n (%)	6/53 (11,32%)	2/31 (6,45%)	0,7041
Bluttransfusionen* n (%)	16/31 (51,61%)	14/21 (66,67%)	0,3925
CMV seropositiv n(%)	32/52 (61,54%)	22/31 (70,97%)	0,4777
Panel reaktive Antikörper (aktuell) positiv; n (%)	5/52 (9,62%)	6/31 (19,35%)	0,3154
Panel reaktive Antikörper (maximal) positiv; n (%)	7/52 (13,46%)	7/31 (22,58%)	0,3659

Der unpaired t-Test wurde zur statistischen Analyse des Alters und der Dialysedauer eingesetzt, für alle weiteren Parameter wurde der Fishers exact Test verwendet.

SA, Standardabweichung; *berechnet auf alle Probanden bei denen diese Information bekannt war; Panel reaktive Antikörper waren positiv bei ≥5%.

5.2 Analyse alloreaktiver T-Zellen bei Patienten der Transplantationswartelisten für eine Leber oder Lunge

Im Weiteren wurden alloreaktive T-Zell Messungen auch bei Patienten auf der Transplantationswarteliste für eine Leber (41 Patienten, 160 Messungen) oder Lunge (36 Patienten, 170 Messungen) untersucht und mit der Verteilung der alloreaktiven T-Zell Frequenzen bei immungesunden Probanden und Patienten mit Niereninsuffizienz verglichen, die bereits in Abbildung 10 dargestellt waren (Abbildung 15).

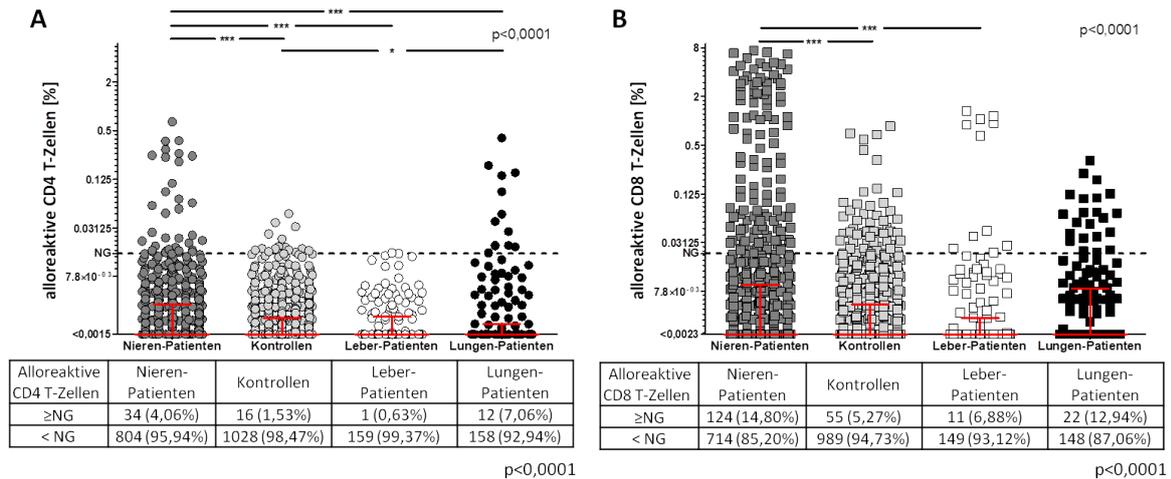


Abbildung 15: Alloreaktive T-Zellen bei Patienten auf der Transplantationswarteliste für eine Leber oder Lunge. Vergleich der alloreaktiven CD4 (A) und CD8 (B) T-Zellen zwischen Patienten auf der Transplantationswarteliste für eine Leber („Leber-Patient“; n=41) oder einer Lunge („Lungen-Patient“; n=36) mit gesunden Kontrollen und Patienten mit Niereninsuffizienz („Nieren-Patient“). Die Daten der letzten beiden Probandenkollektive wurden der besseren Vergleichbarkeit halber aus Abbildung 10 entnommen und hier noch einmal dargestellt. Jeder Leber-Patient wurde mindestens gegen einen Third-Party Stimulator (Median 3 (IQR 2)), der sowohl eine Kontrolle, als auch Leber-, Lungen- oder Nieren-Patient sein konnte, getestet. Somit wurden 160 alloreaktive T-Zell Messungen erhalten, wobei Leber-Patienten ein ähnliches alloreaktives T-Zell Profil wie Kontrollen, sowohl bei den alloreaktiven T-Zell Frequenzen als auch bei dem Anteil alloreaktiver T-Zellen über der Nachweisgrenze (NG) zeigten. Jeder Lungen-Patient wurde gegen mindestens zwei (Median 5 (IQR 3)) Third-Party Stimulatoren getestet, woraus 170 alloreaktive T-Zell Messungen resultierten. Alloreaktive Reaktionen von Lungen-Patienten wiesen einen ähnlichen Anteil alloreaktiver T-Zellen über der NG wie Nieren-Patienten auf, allerdings spiegelte sich dies nicht in der quantitativen Analyse alloreaktiver T-Zell Frequenzen wieder. Die Daten zeigen den Median mit interquartilen Range (IQR). Zur quantitativen Analyse alloreaktiver T-Zell Frequenzen in den vier Gruppen wurde ein Anova-Test mit anschließendem Dunn’s post Test angewandt. Bei der qualitativen Analyse des Auftretens alloreaktiver T-Zellen über der NG wurde der Chi Square Test verwendet. NG, Nachweisgrenze; * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.

Dabei war der Anteil von Messungen mit alloreaktiven CD4 und CD8 T-Zellen über der Nachweisgrenze bei Leber-Patienten gering und ähnlich wie bei immungesunden Probanden (Leber-Patienten versus Kontrollen: CD4 0,63% vs 1,53%; CD8 6,88% vs 5,27%; Abbildung 15). Im Gegensatz dazu scheint eine zelluläre Alloreaktivität über der Nachweisgrenze bei Lungen-Patienten annähernd so häufig wie bei Patienten mit Niereninsuffizienz aufzutreten. So zeigten 7,06% der Messungen von Lungen-Patienten alloreaktive CD4 T-Zellen und 12,94% alloreaktive CD8 T-Zellen über der Nachweisgrenze (Nieren-Patienten: CD4 4,06%; CD8 14,80%; Abbildung 15). Beim Vergleich der medianen Frequenzen alloreaktiver T-Zellen zwischen Nieren- und Lungen-Patienten waren alloreaktive CD4 T-Zell Frequenzen von Lungen-Patienten signifikant geringer als die der Nieren-Patienten ($p = 0,0009$).

Bei Messungen von Leber- (n=130 Messungen) und Lungen-Patienten (n=158 Messungen) zeigte sich im Vergleich zu immungesunden Probanden und Patienten mit Niereninsuffizienz (siehe Abbildung 14) kein signifikanter Zusammenhang zwischen der Anzahl an HLA-MM und der CD4 oder CD8 T-Zell Alloreaktivität (Leber-Patienten: CD4 $p=0,4576$; CD8 $p=0,1609$; Lungen-Patienten: CD4 $p=0,4404$; CD8 $p=0,2856$; Daten nicht gezeigt), was vermutlich auf die relativ geringe Fallzahl HLA-typisierter Probanden zurückzuführen ist, die für diese Analyse zur Verfügung stand.

5.3 Bestimmung alloreaktiver T-Zellen im klinischen Setting einer Transplantation

5.3.1 Anwendung von EDTA-Vollblut und Milzgewebe als Quelle für Stimulatorzellen

Bei Organspenden durch Verstorbene steht in der klinischen Routine kein Lithium-Heparin-Vollblut, sondern lediglich EDTA-Vollblut des Spenders zur Verfügung. Zudem wird dem Transplantationszentrum ein Milzgewebestück zur Durchführung der Crossmatch Analyse zugesandt. Daher wurde getestet, inwieweit die Bestimmung alloreaktiver T-Zellen eines Empfängers bei Verstorbenenspenden auch mit EDTA-Vollblut bzw. mit isolierten Milzzellen durchgeführt werden kann.

Hierzu wurde zunächst die CD4 und CD8 T-Zell Reaktivität von drei immungesunden Probanden auf das Superantigen SEB unter Verwendung zweier verschiedener Antikoagulanzen (Lithium-Heparin und EDTA) im Vollblut bei sonst identischen Lagerungsbedingungen untersucht. Das Blut, das aus der EDTA-Monovette stammte, zeigte erwartungsgemäß bei allen drei Kontrollen keine IFN- γ Produktion der CD4 und CD8 T-Zellen auf den polyklonalen Stimulus SEB, während Zellen aus Lithium-Heparin Blut reaktiv waren (Median CD4 T-Zellen 2,06% (IQR 2,61%); CD8 T-Zellen 3,04% (IQR 9,15%); Abbildung 16A). Nach Einführung zusätzlicher Waschschriffe vor der Stimulation mit PBS und mit Medium konnte im EDTA-Blut etwa 43% der aus LiHep-Blut gemessenen CD4 T-Zell Frequenzen nachgewiesen werden (gewaschenes EDTA 0,88% (IQR 1,23%); LiHep 2,06% (2,61%)). Bei den SEB-reaktiven CD8 T-Zellen waren im mit Waschschriffen behandelten EDTA-Blut 37,35% der im LiHep-Blut nachgewiesenen Zellen messbar (gewaschenes EDTA 1,13% (IQR 5,82%); LiHep 3,04% (IQR 9,15%); Abbildung 16B).

Im Folgenden wurde der Einfluss des EDTA-Blutmaterials auf den Nachweis alloreaktiver T-Zellen bei vier Kontroll-Paarkombinationen getestet. Dabei wurde unterschiedliches Blutmaterial (Lithium-Heparin, EDTA) nur bei den Stimulatoren verwendet, bei den Reaktanten blieb die Versuchsbedingung mit Lithium-Heparin-Blutmaterial immer gleich.

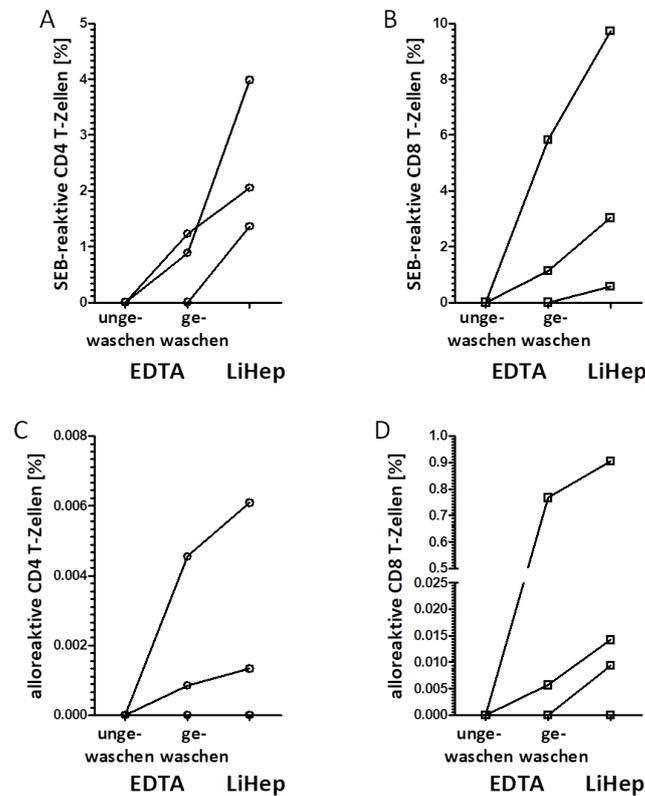


Abbildung 16: Anwendung von EDTA-Vollblut als weiteres Antikoagulant bei der alloreaktiven und SEB-reaktiven T-Zell Bestimmung ist nur bedingt geeignet. Zur Austestung, ob Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA) im Vollblut als Antikoagulant zum Nachweis alloreaktiver und SEB-reaktiver T-Zellen geeignet ist, wurde jeweils 450 µl heparinisertes Vollblut und 450 µl EDTA Vollblut von drei verschiedenen immungesunden Probanden zur Stimulation mit *Staphylococcus aureus* Enterotoxin B (SEB) verwendet. Ohne zusätzliche Waschschrte („ungewaschen“) konnten aufgrund der fehlenden Anlagerung der Zellen bei den EDTA Vollblut-Material keine reaktiven CD4 (A) und CD8 (B) T-Zellen nachgewiesen werden. Durch Mitführen zusätzlicher Waschschrte („gewaschen“) mit einmalig 14 ml PBS und 14 ml Medium wurde EDTA soweit aus dem Vollblut entfernt, dass es zu einem eingeschränkten SEB-Signal aller drei Kontrollen in Bezug auf das SEB-Signal bei hepariniserten Vollblut kommen konnte. Heparinisertes Vollblut musste keinen zusätzlichen Waschschrten unterzogen werden. Bei vier mitgeführten Paaren, wobei ein Paar eine gute CD8 Alloreaktivität in Vorversuchen zeigte, wurde eine alloreaktive Stimulation mit hepariniserten und mit EDTA-Vollblut durchgeführt, um alloreaktive CD4 (C) und CD8 (D) T-Zellen nachzuweisen. Dabei wurde bei dem Reaktanten immer heparinisertes Vollblut eingesetzt und bei dem Stimulator die unterschiedlichen Versuchsbedingungen („ungewaschen, gewaschen“) mit EDTA-Vollblut getestet. Das alloreaktive Paar zeigte dabei eine vorhandene CD8 Alloreaktivität im hepariniserten Vollblut und im EDTA Vollblut, das gewaschen wurde. Es war keine CD8 Alloreaktivität feststellbar, wenn das EDTA-Blut des Stimulators ungewaschen blieb (LiHep: 0,0142%; EDTA gewaschen: 0,0057%; EDTA ungewaschen: 0,0000%). Die Ergebnisse einer SEB-reaktiven Stimulation desselben Probanden bzw. die Ergebnisse einer alloreaktiven Stimulation derselben Probandenpaarung unter Verwendung unterschiedlicher Antikoagulanzen wurden durch Linien verbunden. EDTA, Ethylendiamintetraessigsäure; LiHep, Lithium-Heparin; SEB, *Staphylococcus aureus* Enterotoxin B.

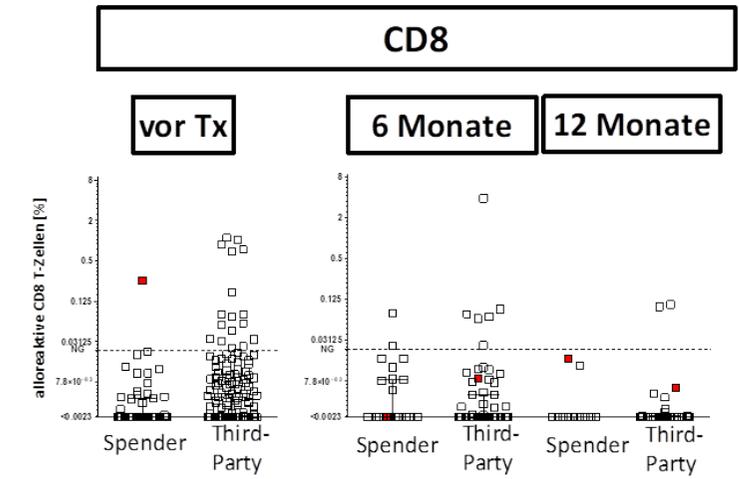
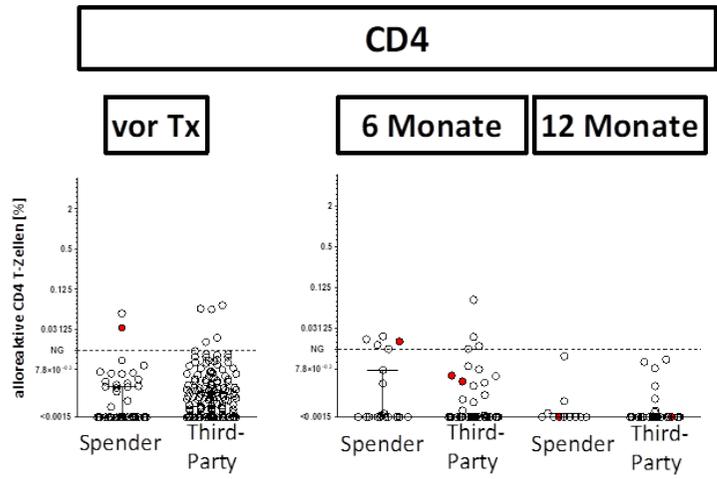
Der Anteil der alloreaktiven CD8 T-Zell Frequenzen bei Stimulationen aus gewaschenem EDTA-Blutmaterial im Gegensatz zu alloreaktiven Stimulationen aus gewaschenem Lithium-Heparin-Blutmaterial war um ein vierfaches geringer (CD8 LiHep: 0,0118% (IQR 0,6806%); EDTA: 0,0028% (IQR 0,5772%) →24,13% der Reaktivität bei LiHep; Abbildung 16D). Alloreaktive CD4 T-Zell Frequenzen zeigten nur noch eine 64,24% Reaktivität bei Stimulation mit gewaschenem EDTA-Vollblutmaterial gegenüber heparinisierem Blut (CD4 LiHep: 0,0007% (IQR 0,0049%); EDTA: 0,0004% (IQR 0,0036%) →64,24% der Reaktivität bei LiHep; Abbildung 16C). Diese Ergebnisse zeigen, dass EDTA-Vollblut lediglich nach Waschschrinen als Stimulormaterial verwendet werden kann. Lithium-Heparin-Blut war gegenüber der Verwendung von EDTA-Blut klar überlegen und sollte daher bevorzugt eingesetzt werden.

Aufgrund der Überlegenheit des Lithium-Heparinblutes wurde bei den im folgendem dargestellten weiteren Analysen bei Lebendspenden bevorzugt sowohl vom Empfänger als auch vom Spender Lithium-Heparinblut verwendet. Bei Verstorbenenspenden wurde beim Empfänger je nach Verfügbarkeit entweder Lithium-Heparinblut oder daraus isolierte PBMC verwendet. Da bei Verstorbenenspendern kein Lithium-Heparinblut, sondern lediglich EDTA Blut oder Milz zur Verfügung stand, wurden zur Gewinnung von Stimulatorzellen des Verstorbenenspenders auf gewaschenes EDTA Blut bzw. auf mononukleäre Zellen der Milz (MMC) zurückgegriffen, die aufgereinigt und zusammen mit PBMC des Empfängers nach demselben Testprinzip in RPMI Medium stimuliert wurden.

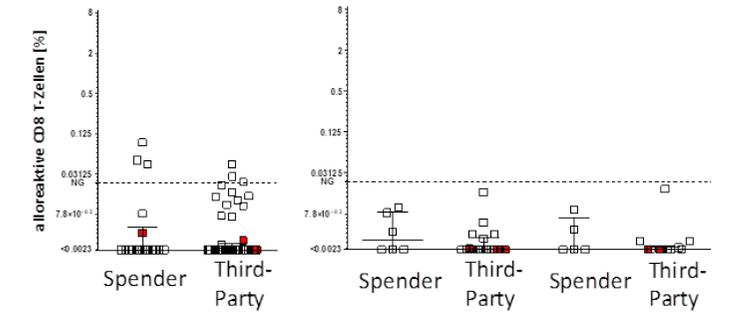
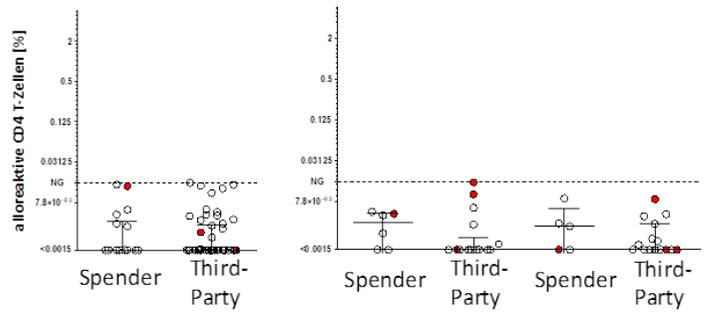
5.3.2 Analyse alloreaktiver T-Zellen vor und im Verlauf nach Transplantation

Um die Stabilität einer Alloreaktion nach Transplantation bzw. die *de novo* Induktion alloreaktiver T-Zellen zu analysieren, wurden im Querschnitt Messungen sowohl vor als auch 6 und/oder 12 Monate nach Transplantation durchgeführt. Dies erfolgte unter Verwendung von heparinisierem Vollblut der Empfänger in Kombination mit dem jeweils verfügbaren Material des Spenders (Lithium-Heparinblut oder EDTA-Blut vor Transplantation, eingefrorene PBMC oder MMC nach Transplantation). Zudem wurde jeweils eine Stimulation gegen mindestens drei gesunde Kontrollen als Third-Party Stimulatoren durchgeführt.

Nieren-Tx



Leber-Tx



Lungen-Tx

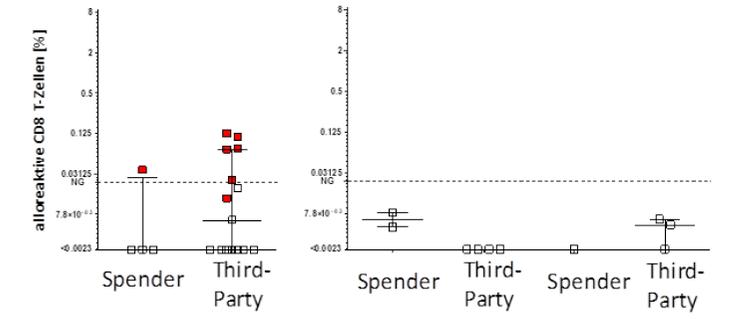
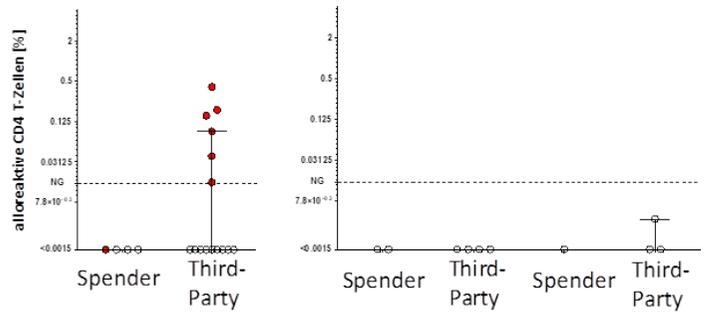


Abbildung 17: Analyse alloreaktiver T-Zellen vor und im Verlauf nach Transplantation. Im Zeitraum zwischen 05/2011 und 12/2015 wurden am Universitätsklinikum Homburg 77 Transplantationen (28 Nieren-, 18 Leber- und 4 Lungen-Verstorbenenspenden und 27 Nieren-Lebendspenden) auf präformierte alloreaktive T-Zellen im Vollblutverfahren unmittelbar vor Transplantation untersucht. Jeder Transplantat-Empfänger wurde gegen seinen Organ-Spender („Spender“) und gegen 3 (IQR 1,5) Third-Party Stimulatoren („Third-Party“), bei denen es sich hauptsächlich um immungesunde Probanden, aber auch um Patienten auf der Transplantationswarteliste für eine Niere, Leber oder Lunge handelte, auf alloreaktive CD4 und CD8 T-Zellen untersucht. Da bei Verstorbenenspenden kein Lithium-Heparinblut des Spenders zur Verfügung stand, wurde vom Spender EDTA-Vollblut kombiniert mit heparinisiertem Vollblut des Empfängers. Etwa sechs und zwölf Monate nach Transplantation (im Mittel $226,62 \pm 38,20$ Tage (Niere 190,35 d; Leber 223,00 d; Lunge 266,50 d) und $394,18 \pm 39,09$ Tage (Niere 401,33 d; Leber 429,20 d; Lunge 352,00 d)) wurde erneut von 34 Transplantat-Empfängern (17 Nieren-, 7 Leber- und 2 Lungen-Verstorbenenspenden und 8 Nieren-Lebendspenden) heparinisiertes Vollblut angefordert und dieses mit dem jeweils verfügbaren Material des Spenders, das unmittelbar vor Transplantation eingefroren wurde (PBMCs oder MMCs), kombiniert und somit alloreaktive T-Zellen stimuliert. Zusätzlich wurde zu den Messungen nach Transplantation drei Third-Party Stimulatoren (immungesunden Probanden) mitgeführt, deren Zellmaterial aus eingefrorenen PBMCs bestand. Es lagen nicht alle Messzeitpunkte bei jeden Reaktanten vor, was in der unterschiedlichen Anzahl der Stimulationen resultiert (Anzahl der Messungen vor Transplantation: 120 Nieren-, 72 Leber- und 19 Lungen-Verstorbenenspenden und 166 Nieren-Lebendspenden Stimulationen; Anzahl der Messungen sechs Monate nach Transplantation: 68 Nieren-, 24 Leber- und 8 Lungen-Verstorbenenspenden und 24 Nieren-Lebendspenden Stimulationen; Anzahl der Messungen zwölf Monate nach Transplantation: 20 Nieren-, 20 Leber- und 4 Lungen-Verstorbenenspenden und 24 Nieren-Lebendspenden Stimulationen). Vor Transplantation zeigten zwei der Nieren-Empfänger eine CD4 Alloreaktion, wobei einer eine zusätzliche CD8 Alloreaktion aufwies. Sechs Monate nach der Transplantation wiesen fünf der Nieren-Empfänger alloreaktive CD4 T-Zellen und zwei alloreaktive CD8 T-Zellen gegen ihren Spender auf. Bei zwei der fünf Nieren-Empfänger mit einer CD4 Alloreaktion und bei einem der zwei Nieren-Empfänger mit einer CD8 Alloreaktion konnte bereits vor Transplantation präformierte alloreaktive T-Zellen nachgewiesen werden. Zwölf Monate nach Transplantation konnte lediglich eine Alloreaktivität gegen Third-Party Stimulatoren beschrieben werden, jedoch nicht gegen die Spender. Bei den Leber-Empfängern zeigten drei präformierte alloreaktive CD8 T-Zellen ohne zusätzliche CD4 Reaktivität gegen ihre Spender. Nach Transplantation konnte bei einem der drei alloreaktiven Empfänger-Spenderpaarungen keine Alloreaktivität mehr festgestellt werden. Die beiden anderen Paarungen mit einer vorangegangenen präformierten Alloreaktion konnten aus Mangel an Patientenmaterial nach Transplantation nicht wiederholt werden. Einer der Lungen-Empfänger zeigte vor Transplantation alloreaktive CD8 T-Zellen gegen seinen Spender und zusätzlich alloreaktive CD4 und CD8 T-Zellen gegen seine Third-Party Stimulatoren (rot markiert). Die weiteren Lungen-Empfänger zeigten keine Alloreaktion sowohl vor als auch nach Transplantation. Messungen von drei transplantierten Patienten mit einem interessanten klinischen Verlauf sind rot markiert und werden in den Fallbeispielen wieder aufgegriffen. Die Daten der alloreaktiven T-Zell Frequenzen sind mittels Median mit interquartilen Range (IQR) dargestellt. Die gestrichelte Linie stellt die jeweilige Nachweisgrenze (NG) alloreaktiver T-Zellen dar (CD4: 0,015%; CD8: 0,023%). d, Tag; NG, Nachweisgrenze; Tx, Transplantation.

Die zelluläre Alloreaktivität wurde unter diesen experimentellen Bedingungen bei Empfängern einer Lebend- und Verstorbemenspende (55 Nieren-, 18 Leber- und 4 Lungenspenden vor Transplantation, 25 Nieren-, 7 Leber- und 2 Lungenspenden nach Transplantation; Einteilung siehe auch Abbildung 5) untersucht (Abbildung 17).

Vor Transplantation zeigten zwei Nieren-Empfänger eine CD4 Alloreaktion, wovon ein Patient eine zusätzliche CD8 Alloreaktion aufwies. Drei der Leber-Empfänger und einer der Lungen-Empfänger zeigten eine CD8 Alloreaktion ohne zusätzliche CD4 Alloreaktivität (Abbildung 17). Sechs Monate nach Transplantation zeigten fünf der Nierentransplantierten Patienten alloreaktive CD4 T-Zellen und zwei Patienten alloreaktive CD8 T-Zellen (Abbildung 17). Unter den sieben Leber- oder zwei Lungentransplantat-Empfängern war nach Transplantation keine zelluläre Alloreaktivität gegen die jeweiligen Organspender detektierbar, wenngleich zwei dieser Patienten vor Transplantation eine präformierte Reaktivität aufwiesen (Abbildung 17). Zwölf Monate nach Transplantation konnten alloreaktive T-Zellen bei keinem Empfänger mehr detektiert werden. Zwei der fünf Nieren-Empfänger mit einer CD4 Alloreaktivität und einer der zwei Nieren-Empfänger mit einer CD8 Alloreaktivität wiesen bereits vor Transplantation eine präformierte Alloreaktivität auf, so dass nicht sicher nachgewiesen werden kann, ob diese *de novo* induziert wurde.

5.3.3 Fallbeispiele zur Rolle alloreaktiver T-Zellen für die Entwicklung von Abstoßungsepisoden nach Transplantation

Ein Teil der transplantierten Patienten (in Abbildung 17 rot markiert) zeigte eine präformierte Alloreaktivität mit einem interessanten klinischen Verlauf. Diese Patienten werden im Folgenden detaillierter beschrieben.

5.3.3.1 Fallbeispiel #1: Patient nach Lungentransplantation

Bei den Lungentransplantierten zeigte einer der vier Lungen-Empfänger eine CD8 Alloreaktivität über der Nachweisgrenze gegen seinen Spender vor Transplantation (Abbildung 17, rot markiert). Dieser Patient erlitt einen Monat nach Transplantation eine erste subakute Abstoßungsepisode, während die drei anderen Patienten keine Abstoßungsreaktion zeigten (Tabelle 4). Dieser 60-jährige männliche Patient mit idiopathischer Lungenfibrose mit einer gemischtzelligen neutrophilen-eosinophilen

lymphozytären Alveolitis befand sich auf der Transplantationswarteliste und erhielt ein Organangebot für eine Lunge (Verstorbenenenspende). Der Empfänger zeigte eine starke präformierte CD8 Alloreaktivität (0,0357% CD8 T-Zellen) im Vollblutverfahren gegen seinen Spender. Zusätzlich wies er eine präformierte CD8 Alloreaktivität gegen fünf der sechs mitgeführten Third-Party Stimulatoren (immungesunde Probanden; Abbildung 18A) unmittelbar vor Transplantation auf (Abbildung 17, rot markiert). Alloreaktive CD4 T-Zellen gegen seinen Spender waren nicht nachweisbar, jedoch gegen alle sechs mitgeführten Third-Party Stimulatoren (Abbildung 18A).

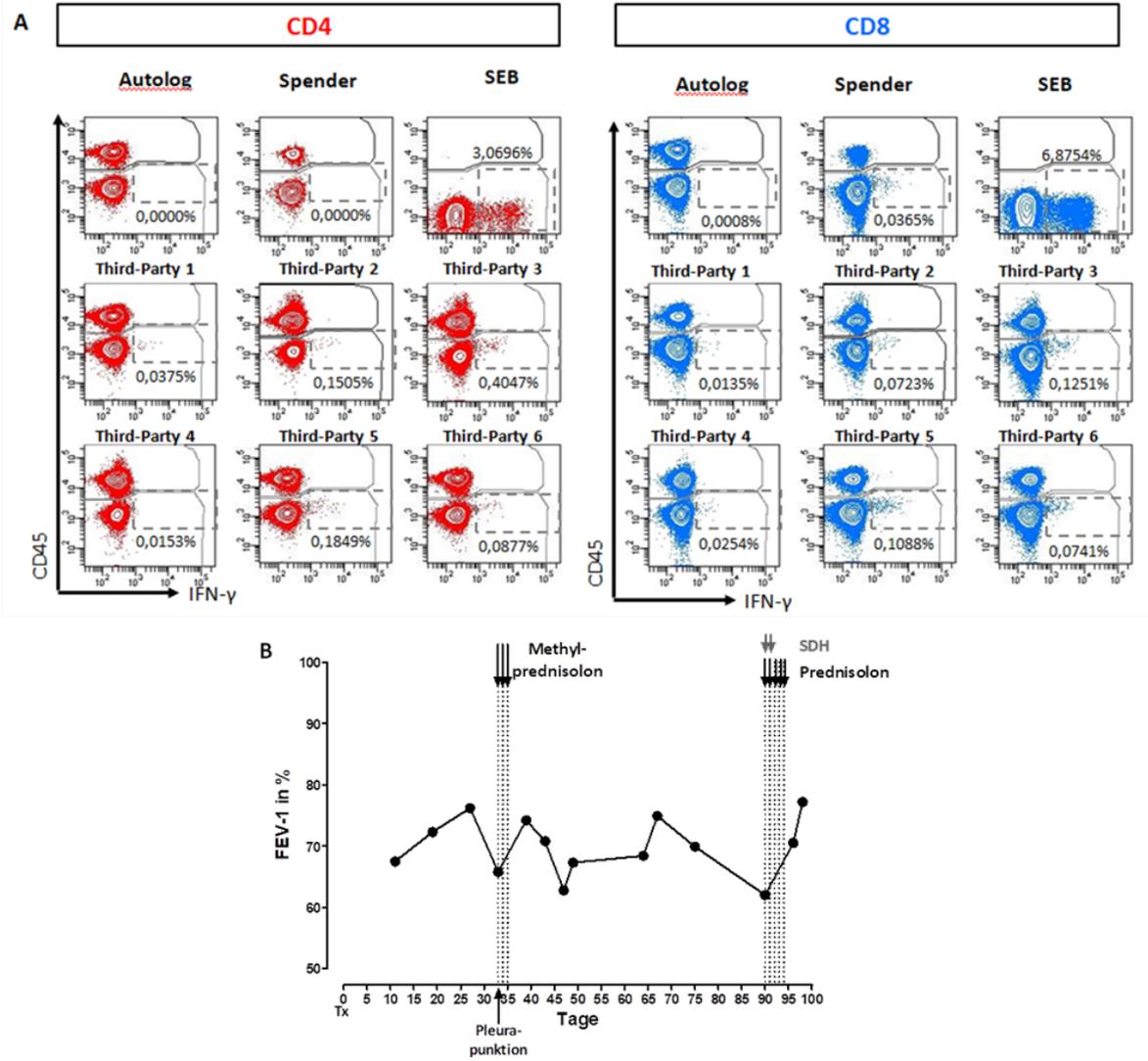


Abbildung 18: Nachweis alloreaktiver T-Zellen eines Patienten vor Lungentransplantation und klinischer Verlauf nach Transplantation. A) Es sind Dotplots der durchflusszytometrischen Analyse zum Nachweis alloreaktiver T-Zellen eines Patienten auf der Transplantationswarteliste für eine Lunge dargestellt. Der Patient (CD45 negative Zellpopulation) wurde gegen (CD45 positive Zellpopulation) seine eigenen Zellen („Autolog“), gegen die Zellen seines Organspenders („Spender“) und gegen die Zellen von sechs immungesunden

Probanden („Third-Party #1-6“) auf alloreaktive CD4 und CD8 T-Zellen, definiert durch die Expression von CD69 und der Induktion von IFN- γ , untersucht. Der Patient zeigte eine CD8 Alloreaktivität ohne zusätzliche CD4 Alloreaktivität gegen seinen Organspender. Zudem zeigte er eine CD4 Alloreaktivität gegen alle sechs Third-Party Stimulatoren und eine CD8 Alloreaktivität gegen fünf der sechs Third-Party Stimulatoren. Zusätzlich wurde eine Positivkontrolle mittels der Stimulation der Patientenzellen mit *Staphylococcus aureus* Enterotoxin B (SEB) mitgeführt. Im gestrichelten Rechteck des jeweiligen Dotplots ist der prozentuale Anteil alloreaktiver T-Zellen dargestellt. **B)** Die ersten 98 Tage eines 60-jährigen männlichen Patienten nach einer Lungentransplantation (Tx) sind im Verlauf mittels der Einsekundenkapazität (FEV-1 forced expiratory volume in 1 second) und im Zusammenhang mit seinen klinischen Ereignissen dargestellt. Der Lungenfunktionswert nahm von Tag 27 auf Tag 33 von 76,2% auf 65,8% des Sollwertes ab. Da sich an Tag 33 sonographisch 250 ml Pleuraerguß im linken Lungenflügel zeigte, wurde eine Pleurapunktion mit nachweislich lymphozytären Exsudat durchgeführt und eine fünftägige Methylprednisolon-Stoßtherapie (250mg/5d; große schwarze Pfeile) begonnen. Unter dieser Therapie verbesserte sich der subjektive und lungenfunktionelle Zustand des Patienten, sodass an Tag 39 wieder 74,2 % des Lungenfunktion-Sollwertes erreicht wurde. An Tag 90 fand ein erneuter Abfall des Lungenfunktionswertes statt (62,0% des Sollwertes), sodass erneut mit einer Abstoßungstherapie unter Prednisolon (50mg/5d; mittlere schwarzen Pfeile) und SDH (250mg/2d; kleine schwarzen Pfeile) begonnen wurde, woraufhin sich eine erneute Besserung der Lungenfunktion zeigte (Tag 96: 70,5% des Sollwertes; Tag 98: 77,2% des Sollwertes). SDH, Solu-Decortin H; Tx, Transplantation.

Der Patient erhielt einen linken Lungenflügel und die Transplantation gestaltete sich komplikationslos. Die Lungenfunktion nahm nach Transplantation zu (Einsekundenkapazität, *forced expiratory volume in 1 second*, FEV-1) von 67,5% an Tag 11 auf 76,2% an Tag 27 nach Transplantation). Bei einer laborchemischen Infektkonstellation und akutem Nierenversagen wurde der Patient 32 Tage nach der Lungentransplantation erneut stationär aufgenommen. Der Lungenfunktionswert (FEV-1) nahm an Tag 33 auf 65,8% des Sollwertes ab. Eine Lungenarterienembolie und eine Pathologie im Bereich der linken Lungenvene wurden ausgeschlossen. Sonographisch zeigten sich etwa 250 ml Pleuraerguß am linken Lungenflügel, was den Verdacht auf eine subakute Abstoßungsreaktion hervorrief. Eine diagnostische Pleurapunktion wurde durchgeführt mit einem nachweislichen lymphozytären Exsudat (70% Lymphozyten). Unter einer 3-tägigen systemischen Abstoßungstherapie mit 250 mg Methylprednisolon/Tag kam es zur subjektiven und lungenfunktionellen Besserung seines Zustandes (Abbildung 18B). Der Lungenfunktionswert (FEV-1) lag 39 Tage nach Transplantation wieder bei 74,2% des Sollwertes. 90 Tage nach Transplantation kam es zur erneuten Lungenfunktionsverschlechterung, die bei Verdacht auf erneute Abstoßung mit 50 mg Prednisolon über 5 Tage und mit 250 mg Solu-Decortin H (Glucocorticoid) über 2 Tage therapiert wurde. Daraufhin kam es erneut zu einer Besserung der Lungenfunktion (Abbildung 18B). Wenngleich ein Kausalzusammenhang nicht direkt belegt werden kann, könnte die präformierte Alloreaktivität des Empfängers gegen den Spender ursächlich an der Entwicklung der zellulären Abstoßungsreaktion beteiligt gewesen sein. Bei erneuter Analyse

alloreaktiver T-Zellen 168 Tage nach Transplantation waren keine alloreaktiven CD4 oder CD8 T-Zellen des Empfängers gegen eingefrorene MMCs des Spenders detektierbar (Daten nicht gezeigt).

5.3.3.2 Fallbeispiel #2: Patient nach Lebertransplantation

Unter den 18 Lebertransplantierten Patienten zeigten drei eine CD8 Alloreaktivität gegen ihre Spender im Vollblutverfahren. Einer dieser Leberempfänger verstarb an einem Multiorganversagen bei einer Sepsis innerhalb des ersten Jahres nach Transplantation, die anderen beiden Empfänger zeigten keine Abstoßungsepisoden (Tabelle 3). Unter den Patienten ohne alloreaktive T-Zellen im Vollblutverfahren zeigten vier Patienten eine zelluläre Abstoßungsreaktion. Bei einem dieser vier Lebertransplantierten konnte mittels der PBMC-Methode sowohl eine CD4 als auch CD8 T-Zell Alloreaktivität gegen seinen Organspender beobachtet werden. Dieser 51-jährige Leberempfänger mit Leberzirrhose bei einer Hepatitis C Virus (HCV) Infektion erhielt ein Organangebot für eine Leber eines 52-jährigen, männlichen Organspenders (Verstorbenenenspende). Der Patient zeigte sowohl eine präformierte CD4 (0,40145%) als auch CD8 (0,09492%) T-Zell Alloreaktivität gegen den Spender (Verwendung von MMC der Milz als Stimulatorzellen, Abbildung 19A). Eine präformierte Alloreaktivität gegen drei mitgeführte Third-Party Stimulatoren (immungesunde Probanden) war nicht detektierbar (Abbildung 19A). Neben der Verwendung von MMC als Stimulatorzellen wurde auch eine Stimulation mit Spenderzellen aus EDTA-Vollblut durchgeführt. Dort konnten jedoch keine alloreaktiven T-Zellen nachgewiesen werden, was zum einen an der Verwendung von EDTA-Vollblutmaterial per se und zum anderen an der Tatsache liegen könnte, dass das Vollblut ausnahmsweise erst nach ~48 h für Forschungszwecke zur Verfügung stand.

28 Tage nach Transplantation lag ein Verdacht auf eine milde Rejektion bei einer HCV-Reaktivierung und gleichzeitiger CMV-Primärinfektion vor. Daher wurde eine perkutane Leberbiopsie durchgeführt. In dieser ließ sich eine leichtgradige zelluläre Rejektion (Rejektions-Aktivitäts-Index, RAI-Score von 4) nachweisen. Daraufhin wurde von Tag 31-33 nach Transplantation mit einer ersten Methylprednisolonstoßtherapie begonnen und von Tag 35-37 wiederholt (je 500 mg/Tag; Abbildung 19B). Zu diesem Zeitpunkt lagen erhöhte Transaminasewerte von etwa 900 U/l vor. Eine erneute perkutane Leberbiopsie wurde

40 Tage nach der Transplantation durchgeführt. In dieser zeigte sich eine mittelgradig zelluläre Rejektion (RAI-Score 7). Daher wurde eine Behandlung mit 200 mg Antithyozytenglobulin (ATG) 42 bis 46 Tage nach Transplantation durchgeführt. Unter dieser Therapie waren die Transaminasen ((ALAT (Alanin-Aminotransferase)) von 813 U/l auf 264 U/l an Tag 47 (einen Tag nach letzter ATG-Gabe); Abbildung 19B) rückläufig. Dieser Wert fiel bis 150 Tage nach Transplantation weiterhin bis auf ein Minimum von 46 U/l ab. Bei diesem Patienten könnte die präformierte zelluläre Alloreaktion ebenfalls die Abstoßung nach Transplantationen vermittelt haben.

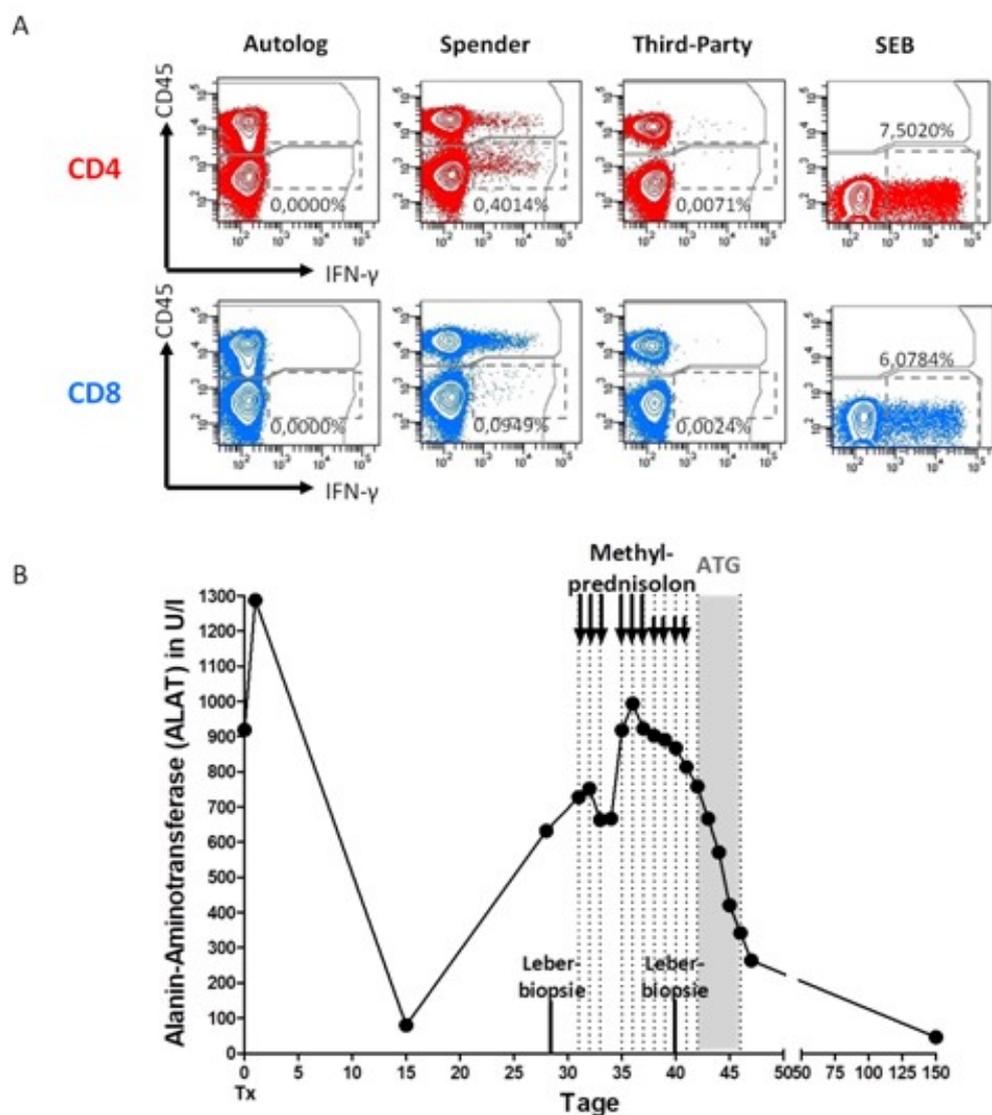


Abbildung 19: Nachweis alloreaktiver T-Zellen eines Patienten vor Lebertransplantation und klinischer Verlauf nach Transplantation. (A) Exemplarische Dotplots der durchflusszytometrischen Analyse zum Nachweis alloreaktiver T-Zellen getestet mittels der PBMC-Methode eines Patienten auf der Transplantationswarteliste für eine Leber. Der Patient (CD45 negative Zellpopulation) wurde gegen (CD45 positive Zellpopulation) seine

eigenen Zellen („Autolog“), gegen die Zellen seines Organspenders („Spender“) und gegen die Zellen von drei immungesunden Probanden („Third-Party“; hier eine der drei Messungen exemplarisch im Dotplot gezeigt) auf alloreaktive CD4 und CD8 T-Zellen, definiert durch die Expression von CD69 und der Induktion von IFN- γ , untersucht. Der Patient zeigte eine CD4 und CD8 Alloreaktivität gegen seinen Organspender (CD4 0,4014%; CD8 0,0949%), jedoch nicht gegen seine drei mitgeführten Third-Party Stimulatoren. Interessanterweise zeigte aber auch der Organspender (CD45 positive Zellpopulation) eine starke Alloreaktion gegen den Patienten (CD4 0,2811%; CD8 2,3282%). Zusätzlich wurde eine Positivkontrolle mittels der Stimulation der Patientenzellen mit *Staphylococcus aureus* Enterotoxin B (SEB) mitgeführt. Im gestrichelten Rechteck des jeweiligen Dotplots ist der prozentuale Anteil alloreaktiver T-Zellen dargestellt. **(B)** Die ersten 150 Tage eines 51-jährigen Patienten nach seiner Lebertransplantation sind im Zusammenhang mit klinischen Ereignissen und dem Parameter Alanin-Aminotransferase (ALAT in U/l) dargestellt. 28 Tage nach Transplantation lag ein Verdacht auf eine milde Rejektion bei einer HCV-Reaktivierung und gleichzeitiger CMV-Primärinfektion vor, die sich mittels einer durchgeführten perkutanen Leberbiopsie als eine leichtgradige zelluläre Rejektion (Rejektions-Aktivitäts-Index RAI-Score: 4) bestätigte. Eine erste Behandlung mittels einer Methylprednisolonstoßtherapie (500 mg/Tag; große schwarze Pfeile) wurde 31-33 Tage nach Transplantation begonnen, gefolgt von einer weiteren zwischen Tag 35-37 (500 mg/Tag; große schwarze Pfeile), die langsam ausschleichend vier weitere Tage verabreicht wurde (kleine schwarze Pfeile). In diesem Therapie-Zeitraum sanken die erhöhten Transaminasewerte von etwa 900 U/l wieder ab. Eine zweite perkutane Leberbiopsie unter ausklingender Abstoßungstherapie zeigte 40 Tage nach Transplantation eine mittelgradige zelluläre Rejektion (RAI-Score 7). Aufgrund dieses Ergebnisses wurde 42 bis 46 Tage nach Transplantation eine Behandlung mit Antithymozytenglobulin (ATG, 200 mg/Tag; grauer Bereich) durchgeführt, wobei die Transaminasewerte von 813 U/l auf 264 U/l (einen Tag nach Therapie) absanken und 150 Tage nach Transplantation ein Minimum von 46 U/l erreichten.

5.3.3.3 Fallbeispiel #3: Patientin nach Nierentransplantation

55 Patienten wurden vor ihrer Nierentransplantation getestet. Unter den Patienten ohne alloreaktive T-Zellen zeigten zwei eine humorale und keiner eine zelluläre Abstoßungsreaktion (Tabelle 2). Zwei Patienten zeigten eine präformierte CD4 Alloreaktion, wobei einer der beiden Nierenempfänger zusätzlich eine CD8 Alloreaktivität gegen seinen Spender aufwies. Der Nierenempfänger, der nur eine CD4 Alloreaktivität gegen seinen Organspender aufwies, zeigte eine subakute humorale Abstoßungsreaktion, die am ehesten durch eine Medikamentenincompliance bedingt war (Tabelle 2). Bei der Patientin, die sowohl eine CD4 als auch CD8 Alloreaktivität aufwies, kam es zu einer zellulären Abstoßungsreaktion. Diese 76-jährige Patientin mit terminaler Niereninsuffizienz auf dem Boden einer p-ANCA positiven Glomerulonephritis erhielt ein Organangebot eines 67 Jahre alten Organspenders (Verstorbenenenspende). Die Patientin zeigte eine starke präformierte CD8 (0,2656%) und zusätzlich eine CD4 T-Zell Alloreaktivität (0,0435%) gegen ihren Spender im Vollblutverfahren (Abbildung 17; rot markiert Punkte und Abbildung 20A). Demgegenüber zeigte die Patientin keine CD4 oder CD8 Alloreaktivität gegen die drei Third-Party Stimulatoren.

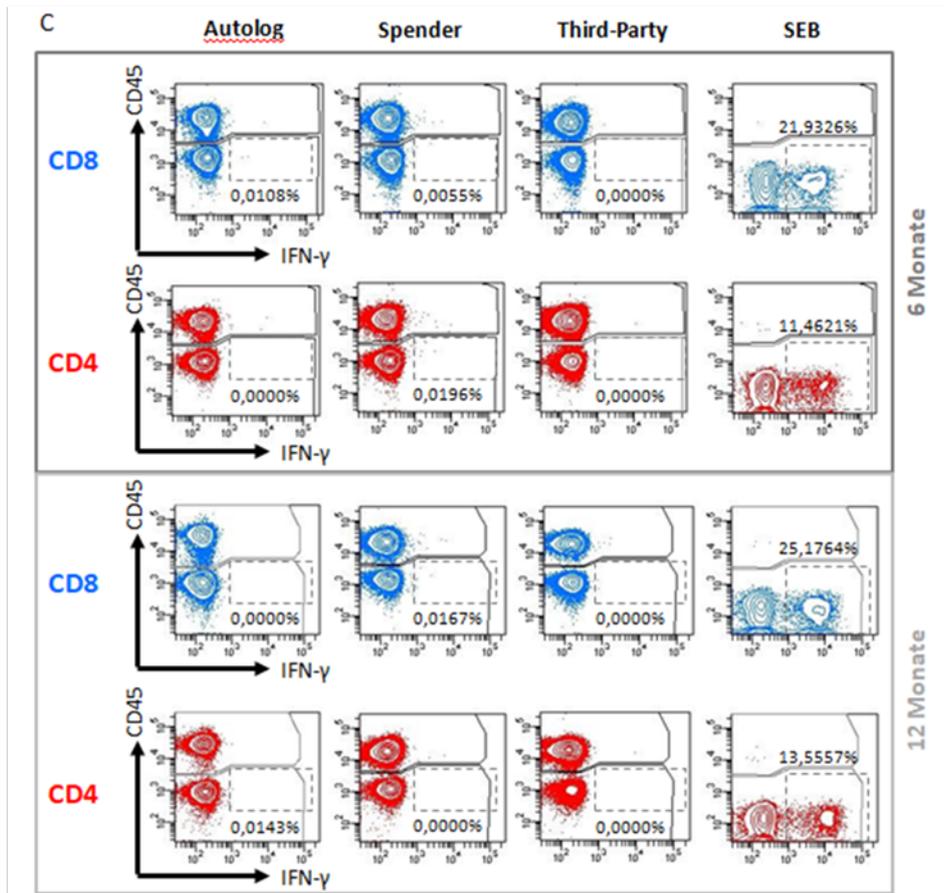
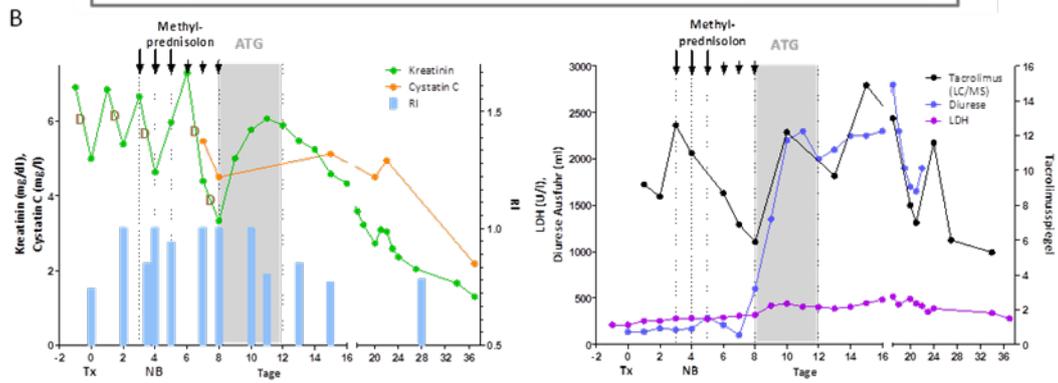
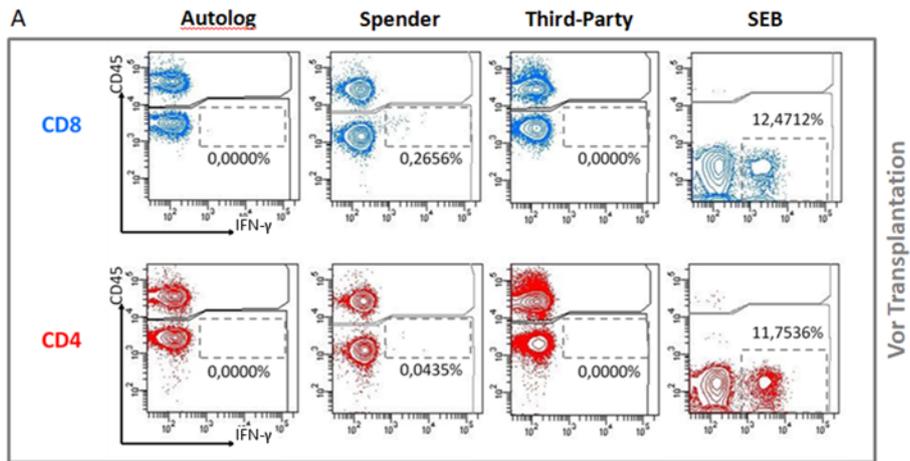


Abbildung 20: Nachweis alloreaktiver T-Zellen einer Patientin vor Nierentransplantation und klinischer Verlauf nach Transplantation. (A) Exemplarische Dotplots der durchflusszytometrischen Analyse zum Nachweis alloreaktiver T-Zellen eines Patienten auf der Transplantationswarteliste für eine Niere. Die Zellen der Patientin (CD45 negative Zellpopulation) wurden gegen (CD45 positive Zellpopulation) ihre eigenen Zellen („Autolog“), gegen die Zellen ihres Organspenders („Spender“) und gegen die Zellen von drei immungesunden Probanden („Third-Party“; hier eine der drei Messungen exemplarisch im Dotplot gezeigt) auf alloreaktive CD4 und CD8 T-Zellen, definiert durch die Expression von CD69 und der Induktion von IFN- γ , untersucht. Die Patientin zeigte eine CD4 (0,0435%) mit zusätzlicher CD8 (0,2656%) Alloreaktivität gegen ihren Organspender, nicht jedoch gegen die Third-Party Stimulatoren. Als Positivkontrolle wurde eine Stimulation der Patientenzellen mittels *Staphylococcus aureus* Enterotoxin B (SEB) mitgeführt (CD4 11,7536%; CD8 12,4712%). Im gestrichelten Rechteck des jeweiligen Dotplots ist der prozentuale Anteil alloreaktiver T-Zellen dargestellt. **(B)** Die ersten 38 Tage nach Nierentransplantation der Patientin sind für die Parameter Kreatinin (in mg/dl; grüne Linie), Cystatin C (in mg/l; orange Linie), Lactatdehydrogenase (LDH in U/l; pinke Linie), dem Tacrolimuspiegel (schwarze Linie), der Diurese (gemessene Ausfuhr in ml, blaue Linie) und den Transplantat-Widerstandsindices (hellblaue Balken) dargestellt. Die Patientin zeigte duplexsonographisch steigende Widerstandsindices unmittelbar nach Transplantation. Drei Tage nach Transplantation wurde mit einer dreitägigen Methylprednisolon-Stoßtherapie begonnen (große schwarze Pfeile), woraufhin sich das Perfusionssignal verbesserte. Bei Reduktion der Steroiddosis (kleine schwarze Pfeile) fand ein erneuter Anstieg der Widerstandsindices statt. Acht Tage nach Transplantation wurde mit einer Antithymozytenglobulin-(ATG)-Gabe (800 mg/5 d) begonnen. Daraufhin setzte die Diurese rasch ein und der Kreatinin-Wert sank stetig (Tag 12: 5,89 mg/dl; Tag 38: 1,30 mg/dl). Eine Nierenbiopsie (NB) wurde vier Tage nach Transplantation unter Steroidstoß entnommen und zeigte keine Anzeichen einer akuten Abstoßungsreaktion. D, Dialyse; RI, Transplantat-Widerstandsindices; Tx, Transplantation. **(C)** Exemplarische Dotplots der durchflusszytometrischen Analyse zum Nachweis alloreaktiver T-Zellen der Nierentransplantat-Empfängerin gegen ihre eigenen eingefrorenen Zellen („Autolog“), gegen die eingefrorenen Zellen ihres Organspenders („Spender“) und gegen die eingefrorenen Zellen von drei immungesunden Probanden („Third-Party“; hier eine der drei Messungen exemplarisch im Dotplot gezeigt) sechs (oberer grauer Kasten) und zwölf (unterer hellgrauer Kasten) Monate nach Transplantation. Die Nierenempfängerin wies sechs Monate nach Transplantation eine CD4 Alloreaktivität, gemessen anhand der Expression von CD69 und IFN- γ , auf. Weitere sechs Monate nach Transplantation war keine Alloreaktivität mehr nachweisbar. Im gestrichelten Rechteck des jeweiligen Dotplots ist der prozentuale Anteil alloreaktiver T-Zellen dargestellt.

Die Patientin zeigte keine humorale Vorimmunsisierung, wies vier HLA-Mismatches gegen ihren Organspender auf (HLA-A-B-DR: 2-1-1) und ihr Crossmatch fiel negativ aus. Die Nierentransplantation verlief komplikationslos. Die Patientin erhielt eine immunsuppressive Vierfach-Therapie mit Tacrolimus, Mycophenolat Mofetil, Steroiden und anti-IL-2-Rezeptor-Antikörpern. Nach Transplantation zeigte sich zunächst eine zeitgerechte Etablierung der Diurese (150 ml an Tag 1), welche jedoch nach wenigen Tagen sistierte bei zeitgleich duplexsonographisch steigenden Widerstandsindices (Abbildung 20B). Das Vorliegen einer zellulären Organabstoßung wurde vermutet und eine dreitägige Steroidstoßtherapie mit Methylprednisolon, welche zur Verbesserung der Perfusionssignale führte, durchgeführt. Die Reduktion der Steroiddosis resultierte jedoch in einem erneuten Anstieg der Widerstandsindices. Aufgrund des klinischen Verlaufs und der Information der hohen Frequenzen präformierter alloreaktiver T-Zellen der Patientin gegen ihren Spender (Abbildung 20), wurde die Rejektionstherapie auf Antithymozytenglobulin-Gabe (ATG

800 mg/5 Tage) eskaliert. Das Ergebnis der unter Steroidstoß entnommenen Nierenbiopsie (4 Tage nach Transplantation, 2 Tage nach Steroidstoß) lag nach der dritten Applikation von ATG vor und zeigte zwar keinen Hinweis auf eine akute Abstoßung, dennoch setzte unter ATG-Gabe die Diurese rasch ein und es konnte erstmalig ein kontinuierlicher Abfall des Serum-Kreatinins beobachtet werden. Bei stationärer Entlassung (Tag 27) der Patientin lag das Kreatinin bei 2,04 mg/dl und 56 Tage nach Transplantation bei 1,27 mg/dl. In einer Rebiopsie nach sieben Wochen wurden in der histologischen Analyse lediglich Borderline-Veränderungen beschrieben. Bei einer erneuten Testung alloreaktiver T-Zellen sechs Monate nach Transplantation konnten nur noch alloreaktive CD4 T-Zellen (0,0196%; Abbildung 20C) aber keine alloreaktiven CD8 T-Zellen gegen die eingefrorenen PBMC ihres Organspenders nachgewiesen werden. Diese zelluläre CD4 Alloreaktivität war zwölf Monate nach der Transplantation nicht mehr vorhanden (Abbildung 20C). Der ein Jahres Kreatinin-Wert lag bei 1,42 mg/dl. Bei dieser Patientin führte die Kenntnis der vorbestehenden Alloreaktion zu einer raschen individuellen Anpassung der Immunsuppression, durch die eine Abstoßungsreaktion zügig behandelt werden konnte.

5.3.3.4 Fallbeispiel #4: Patient vor Transplantation mit Zustand nach zellulärer Abstoßungsreaktion

Eine präformierte Alloreaktivität kann auch dazu beitragen nicht akzeptierbare („unacceptable“) HLA-Moleküle zu identifizieren, die bei einem Empfänger möglicherweise für das Auftreten einer Alloreaktivität und einer nachfolgenden Abstoßungsreaktion verantwortlich sind. Dies wird anhand eines 38-jährigen Patienten dargestellt, der das Ersttransplantat einer Niere (Verstorbenenspende) durch ein akutes zelluläres Abstoßungsereignis verloren hatte. Der Patient war bereits sechs Jahre vor seiner ersten Transplantation dialysepflichtig. Der Patient mit Zustand nach Nierentuberkulose hatte eine Hepatitis B (HBV) und Hepatitis C (HCV) Infektion, deren Viruslast zum Zeitpunkt der Ersttransplantation negativ war (Abbildung 21A). Außerdem wies er vier HLA-Mismatches (HLA-A-B-DR: 1-2-1) gegen seine 57-jährige Spenderin auf. Seit Listung zur Transplantation waren keine PRA nachweisbar und das Crossmatch gegen den Organspender fiel negativ aus.

A

klinische Ereignisse	Nephrektomie	Leberbiopsie	Hämodialyse		Antivirale Therapie		1. Transplantation Abstoßung						2. Transplantation
ET				T	NT	T	F	-	-	NT	T	T	S
Zeitpunkt	04 1997	2002	08 2003	01 2004	03 2008	04 2009	12 2009	07 2010	03 2011	03 2012	10/11 2012	01 2013	03 2013
Infektionen	TB	△ HBV			△ HCV								
PRA				0%	0%	0%	0%	0%	0%	8%	0%	12%	
T-Zellanalyse									X	X			X

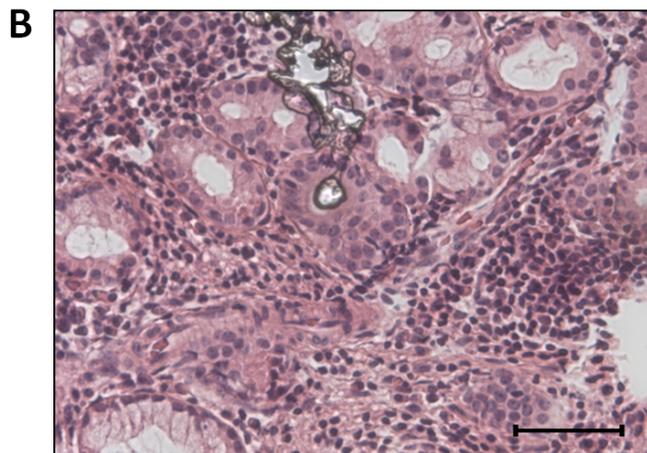


Abbildung 21: Klinischer Verlauf eines Patienten auf der Warteliste für eine Niere und histologische Analyse des abgestoßenen Nierentransplantats. (A) Dargestellt ist der klinische Verlauf eines 38-jährigen Kaukasiers der eine Abstoßungsreaktion seines ersten Nierentransplantates aufwies. Aufgrund einer Tuberkuloseinfektion der Niere wurde zwölf Jahre vor seiner ersten Transplantation die linke Niere nephrektomiert und sechs Jahre vor Transplantation wurde wegen chronischer Niereninsuffizienz der verbleibenden rechten Niere eine Hämodialyse gestartet. Der Virusnachweis einer früheren Hepatitis B und C Infektion (HBV und HCV) war zum Zeitpunkt der Transplantation negativ. **(B)** Eine Nierenbiopsie wurde drei Tage nach der ersten Nierentransplantation durchgeführt. Diese zeigte mittels einer Hämatoxylin-Eosin-(HE)-Färbung eine massive interstitielle Lymphozyteninfiltration. Es wurde mit einer 20-fachen Vergrößerung mikroskopiert. Der Balken entspricht 50 µm; ET, Eurotransplant; F, nicht erfolgreich; HBV, Hepatitis B Virus; HCV, Hepatitis C Virus Genotype 4; NT, nicht-transplantabel; PRA, Panel-reaktive Antikörper; S, erfolgreich; T, transplantabel; TB, Tuberkulose; (Abbildung reproduziert aus Originalpublikation zu dieser Arbeit [111]).

Die Ersttransplantation verlief komplikationslos. Direkt nach der Transplantation erhielt der Patient eine vierfach immunsuppressive Therapie mit Tacrolimus, Mycophenolat Mofetil, Steroiden und anti-IL2-Rezeptor Antikörpern. Drei Tage nach der Transplantation brach die Diurese des Transplantierten ein. Die Duplexsonographie zeigte erste Hinweise auf eine akute Abstoßungsreaktion, woraufhin eine Biopsie durchgeführt wurde. Die histologische Analyse zeigte Zeichen einer akzelerierten zellulären Abstoßungsreaktion mit massiver Lymphozyteninfiltration ohne Anzeichen einer humoralen Komponente (Banff IIA;

Abbildung 21B). Trotz einer dreitägigen hoch dosierten Methylprednisolon-Gabe (500 mg/Tag) blieb der Patient anurisch und die Perfusion der Niere verbesserte sich nicht. Aufgrund seiner Infektgeschichte mit Tuberkulose, HBV und HCV wurde eine T-Zell depletierende Therapie bei Steroid-refraktärer Rejektion nicht in Erwägung gezogen. Bereits zehn Tage nach der ersten Nierentransplantation erfolgte die Nephrektomie des transplantierten Organs und der Patient war wieder auf eine Hämodialyse angewiesen. Aufgrund des nicht erklärbaren rapiden Abstoßungsmechanismus wurde der Patient von der Transplantationswarteliste genommen. Es liegen keine zellulären Alloreaktivitätsmessungen dieser ersten Nierentransplantation vor.

Ein Jahr nach Transplantatverlust kam es zur Vorbereitung einer Re-Registrierung des Patienten auf die Transplantationswarteliste. Um mögliche Ursachen seiner vorangegangenen Transplantat-Abstoßung zu identifizieren, wurden detaillierte immunologische Untersuchungen durchgeführt. Zunächst wurde getestet, inwieweit sich die Zellen des Patienten durch gängige immunsuppressive Medikamente hemmen lassen. Dazu wurde heparinisertes Blut des Patienten und zweier weiterer immungesunder Probanden („Kontrollen“) mit dem polyklonalen Stimulus SEB in An- und Abwesenheit verschiedener Konzentrationen immunsuppressiver Medikamente wie Tacrolimus, Cyclosporin A, Mycophenolat Mofetil, Methylprednisolon und Rapamycin stimuliert. Der immunsuppressive Effekt der IFN- γ Induktion und der Proliferation von CD4 und CD8 T-Zellen wurde mittels Durchflusszytometrie quantifiziert. Dabei zeigten sowohl die Zellen des Patienten als auch der beiden Kontrollen einen ähnlichen inhibitorischen Effekt der Immunsuppressiva auf die Zytokininduktion und die Proliferation von CD4 und CD8 T-Zellen (Abbildung 22A/B). Hinweise auf verändertes Ansprechen des Patienten auf immunsuppressive Medikamente als Grund für die frühe Abstoßungsreaktion ergaben sich auf dieser Basis daher nicht. Da der Patient sieben und 15 Monate nach Transplantatverlust nach wie vor keine PRA aufwies, wurde nun 15 Monate nach Transplantatverlust nicht nur nach humoralen sondern auch nach zellulären Ursachen für den Transplantatverlust geforscht. Daher wurde der Empfänger in einem PBMC-Verfahren auf alloreaktive CD4 und CD8 T-Zellen gegen elf HLA-typisierte Third-Party Stimulatoren getestet. Diese umfassten auch zwei Brüder, die als potentielle Lebendspender zur Verfügung standen (Abbildung 22C/D und Tabelle 9). Der Patient zeigte

eine sehr hohe CD4 und CD8 T-Zell Alloreaktivität gegen einen nicht verwandten Third-Party Stimulator (#5) und einen seiner Brüder (Bruder #1: CD4 0,817% und CD8 1,004%; Third-Party #5: CD4 0,631% und CD8 0,828%; Abbildung 22C/D, Tabelle 9). Diese Messungen des Patienten wurden mit alloreaktiven T-Zell Messungen von 16 Nieren-Lebendspender-Paaren, die zwischen 05/2011 und 07/2013 am Universitätsklinikum Homburg rekrutiert wurden, verglichen (Abbildung 22E). Bei den 16 Nierenempfängern handelt es sich um vier Frauen und zwölf Männern im Alter von $42,9 \pm 13,9$ (Mittelwert und Standardabweichung) Jahren, bei den Organspendern um elf Frauen und fünf Männern im Alter von $48,3 \pm 13,4$ Jahren, deren Zellen unmittelbar vor der Nierentransplantation gegeneinander auf alloreaktive T-Zellen getestet wurden. Jeder Empfänger einer Nierenlebenspende wurde außerdem noch gegen zwei weitere Third-Party Stimulatoren (immungesunde Probanden), die dasselbe Alter wie der entsprechende Organspender hatten, auf präformierte alloreaktive T-Zellen untersucht. Keiner der 16 Nierenempfänger zeigte eine CD4 oder CD8 Alloreaktivität gegen seinen Organspender. Lediglich ein Nierenempfänger wies eine starke CD8 Alloreaktivität gegen seine beiden mitgeführten Third-Party Stimulatoren auf (Frequenz: 1,8978%; 2,2537%; Abbildung 22E). Keiner dieser 16 Nierenempfänger zeigte innerhalb der ersten zwei Jahre nach Transplantation eine Abstoßungsreaktion. Schlussfolgernd kann gesagt werden, dass der Patient eine ungewöhnlich hohe alloreaktive CD4 und zusätzliche CD8 T-Zell Frequenz im Gegensatz zu den 16 Nierentransplantatempfängern aufwies. Im Weiteren wurde nach einem Zusammenhang zwischen dem HLA-Status der elf Third-Party Stimulatoren und des Patienten und dem Auftreten der hohen zellulären Alloreaktivität gegen zwei der Third-Party Stimulatoren gesucht. Dabei stimmten sechs HLA-Allele des ersten Spenders (Tabelle 9: HLA-A*24, -B*44, -B*56, -C*02, -DRB1*16 und -DQB1*05), dessen Niere der Patient abgestoßen hat, mit den HLA-Molekülen der beiden hoch alloreaktiv reagierenden Third-Party Stimulatoren zumindest zum Teil überein (Tabelle 9: Third-Party #5: HLA-A*24, HLA-B*44, HLA-C*02; Third-Party #1: HLA-DQB1*05), so dass diese HLA-Allele möglicherweise ein Target für die starke Alloreaktivität des Empfängers dargestellt hatten. Dies wird unterstützt durch den Umstand, dass diese Allele in Third-Party Stimulatoren, gegen die der Patient keine Alloreaktivität aufwies, nicht vorhanden waren (Tabelle 9).

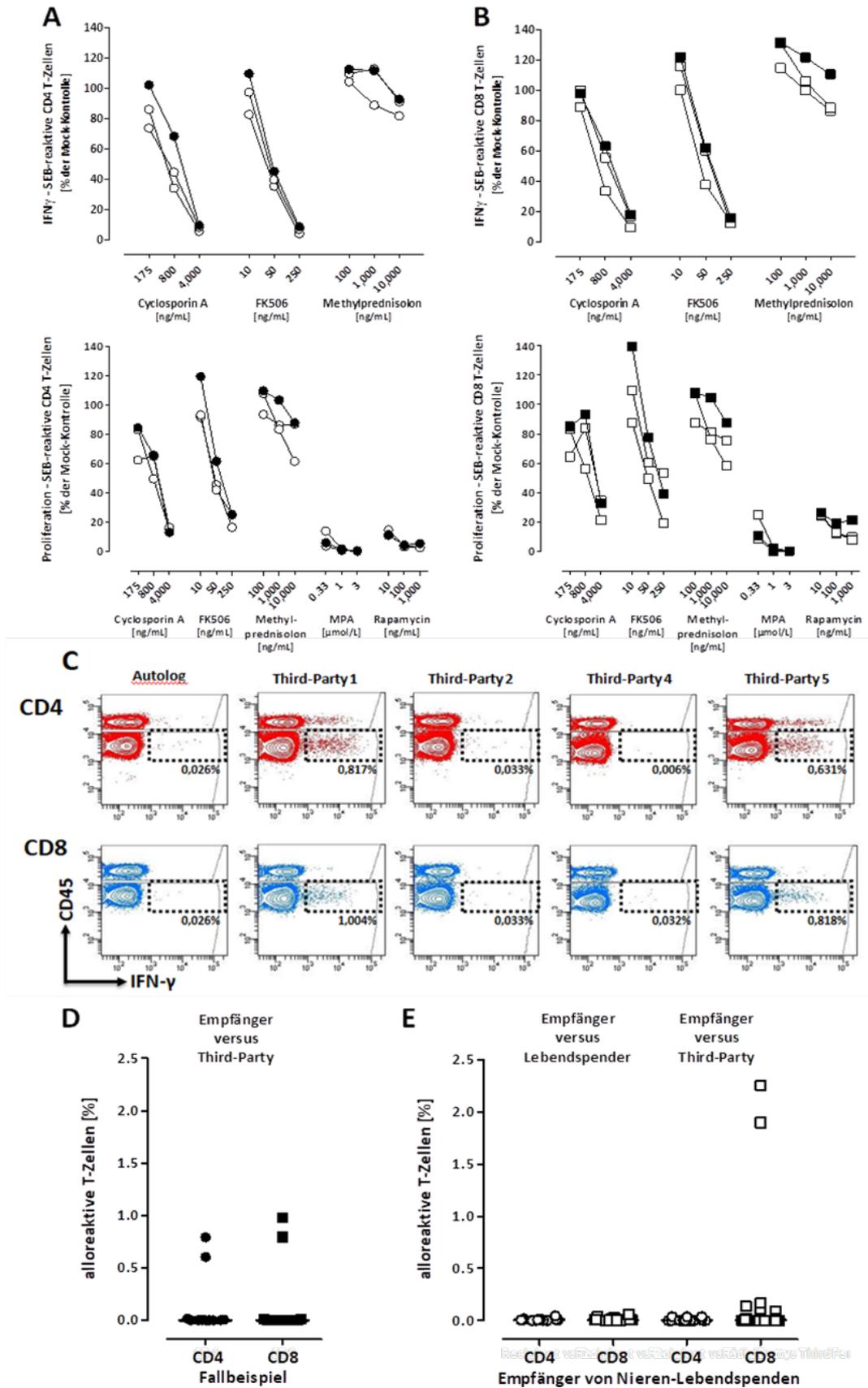


Abbildung 22: Charakterisierung der Immunantwort eines Patienten mit Zustand nach akuter Abstoßungsreaktion und Transplantatverlust. In Anwesenheit und Abwesenheit von immunsuppressiven Medikamenten wie Cyclosporin A (175, 800 und 4000 ng/ml), Tacrolimus (FK506: 10, 50 und 250 ng/ml), Methylprednisolon (100, 1000 und 10000 ng/ml), Mycophenolat Mofetil (MPA: 0,33, 1 und 3 µmol/l) oder Rapamycin (10, 100 und 1000 ng/ml) *in vitro* wurden die Zellen des Patienten und zweier immungesunder Probanden nach einer Stimulation mit *Staphylococcus aureus* Enterotoxin B (SEB) auf ihre T-Zell Reaktivität untersucht. Der inhibitorische Effekt der immunsuppressiven Medikamente auf die Induktion von IFN- γ und die Proliferation der CD4 (**A**) und CD8 (**B**) T-Zellen wurde bestimmt in Abhängigkeit der Reaktivität des Ansatzes ohne immunsuppressive Medikamente (nur Ethanol als Lösungsmittel), der auf 100% festgesetzt wurde. Die Zytokininduktion der Zellen wurde nach einer Stimulationszeit von 6 h im Durchflusszytometer mittels CD69 und IFN- γ doppelpositiver T-Zellen analysiert. Die Proliferation wurde nach 36 h über den Einbau von Bromdesoxyuridin (BrdU) anstelle des Nukleotids Desoxythymidintriphosphat in die neu synthetisierte DNA über das Fluoreszenzsignal eines spezifischen Antikörpers gegen BrdU und der Induktion von IFN- γ im Durchflusszytometer erfasst. Die Zellen des Patienten sind als geschlossene Symbole, die der beiden immungesunden Probanden als offene Symbole dargestellt. Die Messungen eines Probanden bei unterschiedlichen Konzentrationen eines Medikaments wurden durch Linien verbunden. DNA, Desoxyribonukleinsäure. (**C**) Exemplarische Dotplots einer durchflusszytometrischen Analyse zeigen alloreaktive CD4 (obere Zeile) und CD8 T-Zellen (untere Zeile) des Patienten gegen vier von elf getesteten Third-Party Stimulatoren und einer autologen Kontrolle. Die Stimulatorzellen sind mit dem Pan-Leukozytenmarker CD45 vorgefärbt (obere Zellpopulation im Dotplot), die Reaktanzellen blieben ungefärbt (untere Zellpopulation im Dotplot). Alloreaktive T-Zellen wurden über die Induktion von IFN- γ definiert und prozentual in jeden Dotplot angegeben. Die gestrichelte Linie hebt die alloreaktiven T-Zell Frequenzen des Patienten gegen die Third-Party Stimulatoren hervor. (**D**) Darstellung der unter C erwähnten alloreaktiven CD4 und CD8 T-Zell Frequenzen des Patienten gegen elf Third-Party Stimulatoren, wobei der Patient eine hohe CD4 und CD8 T-Zell Alloreaktivität gegen zwei Third-Party Stimulatoren zeigt. (**E**) Zwischen 05/2011 und 07/2013 wurden am Universitätsklinikum Homburg 16 Nierenempfänger (mittleres Alter 42,9±13,9 Jahre; 4 Frauen/12 Männer) einer Nieren-Lebendspende unmittelbar vor Transplantation auf alloreaktive CD4 (Kreise) und CD8 (Quadrate) T-Zellen gegen ihre Organspender (mittleres Alter 48,3±13,4 Jahre; 11 Frauen/5 Männer) und gegen zwei weitere immungesunde Probanden („Third-Party Stimulatoren“), die altersgematcht zum Organspender waren, untersucht. Keiner der 16 Nierenempfänger zeigte eine CD4 oder CD8 Alloreaktivität gegen seinen Organspender. Jedoch zeigte ein Nierenempfänger eine hohe CD8 Alloreaktivität gegen beide Third-Party Stimulatoren (1,8978% und 2,2537%). (Abbildung reproduziert aus Originalpublikation zu dieser Arbeit [111]).

Der Patient zeigte gegen zwei weitere HLA-Allele (HLA-B*56 und -DRB1*16) des ersten Nierenspenders bei den Third-Party Stimulatoren mit diesen HLA-Allelen keine Alloreaktivität. Diese HLA-Allele wurden deshalb als Ursache der zellulären Alloreaktivität ausgeschlossen. Jedoch wurden alle HLA-Allele des ersten Organspenders als inakzeptable HLA-Allele für eine zweite Nierentransplantation registriert. Aufgrund der gemessenen hohen zellulären Alloreaktivität wurde einer der beiden Brüder als möglicher Nieren-Lebendspender ausgeschlossen. Der zweite Bruder, der einen identischen HLA-Status zum Patienten aufwies, zog seine Spendebereitschaft zurück. 27 Monate nach der ersten Transplantation wurde der Patient auf der Transplantationswarteliste für eine Niere wieder aufgenommen.

Tabelle 9: Alloreaktive T-Zell Frequenzen des Empfängers und HLA-Status des Empfängers, der Spender und der Third-Party Stimulatoren.

	HLA-A, -B, -DR MM	HLA-A		HLA-B		HLA-C		HLA-DRB1		HLA-DQB1		Alloreaktive T-Zellen	
		Allel 1	Allel 2	Allel 1	Allel 2	Allel 1	Allel 2	Allel 1	Allel 2	Allel 1	Allel 2	CD4	CD8
Empfänger	n.a.	02:01	03:01	18:01	51:01	01:02	07:01g	04:01	11:01	03:01	03:02	0,000%	0,000%
Spender 1 (Tx1)	4	03	24	44	56	01	02	16	11	05	03	n. a.	n. a.
Spender 2 (Tx2)	3	01	03	13	51	06	16	07	11	02	03	0,000%	0,000%
Third-Party 1*	1	02:01	02:01	51:01	51:01	01:02	14:02	04:07	14:01g	03:01	05:03	0,791%	0,978%
Third-Party 2*	0	02:01	03:01	18:01	51:01	01:02	07:01g	04:01	11:01	03:01	03:02	0,007%	0,008%
Third-Party 3	5	01:01	02:01	08:01	45:01	06:02	07:01g	01:01	03:01	02:01	05:01	0,000%	0,000%
Third-Party 4	5	01:01	26:01	08:01	57:01	06:02	07:01g	03:01	04:02	02:01	03:02	0,000%	0,000%
Third-Party 5	4	11:01	24:02	44:03	44:05	02:02	04:01	07:01	11:04	02:02	03:01	0,604%	0,792%
Third-Party 6	4	02:01	25:01	40:01	51:01	03:04	15:02	08:01	09:01	03:03	04:02	0,016%	0,000%
Third-Party 7	4	03:01	68:01	08:01	51:01	07:01g	15:02	03:01	16:01	02:01	05:02	0,004%	0,000%
Third-Party 8	4	02:01	02:01	40:01	44:02	03:04	05:01	13:02	16:01	05:02	06:04	0,000%	0,000%
Third-Party 9	4	03:01	68:01	07:02	40:01	03:04	07:02	11:04	13:02	03:01	06:04	0,000%	0,006%
Third-Party 10	3	03:01	11:01	18:01	50:01	05:01	06:02	03:01	03:01	02:01	02:01	0,000%	0,000%
Third-Party 11	2	01:01	02:01	08:01	08:01	07:01g	07:01	11:02	11:04	03:01g	03:01g	0,000%	0,000%

*Brüder des Empfängers als mögliche Lebendspender; Tx, Transplantation; Antigene, die zwischen dem ersten Spender und Third-Party Stimulator #1 oder #5 geteilt werden, sind fett hervorgehoben; Prozent der alloreaktiven CD4 und CD8 T-Zellen wurden nach Subtraktion der entsprechenden autologen Kontrollstimulation kalkuliert; HLA-Subtypen des Spender 1 und 2 sind nicht verfügbar. n.a. not available („nicht verfügbar). (Tabelle reproduziert aus Originalpublikation zu dieser Arbeit [111]).

Um zu diesem Zeitpunkt seine zelluläre Alloreaktivität im zeitlichen Verlauf zu beobachten, wurde der Patient erneut gegen Third-Party #5 auf alloreaktive T-Zellen getestet. Interessanterweise war der Anteil alloreaktiver CD4 oder CD8 T-Zellen zu diesem Zeitpunkt unter die Nachweisgrenze gefallen (Abbildung 23A). Demgegenüber ließen sich überraschenderweise unmittelbar nach der erneuten Listung zur Transplantation erstmalig mäßig erhöhte PRA (8%) nachweisen. Im darauffolgenden Quartal waren keine PRA und anschließend wieder 12% PRA nachweisbar (Abbildung 23A). Die Antikörper waren gegen HLA-B*44, -*45, -*76, -*82 und gegen HLA-DRB1*09, -*10 und -*51 gerichtet, wobei HLA-B*44 auch als Risikoallel bei alloreaktiven T-Zellen identifiziert wurde. Für eine zukünftige Nierentransplantation wurden sowohl die Risiko-HLA-Allele für eine zelluläre als auch für eine humorale Alloreaktivität an Eurotransplant übermittelt und ausgeschlossen. Der Patient erhielt 39 Monate nach seiner ersten Nierentransplantation ein zweites Nierentransplantat von einem 31-jährigen verstorbenen Spender (HBV-Antigen und HCV-Antikörper negativ). Es lagen drei HLA-Mismatche (HLA-A-B-DR: 1-1-1, Tabelle 9) vor und das Crossmatch war negativ, jedoch zeigte der Patient unmittelbar vor Transplantation 8% PRA (Abbildung 23A). Aufgrund dieser aufgetretenen PRA und der Vorgeschichte des Patienten wurde eine Plasmapherese mit Albumin durchgeführt. Nach Transplantation erhielt der Patient eine immunsuppressive Induktions-Therapie bestehend aus Tacrolimus, Mycophenolat Mofetil, Steroiden und anti-IL-2 Rezeptor Antikörpern. Der Patient zeigte keine CD4 oder CD8 T-Zell Alloreaktivität gegen seinen zweiten Nierenspender und wies nach wie vor keine Alloreaktivität mehr gegen Third-Party #5 auf (Abbildung 23A/B). Alle Ultraschalluntersuchungen nach der zweiten Nierentransplantation zeigten eine normale Transplantatmorphologie mit regulärer Perfusion. Obwohl das Transplantat erst verzögert die Funktion aufnahm, lag der Kreatininwert bei Entlassung bei 1,46 mg/dl und es zeigten sich keine klinischen Abstoßungsepisoden. Die zwei Jahres Transplantatfunktion der zweiten Nierentransplantation war exzellent mit 1,19 mg/dl Kreatinin (eGFR 70,1 ml/min).

Der Verlauf dieses Patienten verdeutlicht, dass die Messung alloreaktiver T-Zellen bei Patienten mit Zustand nach akuter zellulärer Abstoßung zum Ausschluss von nicht akzeptablen HLA-Allelen und möglicherweise auch zu einer Auswahl von geeigneten Spendern bei Lebendspenden hilfreich sein kann.

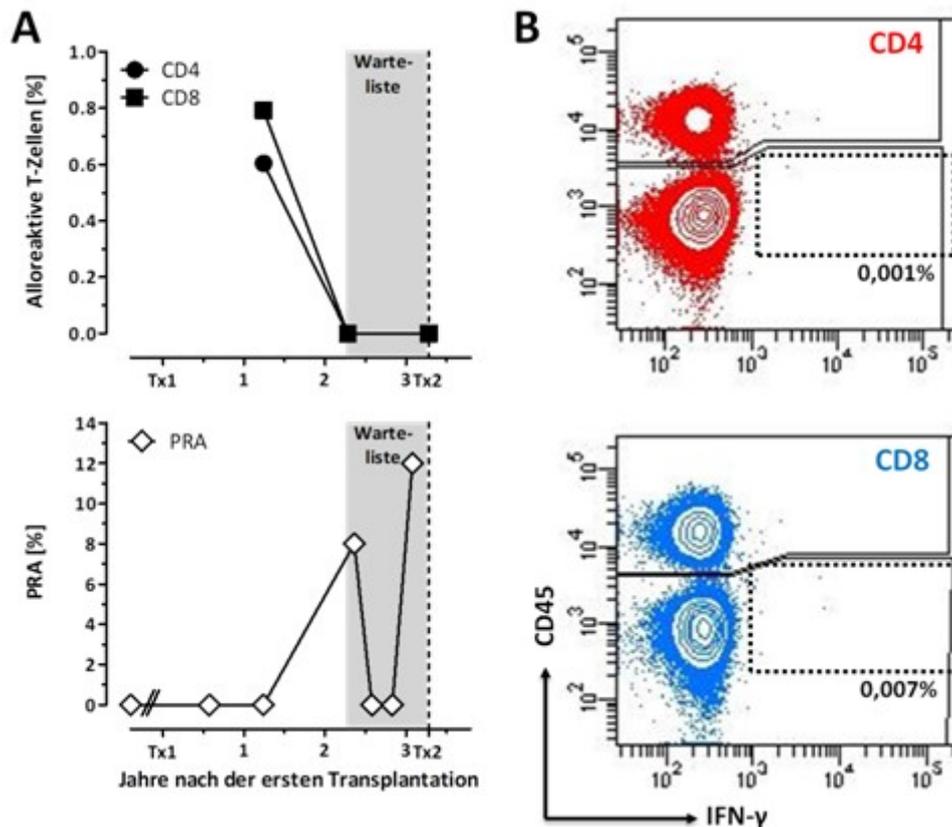


Abbildung 23: Humorale und zelluläre Alloreaktivität nach der ersten Nierentransplantation und alloreaktive T-Zell Messungen unmittelbar vor der zweiten Nierentransplantation. (A) Dargestellt sind die ermittelten alloreaktiven CD4 (schwarze Kreise) und CD8 T-Zellen (schwarze Quadrate) des Patienten gegen Third-Party Stimulator #5 und Panel-reaktive Antikörper (PRA; offene Quadrate) im zeitlichen Verlauf zwischen der ersten und zweiten Nierentransplantation. Dabei konnten zwei Jahre nach der ersten Transplantation 8% PRA festgestellt werden, welche wieder verschwanden (0% PRA) und unmittelbar vor der zweiten Nierentransplantation wieder auf 12% PRA anstiegen. PRA, Panel-reaktive Antikörper; graue Schattierung, Wartelistenzeit bis zur zweiten Transplantation; Tx, Transplantation erste (1) und zweite (2); (B) Es sind Dotplots der durchflusszytometrischen Analyse alloreaktiver CD4 (oberer Dotplot) und CD8 T-Zellen (unterer Dotplot) des Patienten gegen seinen zweiten Nierenspender dargestellt. Der Patient (CD45 negative Zellpopulation) zeigte keine zelluläre Alloreaktivität, definiert durch die Produktion von IFN- γ , gegen seinen zweiten Organspender (CD45 positive Zellpopulation). Der Inhalt der gestrichelten Linie zeigt die IFN- γ Produktion des Patienten gegen seinen Spender. Der prozentuale Anteil IFN- γ produzierender T-Zellen wurde im Dotplot angegeben. (Abbildung reproduziert aus Originalpublikation zu dieser Arbeit [111]).

5.3.4 Versuchsbedingungen zum Nachweis funktioneller T-Zellen nach Probentransport aus externen Zentren

Aufgrund erster Ergebnisse zur Rolle alloreaktiver T-Zellen für die Entwicklung von zellulären Abstoßungsepisoden nach Transplantation wurden erste Vorbereitungen zur Planung einer prospektiven Multicenterstudie getroffen. Hierzu wurden zunächst Experimente durchgeführt, um zu testen, inwieweit Blutproben nach einem Übernachttransport von

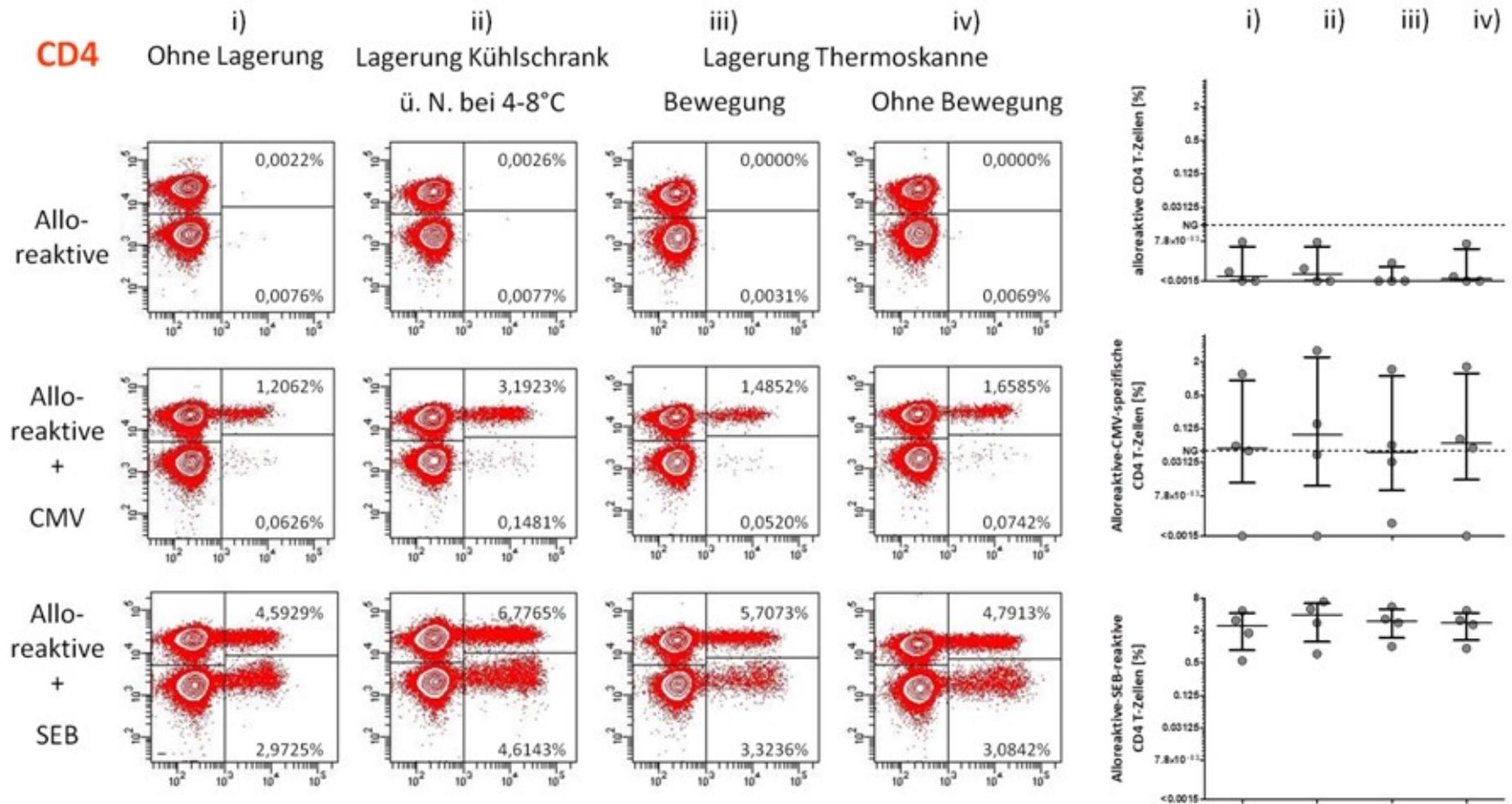
einem externen Zentrum in unser Labor nach wie vor eine Reaktivität zeigen und für den Nachweis alloreaktiver T-Zellen geeignet sind.

5.3.4.1 Evaluation der Transportbedingungen von Vollblutproben zum Nachweis funktioneller T-Zellen

Heparinisiertes Vollblut von vier Hämodialyse-Patienten (2 Paarkombinationen) wurde entweder sofort verarbeitet oder unter drei verschiedenen Bedingungen gelagert. Eine Vollblutprobe wurde über Nacht im Kühlschrank bei 4-8°C gelagert. Dies stellt das Standardverfahren zur Lagerung von Vollblutproben in unserem Routine-Labor dar. Zwei weitere Blutröhrchen wurden über Nacht in je eine mit 4°C kaltem Wasser gefüllte Thermoskanne überführt. Eine der Thermoskannen wurde ohne Bewegung gelagert, während die zweite Thermoskanne unter Bewegung gelagert wurde, um einen Proben-transport mittels Kurierdienst zu simulieren. Von jeder Probe wurden jeweils vier Stimulationen alloreaktiver CD4 und CD8 T-Zellen durchgeführt. Eine Stimulation mit CMV Antigen und SEB diente zusätzlich als Kontrolle. Dabei ließen sich bei einer Lagerung der heparinisierten Blutprobe in den Thermoskannen ähnliche alloreaktive CD8 T-Zell Ergebnisse wie bei Lagerung im Kühlschrank erzielen (Paarung #1: Kühlschrank 1,30%; Thermoskanne Bewegung 1,33%; Thermoskanne ohne Bewegung 1,37%; Paarung #2: Kühlschrank 0,21%; Thermoskanne Bewegung 0,27%; Thermoskanne ohne Bewegung 0,18%; Abbildung 24B). Bei einer direkten Stimulation der Blutproben ohne Lagerung waren im Vergleich zu den über Nacht gelagerten Proben etwas weniger alloreaktive CD8 T-Zellen nachweisbar (Paarung #1: 1,24%; Paarung #2: 0,18%; Abbildung 24B). Da bei keiner getesteten Probanden-Paarung alloreaktive CD4 T-Zellen auftraten, konnte keine Aussage zur Stabilität des Nachweises alloreaktiver CD4 T-Zellen getroffen werden (Abbildung 24A).

Um auch eine Aussage über die Funktionalität von CD4 T-Zellen nach Lagerung treffen zu können wurden die gemischten Lymphozytenreaktionen zusätzlich mit CMV-Antigen oder SEB versetzt und der Anteil CMV-spezifischer und SEB-reaktiver T-Zellen nach einer spezifischen Stimulation mit den entsprechenden Antigenen über die Induktion von CD69 und IFN- γ bei vier Hämodialysepatienten nachgewiesen. Drei der vier Dialysepatienten waren CMV seropositiv und zeigten unter den verschiedenen Lagerungs-Bedingungen ähnliche prozentuale Anteile CMV-spezifischer CD4 T-Zellen.

A



B

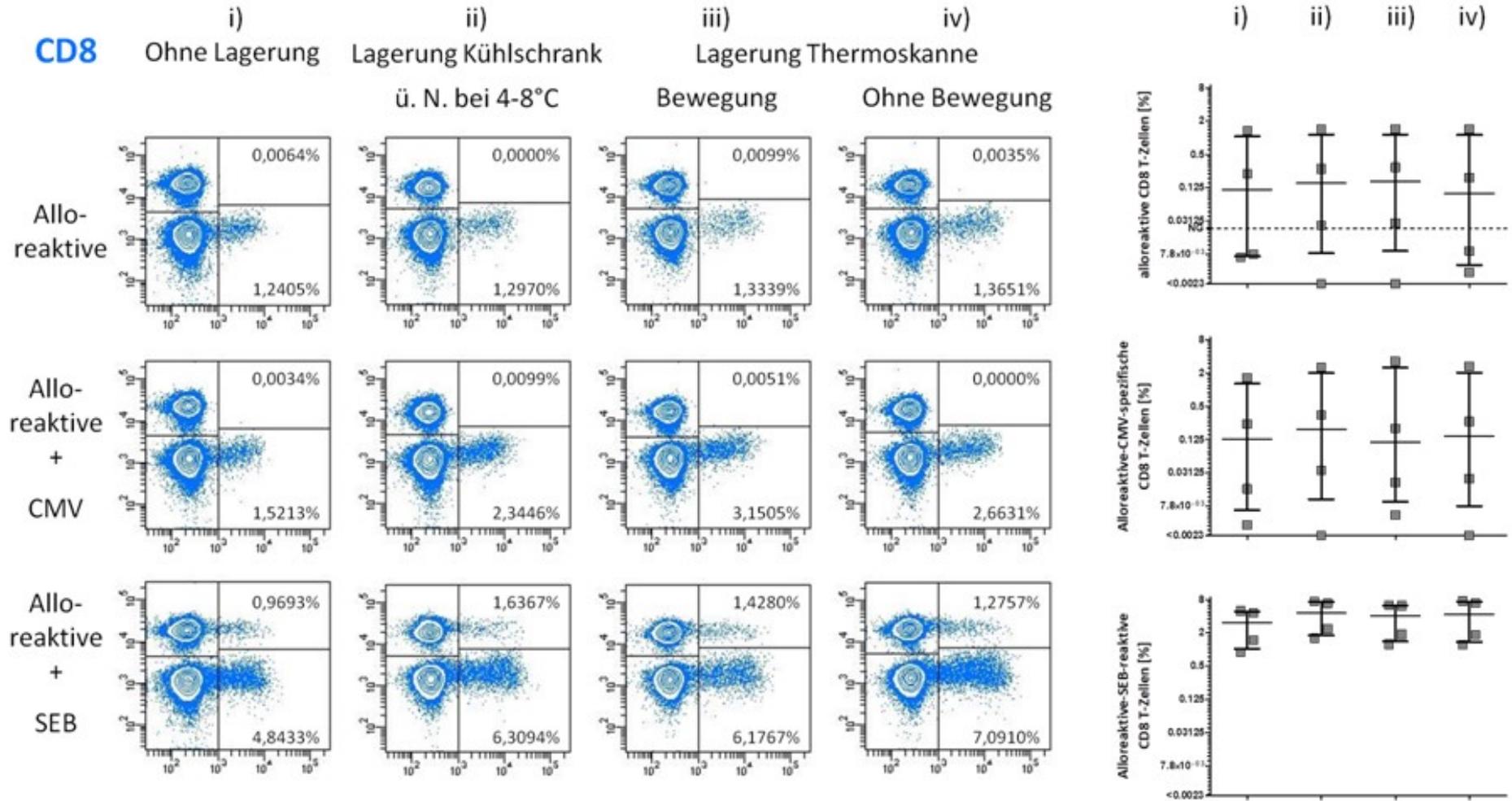


Abbildung 24: Austestung der Transportbedingungen von Vollblutproben zum Nachweis reaktiver T-Zellen. Exemplarisch wurden Dotplots einer durchflusszytometrischen Analyse von vier Hämodialysepatienten unter unterschiedlichen Lagerungsbedingungen zur Austestung der Transportbedingungen von Vollblutproben dargestellt. Durch paarweise Kombination der vier Hämodialysepatienten entstanden zwei Probandenpaarungen (alloreaktive Stimulationsansätze), wobei zur Unterscheidung die Zellen eines Patienten mit CD45 vorgefärbt wurden und die des anderen Patienten ungefärbt blieben. Durch zusätzliche Behandlung der alloreaktiven Stimulation mit CMV oder SEB Antigen konnten CMV-spezifische und SEB-reaktive T-Zellen nachgewiesen werden. Heparinisiertes Vollblut eines Patienten wurde entweder direkt nach Abnahme stimuliert (i, „ohne Lagerung“), über Nacht bei 4-8°C im Kühlschrank gelagert (dies stellt unser Routine-Standardverfahren für das Labor dar; ii, „Lagerung Kühlschrank ü. N. bei 4-8°C“), über Nacht in einer mit 4-8°C kalten Wasser gefüllten Thermoskanne unter Bewegung (iii, „Lagerung Thermoskanne Bewegung“) oder ohne Bewegung (vi, „Lagerung Thermoskanne ohne Bewegung“) gelagert und anschließend stimuliert. Der prozentuale Anteil IFN- γ produzierender CD4 (**A**) und CD8 T-Zellen (**B**) des Reaktanten (CD45 ungefärbte Zellpopulation) und Stimulators (CD45 vorgefärbte Zellpopulation) wurde in den Dotplots angegeben. Bei den vier verschiedenen Hämodialysepatienten, kombiniert zu zwei Stimulationspaaren, konnten keine Unterschiede in den alloreaktiven CD8 T-Zell Frequenzen beobachtet werden (**B**). Da keine alloreaktiven CD4 T-Zellen bei den ausgewählten Probandenpaarungen auftraten wurde zusätzlich zur alloreaktiven Stimulation die Ansätze mit CMV Antigen bzw. SEB versetzt um eine Aussage über die Reaktivität der CMV-spezifischen bzw. SEB-reaktiven CD4 (**A**) und CD8 (**B**) T-Zell Frequenzen trotz der unterschiedlichen Lagerungsbedingungen treffen zu können. Alle drei CMV-seropositiven Hämodialysepatienten zeigten unter den unterschiedlichen Lagerungsbedingungen ähnliche CMV-spezifische CD4 T-Zell Frequenzen. Bei der Positivkontrolle mittels SEB zeigten alle Probanden sowohl bei den CD4 (**A**) als auch bei der Betrachtung der CD8 T-Zellen (**B**) ähnliche prozentuale Anteile trotz der verschiedenen Lagerungsarten. Die Daten zeigen den Median mit interquartilen Range (IQR). Die gestrichelten Linien stellen die NG zum einen für alloreaktive CD4 (0,015%), zum anderen für alloreaktive CD8 T-Zellen (0,023%) dar. Außerdem stellt die gestrichelte Linie bei der Behandlung mit CMV die NG für CMV-spezifische CD4 (0,05%) T-Zellen dar. CMV, Cytomegalievirus; NG, Nachweisgrenze; ü.N., über Nacht; SEB, *Staphylococcus aureus* Enterotoxin B.

Einzig bei Lagerung der Blutproben im Kühlschrank konnten erhöhte CMV-spezifische CD4 T-Zell Frequenzen bei allen Probanden (Proband #1: 3,19%; Proband #2: 0,15%; Proband #3: 0,05%; Abbildung 24A) festgestellt werden. Bei Stimulation des Blutes der vier Hämodialysepatienten mit dem polyklonalen Stimulus SEB konnte sowohl bei den CD8 T-Zellen als auch bei den CD4 T-Zellen aller Probanden ähnliche Anteile SEB-reaktiver T-Zellen unter den verschiedenen Bedingungen nachgewiesen werden (Abbildung 24). Zusammenfassend waren bei allen Lagerungsbedingungen in ähnlichem Ausmaß alloreaktive, CMV-spezifische und SEB-reaktive T-Zellen nachweisbar. Dies lässt den Schluss zu, dass aus heparinisierten Vollblutproben auch nach Transport noch alloreaktive T-Zellen nachzuweisen sind, falls die Blutprobe über Nacht in einer mit 4°C kalten Wasser gefüllten Thermoskanne gelagert und innerhalb von 24 h nach Blutentnahme stimuliert wird (Abbildung 25A).

5.3.4.2 Pilotstudie zum Nachweis funktioneller T-Zellen nach Übernachtversand von Blutproben von Nieren-Lebendspender-Paaren

Am Universitätsklinikum Frankfurt wurden über einen Zeitraum von einem Jahr 14 Nierentransplantatempfänger mit terminaler Niereninsuffizienz und ihre dazugehörigen Lebendspender zur Bestimmung präformierter alloreaktiver, CMV-spezifischer und SEB-reaktiver T-Zellen rekrutiert. Von Empfänger und Spender wurden 9 ml Lithium-Heparin Blut entnommen und umgehend mittels Übernachtskurier in einer mit 4-8°C kaltem Leitungswasser gefüllten Thermoskanne in unser Labor geschickt. Direkt nach Ankunft der Blutproben erfolgte die Stimulation alloreaktiver, CMV-spezifischer und SEB-reaktiver T-Zellen (Abbildung 25A). Neben einer Stimulation alloreaktiver CD4 und CD8 T-Zellen gegen den Spender wurden zusätzlich drei Third-Party Stimulationen mit Vollblut gesunder Probanden durchgeführt.

Bei allen 14 Empfängerproben konnten nach Stimulation mit SEB eine Reaktivität der CD4 und CD8 T-Zellen nachgewiesen werden (CD4: 2,577% (IQR 2,469%); CD8: 4,555% (IQR 4,512%); Abbildung 25C). Eine CMV-spezifische CD4 T-Zell Antwort war bei allen CMV-seropositiven Probanden nachweisbar (9 von 14 Empfängern und 9 von 14 Spendern (Abbildung 25B)). Keine Probe der 14 getesteten Nierenempfänger zeigte eine präformierte zelluläre Alloreaktivität gegen den jeweiligen Spender (Abbildung 25D), während einer der

Nierenempfänger eine CD4 Alloreaktivität gegen Third-Party Stimulatorzellen aufwies (0,01852%; Abbildung 25D).

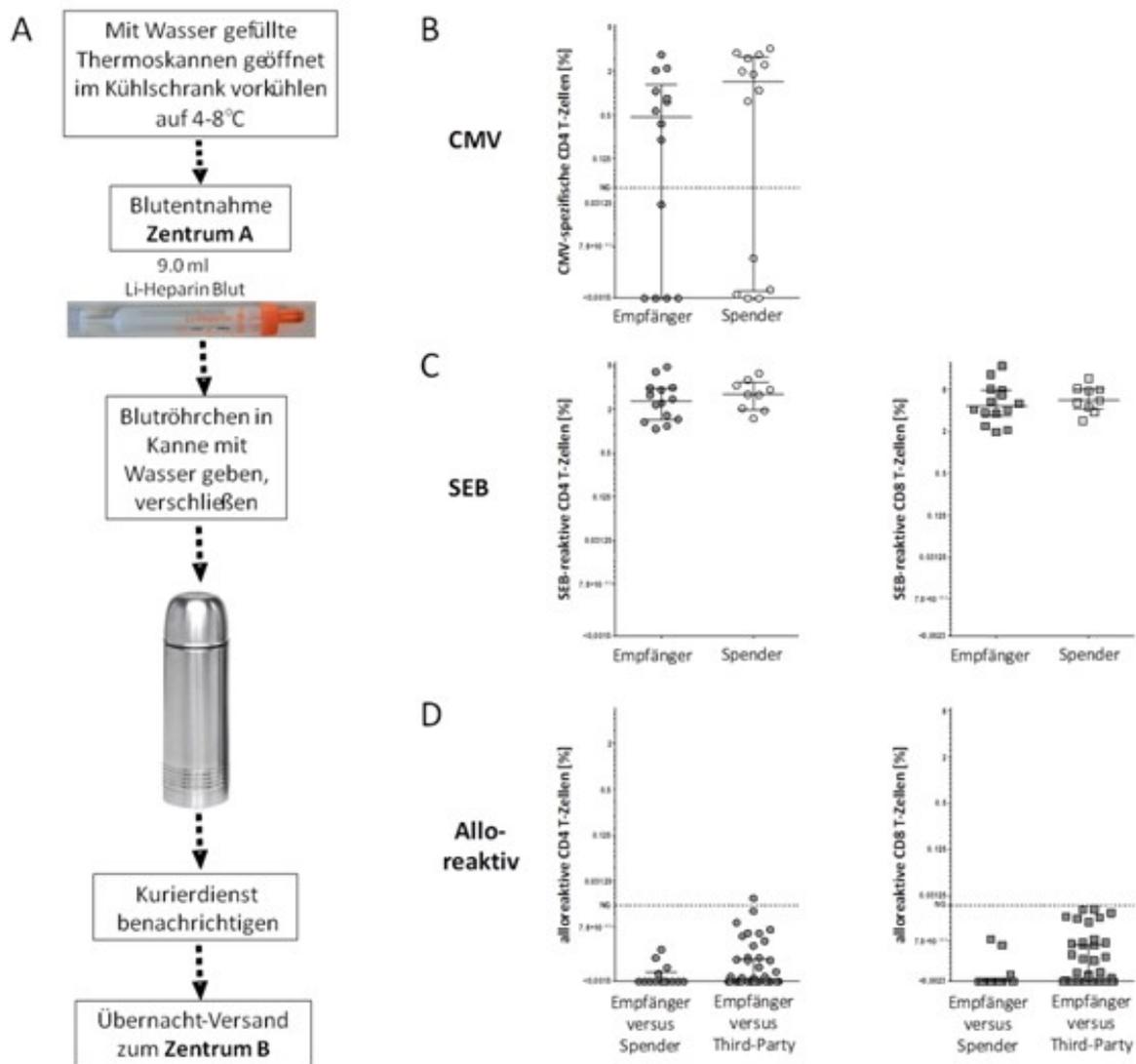


Abbildung 25: Evaluation des Overnightversands zum nachfolgenden Nachweis alloreaktiver, CMV-spezifischer und SEB-reaktiver CD4 und CD8 T-Zellen von Nieren-Lebendspender-Paarungen. (A) Eine mit Leitungswasser gefüllte Thermoskanne wird geöffnet im Kühlschrank bei 4-8°C vorgekühlt bis es zur Blutentnahme kommt. Nachdem 9 ml heparinisiertes Vollblut eines Nierenempfängers und -spenders am selben Tag in Zentrum A abgenommen wurde, werden die Blutproben in der vorgekühlten, mit Wasser gefüllten, Thermoskanne verpackt und mittels eines Versandunternehmens über Nacht in das immunologische Labor des Zentrum B verschickt. Rekrutiert wurden 14 Nierenempfänger mit einer terminalen Niereninsuffizienz und ihre Lebendspender am Universitätsklinikum Frankfurt (Zentrum A) im Zeitraum von 11/2014 bis 11/2015 für alloreaktive T-Zell Untersuchungen im immunologischen Labor des Universitätsklinikum Homburg (Zentrum B). Von Empfänger und Spender wurden 9 ml heparinisiertes Vollblut am selben Tag entnommen und in das Zentrum B geschickt. Analyse **(B)** CMV-spezifischer CD4 T-Zellen bei Nierenempfängern und -spendern vor Transplantation. **(C)** Nachweis reaktiver CD4 und CD8 T-Zellen nach polyklonale Stimulation mit *Staphylococcus aureus* Enterotoxin B (SEB) bei 14 Nierenempfängern und 9 Nierenspendern. **(D)** Die Nierenempfänger wurden gegen ihre Organspender und gegen drei Third-Party Stimulatoren (immungesunde Probanden) auf präformierte alloreaktive T-Zellen untersucht. CMV, Cytomegalievirus; SEB, *Staphylococcus aureus* Enterotoxin B.

Diese Experimente zeigen, dass Blutproben von Empfängern und Spendern nach Übernachtversand zum Nachweis Antigen-spezifischer T-Zellen geeignet sind. Diese Ergebnisse bilden die Basis für eine klinische Multicenterstudie, bei der die präformierte Alloreaktivität des Empfängers gegen den Spender mit klinischen und diagnostischen Zeichen einer zellulären Abstoßungsreaktion nach Transplantation assoziiert wird.

5.4 Alloreaktive T-Zell Immunität bei Schwangeren

Im Kontext einer Schwangerschaft können Fötus und Plazenta einer schwangeren Frau als Allotransplantat betrachtet werden. Im Normalfall wird der Fötus trotz des transplazentalen Austausches, der die immunologische Interaktion zwischen Mutter und Fötus erlaubt, von der Mutter toleriert. Falls diese immunologische Toleranz zwischen einer Mutter und ihrem Fötus gestört sein sollte bzw. wenn mit Beendigung der Schwangerschaft die immunologische Toleranz der Mutter gegenüber dem Fötus nicht mehr erforderlich ist, könnte dies – ähnlich wie bei einer Organtransplantation - zur Entwicklung einer humoralen und/oder zellulären Immunantwort gegen den Fötus bzw. väterliche Antigene kommen.

5.4.1 Querschnittsanalyse alloreaktiver T-Zellen bei Schwangeren und bei Probanden ohne Schwangerschaft

In einer Querschnittsanalyse wurden Frauen, die bereits einmal schwanger waren oder aktuell schwanger sind auf alloreaktive CD4 und CD8 T-Zellen gegen die Kindsväter und gegen bis zu fünf Third-Party Stimulatoren (Zellen von Männern und nicht-schwangeren Frauen) untersucht. Insgesamt wurden 55 Frauen, die noch nie schwanger waren, 87 Schwangere, die zum Zeitpunkt der Analyse erstmalig schwanger waren, 30 Frauen, die aktuell nicht, aber zuvor schon einmal schwanger waren, 13 Schwangere, die bereits zuvor schon einmal schwanger waren, und 8 Frauen, die sich in der Kinderwunschklinik aufgrund einer ungewollten Kinderlosigkeit vorgestellt hatten, rekrutiert (Abbildung 26). Zusätzlich zu den genannten Gruppen von Frauen wurden 93 Männer eingeschlossen. Tabelle 10 gibt zusammenfassend eine Übersicht über die sechs verschiedenen Gruppen und über die in jeder Gruppe durchgeführten Stimulationsreaktionen.

Tabelle 10: Alloreaktive T-Zell Testungen bei Schwangeren und Probanden ohne Schwangerschaft: Anzahl der Messungen und mittleres Alter der Probandengruppen

	Noch nie schwanger	Aktuell schwanger ohne vorangegangene SS	Nicht schwanger aber vorangegangene SS	Aktuell schwanger und vorangegangene SS	Aktuell nicht schwangere Frauen aus der IVF-Klinik	Männer
Anzahl der Messungen n	106	164	80	25	18	129
Anzahl der Reaktanten n	55	87	30	13	8	93
Mittleres Alter ± Standardabweichung	29,24 ± 6,213 Jahre	30,00 ± 4,673 Jahre	35,93 ± 8,151 Jahre	32,84 ± 6,590 Jahre	37,60 ± 2,535 Jahre	32,65 ± 6,783 Jahre

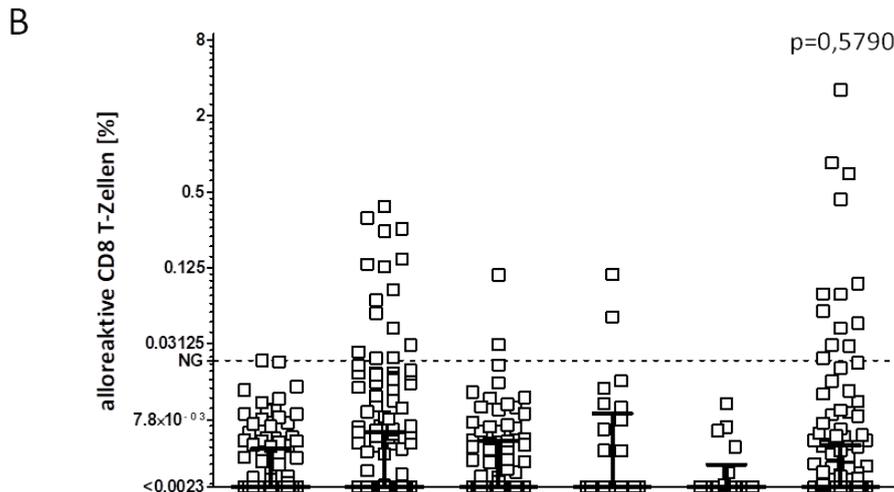
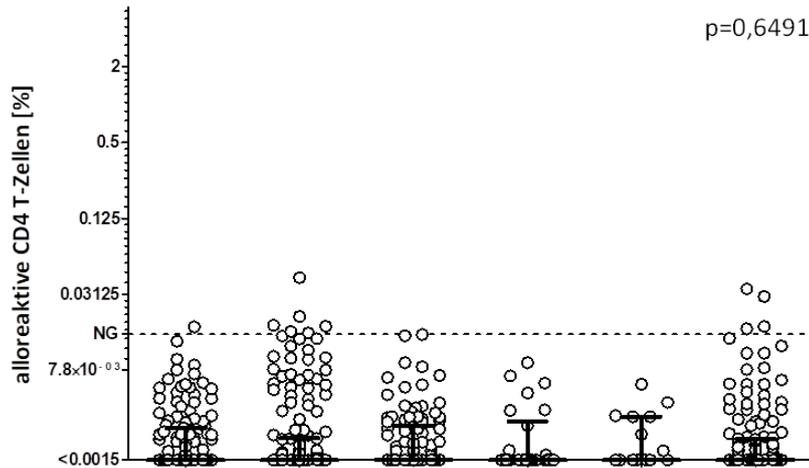
SS: Schwangerschaft
IVF: In vitro Fertilisation

Die Probandengruppen mit vorangegangener bzw. aktueller Schwangerschaft unterschieden sich nicht hinsichtlich ihres Alters, lediglich die Gruppe der Männer und der Frauen ohne Kinder wurde Alters-gematcht zu den Probandengruppen der Frauen, die schon einmal schwanger waren bzw. gerade schwanger sind. Insgesamt waren die gemessenen Frequenzen alloreaktiver CD4 und CD8 T-Zellen sehr gering und es konnten keine signifikanten Unterschiede in den CD4 und CD8 T-Zell Frequenzen zwischen den einzelnen Gruppen festgestellt werden (CD4 $p=0,6491$; CD8 $p=0,5790$; Abbildung 26A/B). Es war lediglich ein Trend sichtbar, dass Frauen, die schon einmal schwanger waren, aktuell jedoch nicht schwanger sind, etwas höhere CD4 und CD8 T-Zell Frequenzen als alle anderen Probandengruppen aufwiesen (CD4: 0,00126% vs 0,00095%; CD8: 0,00183 vs 0,00155%; Abbildung 26A/B).

Aufgrund der geringen Alloreaktivität bei CD4 T-Zellen konnte eine qualitative Analyse nur bei alloreaktiven CD8 T-Zellen erfolgen. Hierbei zeigten sich signifikante Unterschiede im prozentualen Anteil der Probanden mit einer alloreaktiven CD8 T-Zell Frequenz oberhalb der Nachweisgrenze zwischen den Gruppen ($p=0,0172$; Abbildung 26C). Frauen, die noch nie schwanger waren, zeigten in lediglich 0,94% (1/106) aller Fälle eine CD8 T-Zell Alloreaktivität über der Nachweisgrenze. Demgegenüber war der Anteil an Frauen mit CD8 Alloreaktivität über der Nachweisgrenze bei den Frauengruppen, die zum Zeitpunkt des Tests ihr erstes Kind erwarteten, deutlich höher und in ähnlicher Größenordnung wie bei Männern (Männer: 10,08% (13/129); Schwangere, die zum Zeitpunkt der Analyse erstmalig schwanger waren: 9,15% (15/164); Frauen, die aktuell nicht, aber zuvor schon einmal schwanger waren: 2,50% (2/80); Schwangere, die bereits zuvor schon einmal schwanger waren: 8,00% (2/25)). Bei keiner der 18 Frauen, die sich in der Kinderwunschklinik vorstellten, konnte eine zelluläre Alloreaktivität festgestellt werden (0,00% (0/18)). Schlussfolgernd kann gesagt werden, dass sich die alloreaktiven T-Zell Frequenzen der einzelnen Gruppen nicht unterscheiden, obgleich Frauen, die schwanger sind häufiger eine detektierbare Alloreaktivität über der Nachweisgrenze aufwiesen als Frauen, die noch nie schwanger waren oder nicht mehr schwanger sind. Interessanterweise war jedoch der Anteil an Messungen mit Alloreaktivität über der Nachweisgrenze bei Männern ähnlich groß wie bei Schwangeren. Frauen mit unerfülltem Kinderwunsch zeigten kein Auftreten alloreaktiver T-Zellen, sodass diese Analysen keinen Hinweis auf einen Zusammenhang mit der Kinderlosigkeit erlauben.

A

Aktuell schwanger	-	+	-	+	IVF	M
Vorangegangene SS	-	-	+	+	IVF	M



C

Alloreaktive CD8 T-Zellen	Noch nie schwanger	Aktuell schwanger ohne vorangegangene SS	Nicht schwanger aber vorangegangene SS	Aktuell schwanger und vorangegangene SS	Aktuell nicht schwangere Frauen aus der IVF-Klinik	Männer
\geq NG	1 (0,94%)	15 (9,15%)	2 (2,50%)	2 (8,00%)	0 (0%)	13 (10,08%)
$<$ NG	105 (99,06%)	149 (90,85%)	78 (97,50%)	23 (92,00%)	18 (100%)	116 (89,92%)

p=0,0172

Abbildung 26: Alloreaktive T-Zellen bei Schwangeren und bei Probanden ohne Schwangerschaft. Untersucht wurden alloreaktive CD4 (A) und CD8 (B) T-Zellen bei schwangeren („+“) und nicht schwangeren („-“) Frauen, bei Frauen, die sich in der Kinderwunschklinik aufgrund einer ungewollten Kinderlosigkeit vorstellten („IVF“) und bei Männern („M“) gegen bis zu fünf Third-Party Stimulatoren (Zellen von immungesunden, nicht schwangeren Frauen und Männern, wobei auch Messungen der Schwangeren gegen ihre Kindsväter enthalten sind). Alloreaktive CD4 und CD8 T-Zell Frequenzen zeigten keinen signifikanten Unterschied in den einzelnen

Probandengruppen (CD4 $p=0,6491$; CD8 $p=0,5790$). Die Daten sind als Median mit interquartilen Range (IQR) dargestellt. Die gestrichelten Linien stellen die NG zum einen für alloreaktive CD4 (0,015%), zum anderen für alloreaktive CD8 T-Zellen (0,023%) dar. **(C)** Bei einer qualitativen Analyse der CD4 und CD8 Alloreaktivität, zeigten Frauen, die noch nie schwanger waren, zu 0,94% (1/106) eine CD8 Alloreaktivität gegen Third-Party Stimulatoren. Erstmalig Schwangere hingegen (+/-) und Männer (M) zeigten eine signifikant erhöhte CD8 Alloreaktivität (Frauen +/-: 9,15% (15/164); Männer: 10,08% (13/129); $p=0,0172$) und tendenziell eine erhöhte CD4 Alloreaktivität (Frauen +/-: 3,66% (6/164); Männer: 3,10% (4/129)), allerdings sind die Fallzahlen, um eine statistische Aussage bei alloreaktiven CD4 T-Zellen treffen zu können, zu gering. IVF, Frauen, die sich in der Kinderwunschlinik aufgrund einer ungewollten Kinderlosigkeit vorgestellt hatten; M, Männer; NG, Nachweisgrenze; SS, Schwangerschaft.

5.4.2 Alloreaktive und SEB-reaktive T-Zellen im Verlauf einer Schwangerschaft

Für insgesamt 104 Frauen lagen Messungen alloreaktiver T-Zellen gegen den jeweiligen Kindsvater sowohl vor der Schwangerschaft, in den verschiedenen Schwangerschaftstrimena, als auch nach Geburt vor. Querschnittsanalysen der Messungen von Frauen in den einzelnen Zeiträumen sind in Abbildung 27A/B dargestellt. Bei den Schwangeren, die auf alloreaktive T-Zellen gegen ihren Kindsvater getestet wurden, waren die Mediane der alloreaktiven CD4 und CD8 T-Zell Frequenzen nach Geburt des Kindes höher, wenngleich diese Unterschiede keine statistische Signifikanz erreichten (CD4 $p=0,8919$; CD8 $p=0,1635$; Abbildung 27A/B). Ebenso scheinen alloreaktive CD8 T-Zellen über der Nachweisgrenze vorwiegend im letzten Trimenon bzw. in der Gruppe der Schwangeren unmittelbar nach Geburt aufzutreten, wenngleich auch diese Unterschiede nicht signifikant waren ($p=0,2570$, Abbildung 27B).

Die prozentualen Anteile SEB-reaktiver T-Zellen, die als interne Kontrolle analysiert wurden, zeigten keine Unterschiede zwischen den einzelnen Schwangerschaftsabschnitten (Abbildung 27 C/D).

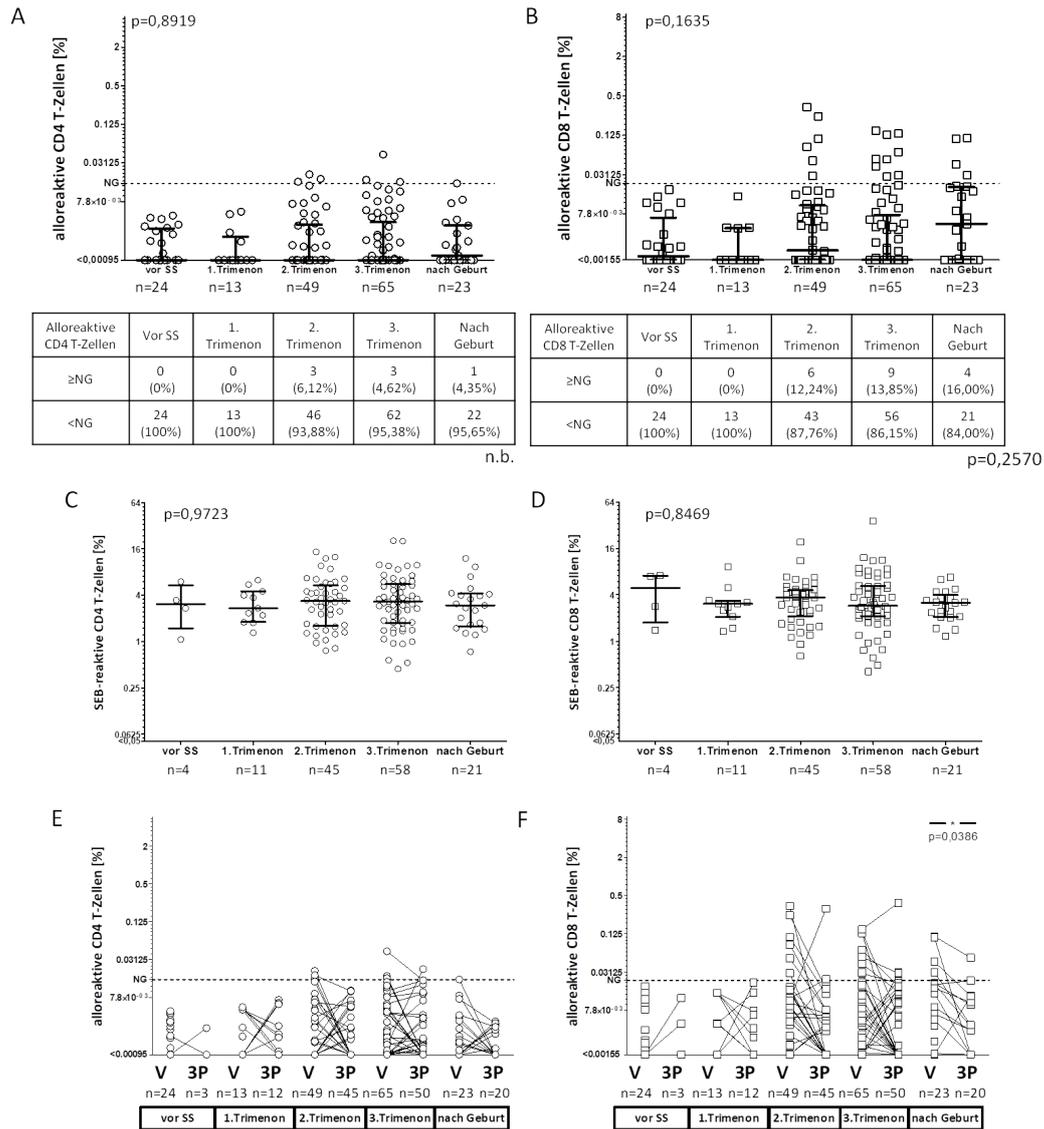


Abbildung 27: Querschnittsanalyse alloreaktiver und SEB-reaktiver T-Zellen im Verlauf einer Schwangerschaft. Alloreaktive CD4 (A) und CD8 (B) T-Zellen wurden im Querschnitt bei 104 Frauen gegen ihren Kindsvater vor, während und nach Schwangerschaft analysiert. Dabei zeigte sich kein signifikanter Unterschied beim Auftreten alloreaktiver CD4 ($p=0,8919$) und CD8 T-Zell Frequenzen ($p=0,1635$) in den einzelnen Schwangerschaftsabschnitten. Ebenso konnte beim Anteil alloreaktiver CD8 T-Zellen (über der Nachweisgrenze) kein signifikanter Unterschied zwischen den einzelnen Schwangerschaftsabschnitten festgestellt werden (CD8 $p=0,2570$). Neben alloreaktiven T-Zellen wurden zusätzlich im Querschnitt bei 94 Frauen in den einzelnen Schwangerschaftsabschnitten auch SEB-reaktive CD4 (C) und CD8 T-Zellen (D) mitgeführt, die jedoch keine Unterschiede in der SEB-Reaktivität der T-Zellen in den einzelnen Schwangerschaftsabschnitten zeigten. Alloreaktive CD4 (E) und CD8 (F) T-Zell Messungen wurden von 104 Schwangeren nicht nur gegen den Kindsvater (V), sondern auch gegen einen zum Kindsvater altersgematchten Third-Party Stimulator (immungesunder Proband; 3P) im Querschnitt analysiert. Die Frauen zeigten nach Geburt des Kindes eine signifikant erhöhte CD8 Alloreaktivität ($n=20$; $p=0,0386$) gegenüber dem Kindsvater im Gegensatz zum altersgematchten Third-Party Stimulator. Die Daten sind als Median mit interquartilen Range (IQR) dargestellt. Für die quantitative Analysen wurde ein Kruskal-Wallis Test mit anschließenden Dunn's post Test verwendet. Zur qualitativen Analyse des Zusammenhangs der Anzahl alloreaktiver T-Zellen über der NG und der verschiedenen Probandengruppen wurde der Chi-Square Test verwendet. Die gestrichelten Linien stellen die NG zum einen für alloreaktive CD4 (0,015%), zum anderen für alloreaktive CD8 T-Zellen (0,023%) dar. n, Anzahl; n.b., nicht auswertbar; NG, Nachweisgrenze; ns, nicht signifikant; * $p<0,05$; ** $p<0,01$; *** $p<0,001$; SEB, *Staphylococcus aureus* Enterotoxin B; SS, Schwangerschaft; V, Vater; 3P, Third-Party.

Neben dieser Querschnittsanalyse wurden zudem 25 Frauen vor und im Verlauf während ihrer Schwangerschaft auf alloreaktive CD4 und CD8 T-Zellen gegen ihren Kindsvater und 23 Frauen auf SEB-reaktive T-Zellen untersucht. Ähnlich wie bei der Querschnittsanalyse war die Frequenz SEB-reaktiver CD4 und CD8 T-Zellen auch in der longitudinalen Analyse im Verlauf stabil (Abbildung 28C/D), während die Frequenzen der alloreaktiven CD4 und CD8 T-Zellen der Schwangeren gegen den Kindsvater mit Fortschreiten der Schwangerschaft zunahmen (Abbildung 28A/B), wenngleich diese Zunahme wiederum keine statistische Signifikanz erreichte.

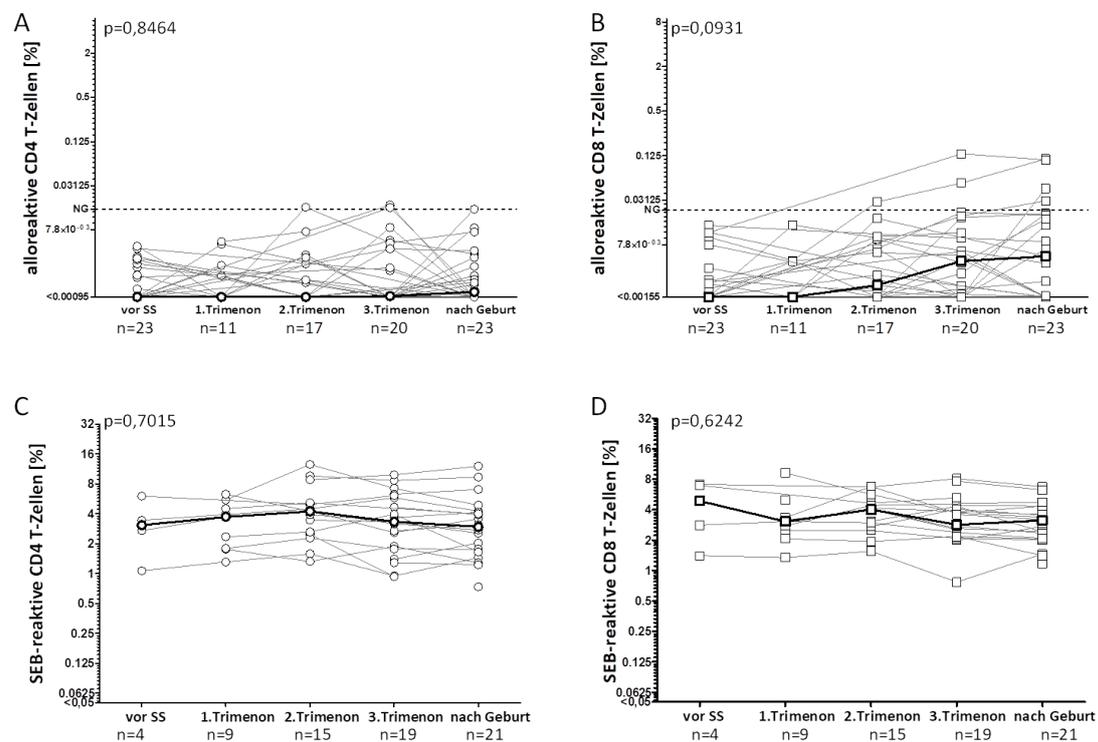


Abbildung 28: Longitudinale Analyse alloreaktiver und SEB-reaktiver T-Zellen im Verlauf einer Schwangerschaft. Alloreaktive CD4 (A) und CD8 (B) T-Zellen bei 25 Frauen wurden longitudinal (vor, im Verlauf und nach ihrer Schwangerschaft) gegen ihren Kindsvater analysiert. Es war nicht von jeder Frau zu jedem einzelnen Zeitpunkt Messungen möglich, deshalb ergaben sich 23 Messungen vor Schwangerschaft, 11 Messungen im ersten Trimenon, 17 Messungen im zweiten Trimenon, 20 Messungen im dritten Trimenon und 23 Messungen nach Geburt des Kindes gegen den Kindsvater (eine Messung nach Geburt konnte nicht stattfinden, da es zum Schwangerschaftsabbruch im 2. Trimenon kam und von einem Probandenpaar konnte keine Messung nach Geburt durchgeführt werden). Im Schwangerschaftsverlauf waren keine signifikanten Unterschiede in den alloreaktiven T-Zell Frequenzen sichtbar, tendenziell nahmen jedoch die medianen T-Zell Frequenzen bis zur Geburt zu (CD4: vor SS 0,000950%; 1. Trimenon 0,000950%; 2. Trimenon 0,000950%; 3. Trimenon 0,0009777%; nach Geburt 0,001115%; $p=0,8464$; CD8: vor SS 0,001550%; 1. Trimenon 0,001550%; 2. Trimenon 0,002235%; 3. Trimenon 0,004738%; nach Geburt 0,005507%; $p=0,0931$). Bei einer longitudinalen Analyse von 23 Frauen zeigten sich keine Unterschiede in den SEB-reaktiven CD4 (C) und CD8 T-Zell Frequenzen (D). Die Daten einer Schwangeren sind im Schwangerschaftsverlauf durch Linien verbunden dargestellt und der Median zu allen Messungen eines Zeitpunktes als dicke schwarze Linie. Für die quantitativen Analysen wurde ein Kruskal-Wallis Test mit anschließenden Dunn's post Test verwendet. Die gestrichelten Linien stellen die NG zum einen für alloreaktive CD4 (0,015%), zum anderen für alloreaktive CD8 T-Zellen (0,023%) dar. NG, Nachweisgrenze; SS, Schwangerschaft.

Zusätzlich zu den Messungen SEB-reaktiver T-Zellen und alloreaktiver T-Zellen der Schwangeren gegen den Kindsvater wurden Messungen der Schwangeren gegen Third-Party Stimulatoren mitgeführt. Es zeigte sich, dass die Gruppe der Schwangeren nach Geburt ihres Kindes eine signifikant höhere CD8 T-Zell Alloreaktivität gegen den Kindsvater im Vergleich zum Third-Party Stimulator aufwies ($n=20$; $p=0,0386$; Abbildung 27F). Zu allen anderen Schwangerschaftszeitpunkten konnte kein signifikanter Unterschied in den alloreaktiven T-Zell Frequenzen der Schwangeren gegen den Kindsvater bzw. einen mitgeführten Third-Party Stimulator festgestellt werden. Bei einigen Probandinnen war eine höhere Frequenz alloreaktiver CD8 T-Zellen gegen den Kindsvater auch bereits in früheren Trimenen zu beobachten. Umgekehrt gab es auch Probandinnen, deren Alloreaktion gegen den Vater schwächer ausfiel als die Alloreaktivität gegen Third-Party Stimulatoren. Insofern scheint die Dominanz der Alloreaktivität gegen den Kindsvater bzw. gegen irrelevante Spender interindividuell unterschiedlich auszufallen, so dass zumindest während der Schwangerschaft kein einheitliches Muster der Reaktivitäten nachweisbar war.

5.4.3 Erhöhte CD8 Alloreaktivität bei Fortschreiten einer Schwangerschaft mit einem männlichen Nachkommen

Bei der longitudinalen Analyse 25 schwangerer Frauen konnte mittels der alloreaktiven T-Zell Testungen zu keinem Zeitpunkt Unterschiede in den medianen alloreaktiven T-Zell Frequenzen bei Paaren, die einen Jungen ($n=11$) im Gegensatz zu Paaren, die ein Mädchen ($n=13$) bekamen, festgestellt werden (Abbildung 29A und B). Jedoch konnte gezeigt werden, dass Frauen mit einem männlichen Nachkommen einen signifikanten Anstieg der alloreaktiven CD8 T-Zellen, die gegen den Kindsvater gerichtet sind, im Verlauf einer Schwangerschaft vom ersten Trimenon bis hin zur Geburt aufwiesen ($p=0,0323$; Abbildung 29B). Hingegen zeigten Frauen, die ein Mädchen bekamen, diesen signifikanten Anstieg hin zur Geburt nicht ($p=0,6395$).

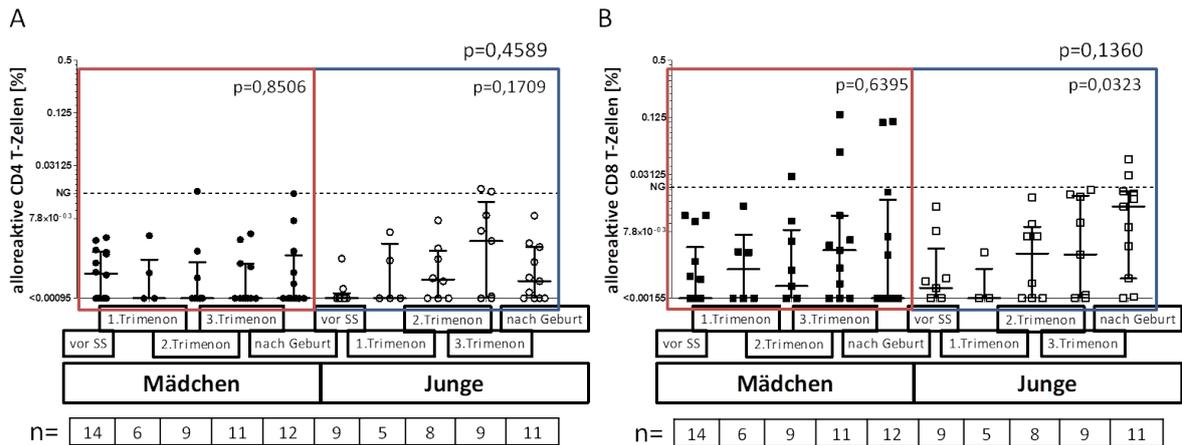


Abbildung 29: Frauen mit männlichen Nachkommen zeigten mit Fortschritt der Schwangerschaft eine erhöhte CD8 T-Zell Alloreaktivität. Alloreaktive CD4 (A) und CD8 T-Zellen (B) wurden bei 25 Frauen gegen die Kindsväter im Verlauf ihrer Schwangerschaft, sowie vor und nach Geburt des Kindes, in Hinsicht auf das jeweilige Geschlecht des Kindes, untersucht. Frauen, die einen Jungen (n=11, blauer Kasten) zur Welt brachten, zeigten während ihres Schwangerschaftsverlaufes einen signifikanten Anstieg alloreaktiver CD8 T-Zell Frequenzen ($p=0,0323$) im Gegensatz zu Frauen die Mädchen (n=13, roter Kasten) gebären ($p=0,6395$). Daten sind dargestellt als Median mit interquartilen Range. n, Anzahl; NG, Nachweisgrenze; SS, Schwangerschaft.

5.4.4 Keine Induktion alloreaktiver T-Zellen durch vorangegangene Fehlgeburten

Es wurde bei 78 Schwangeren untersucht, ob Frauen, die mindestens einen Schwangerschaftsabbruch vor ihrer aktuellen Schwangerschaft erlitten hatten (n=11), im Gegensatz zu Frauen, die noch nie einen Schwangerschaftsabbruch zuvor hatten (n=67), eine veränderte Alloreaktivität gegen den Kindsvater aufwiesen. Es zeigten sich jedoch keine Unterschiede in den alloreaktiven CD4 und CD8 T-Zell Frequenzen zwischen den beiden Gruppen (CD4 $p=0,9595$; CD8 $p=0,5845$, Daten nicht gezeigt). Da die Fallzahl der Schwangeren mit vorangegangenen Fehlgeburten sehr gering war, kann keine zuverlässige Aussage darüber getroffen werden, ob Schwangere mit vorangegangenem Schwangerschaftsabbruch ein höheres Risiko für ein häufigeres Auftreten einer zellulären Alloreaktivität haben.

6 Diskussion

6.1 Die Bedeutung der humoralen und zellulären Abstoßung in der Transplantationsmedizin

In Deutschland werden pro Jahr etwa 2000 Nieren transplantiert [6]. Trotz optimaler Verfügbarkeit immunsuppressiver Medikamente liegt die akute Abstoßungsrate nach einer Nierentransplantation nach wie vor bei etwa 10% innerhalb des ersten Jahres nach Transplantation [112, 113]. Bei anderen soliden Organen wie der Lunge liegt die akute Abstoßungsrate bei bis zu 36% [114, 115] und bei Lebertransplantierten sogar zwischen 20-60% [116-118]. Das Risiko einer akuten humoralen Abstoßungsreaktion nach Nierentransplantation kann durch die Bestimmung präformierter alloreaktiver Antikörper im Rahmen einer quartalweisen Bestimmung von Panel-reaktiven Antikörpern (PRA) und mittels Crossmatch abgeschätzt werden. Obwohl ein deutlicher Zusammenhang zwischen einer präformierten zellulären Alloreaktion und zellulären Abstoßungsereignissen besteht [101, 119], wird der Nachweis alloreaktiver T-Zellen noch nicht standardmäßig bei Patienten vor Organtransplantationen durchgeführt, da keine routinetauglichen Verfahren zum Nachweis einer zellulären Alloreaktivität existieren.

6.2 Verfahren zur Vorhersage einer zellulären Abstoßungsreaktion

In dieser Arbeit wurde ein neues Verfahren zum Nachweis einer Alloreaktion für die Anwendung in der klinischen Routine entwickelt. Es existierten zwar bereits seit längerer Zeit Methoden zur Bestimmung einer zellulären Alloreaktivität, diese sind jedoch nicht für den Einsatz in der klinischen Routine geeignet. Geläufige Testprinzipien beruhen auf einer Kokultur der Empfängerzellen mit den Spenderzellen in einer gemischten Lymphozytenreaktion. Zu diesen Methoden, die eine Kultivierungszeit über mehrere Tage benötigen, zählen Proliferationsmethoden [117] und Limiting Dilution Analysen [120]. Aufgrund ihrer hohen individuellen Variabilität und ihrer Zell-Kultivierungszeit über mehrere Tage sind diese Verfahren jedoch nicht als Testprinzipien für den klinischen Routine-Alltag verwendbar, da bei einer Transplantation, vor allem wenn es sich um eine Verstorbenenpende handelt, innerhalb weniger Stunden ein Ergebnis vorliegen sollte. Neben diesen Langzeit-Kulturmethode erlangen Kurzzeit-Methoden zum Nachweis Antigen-spezifischer T-Zellen auf Basis einer Zytokininduktion immer weitere Verbreitung.

Diese Methoden sind nicht nur geeignet, um eine zelluläre Immunität gegen Pathogene zu identifizieren [121], sondern können auch zur Quantifizierung einer zellulären Alloreaktivität eines Empfängers gegen seinen Spender angewandt werden. Die Zytokin-Induktion nach Stimulation der Empfängerzellen mit Zellen des Spenders kann entweder über das ELISPOT-Verfahren oder über intrazelluläre Zytokinfärbung mittels Durchflusszytometrie gemessen werden. Im Vergleich zu den Langzeit-Kulturmethode bieten diese Verfahren eine Zeitersparnis, die die Möglichkeit bietet, die Ergebnisse in das Posttransplant-Management mit einzubeziehen. Darüber hinaus sind diese Methoden auch besser in den Routine-Alltag eines Labors integrierbar und erlauben eine Quantifizierung alloreaktiver Zellen auf Einzelzellebene. Beim Vergleich der ELISPOT-Methode und der durchflusszytometrischen Methode, die in dieser Arbeit etabliert wurde, zeigen sich jedoch auch Unterschiede im technischen Prozedere, die einen Einfluss auf die Anwendung in einem klinischen Setting haben. Im Gegensatz zur durchflusszytometrischen Methode, die direkt aus dem Vollblut durchgeführt werden kann, müssen für die Anwendung des ELISPOT-Verfahrens PBMC isoliert werden. Zudem müssen die Stimulatorzellen funktionell inaktiviert werden, da lediglich die Zytokinproduktion der Empfängerzellen von Interesse ist. Diese Inaktivierung der Stimulatorzellen erfolgt entweder durch Bestrahlung oder durch eine Behandlung mit Mitomycin [99, 122, 123]. Da bei der durchflusszytometrischen Methode die Zellstimulation direkt im Vollblut stattfindet, kann auf eine aufwendige Zellisolation verzichtet werden. Ebenso müssen die Stimulatorzellen nicht inaktiviert werden. Eine einfache Vorfärbung der Stimulatorzellen mit einem Fluorochrom-gekoppelten Antikörper gegen den Pan-Leukozytenmarker CD45 reicht aus, um nach der Stimulation Zytokin-produzierende Empfänger- und Spenderzellen unterscheiden zu können. Dieses Zwei-Wege „Mixed Lymphocyte Reaction (MLR)“ Verfahren bietet somit nicht nur die Möglichkeit eine Host-versus-Graft Reaktion, sondern auch eine Graft-versus-Host Reaktion (GvHR) vorherzusagen [124-128]. Eine GvHR kann auftreten sobald T-Lymphozyten des Spenders das Empfängergewebe als fremd erkennen und dieses schädigen. Bei HLA-kompatiblen Spenden kommt diese häufiger vor als bei HLA-inkompatiblen Spenden [125], können jedoch auch durch Nebenhistokompatibilitätsantigene vermittelt werden. Wenngleich eine Graft-versus-Host Reaktion bei soliden Organen sehr selten vorkommt, bietet dieses Verfahren insbesondere bei Patienten nach Stammzelltransplantation Vorzüge, bei denen die Graft-versus-Host Reaktion eine häufige und ernstzunehmende klinische Komplikation darstellt

[129]. Bei den soliden Organtransplantationen kommt eine Graft-versus-Host Reaktion nach Lebertransplantationen mit 1-2% der Fälle [130] häufiger vor als nach Lungen- oder Nierentransplantationen [124, 131]. Trotz des sehr seltenen Auftretens bei soliden Organen hat die GvHR vor allem bei Patienten nach Lebertransplantation eine hohe Mortalität, da 30% aller Patienten mit einer Graft-versus-Host Erkrankung sterben [124, 128].

6.3 Vorteile der durchflusszytometrischen Vollblutmethode gegenüber weiteren Kurzzeit-Methoden

Neben der Möglichkeit zur simultanen Quantifizierung einer Host-versus-Graft und einer Graft-versus-Host Reaktion erlaubt die durchflusszytometrische Methode zudem eine gleichzeitige Analyse von CD4 und CD8 T-Zellen mitsamt deren Funktionalitäten und Phänotypisierungen durchzuführen. Bei einem Vergleich der Zytokin-basierten Vollblutmethode mit einer CFSE-basierten Proliferationsmethode zeigte sich in dieser Arbeit eine deutliche Korrelation im prozentualen Anteil Zytokin-positiver T-Zellen und dem prozentualen Anteil proliferierender Zellen ($p < 0,0001$; $r = 0,6288$). Zur Identifikation alloreaktiver T-Zellen im durchflusszytometrischen Vollblutverfahren ist ebenso wie beim ELISPOT-Testverfahren [99] die T-Zell Expression des Zytokins IFN- γ am besten geeignet [107, 111]. Dieses Zytokin zeigte im Vergleich zu den weiteren getesteten Zytokinen TNF- α , IL-2 und IL-4 die höchste Sensitivität und den größten Quotienten zwischen allo- und autoreaktiven CD8 T-Zellen. Zur Erhöhung der Spezifität wurde zusätzlich noch die T-Zell Aktivierung mittels des Aktivierungsmarkers CD69 erfasst, so dass lediglich CD69/IFN- γ doppelt positive T-Zellen als alloreaktiv quantifiziert wurden [132]. Aufgrund der kurzen Stimulationszeit von lediglich sechs Stunden werden vorwiegend alloreaktive Effektor T-Gedächtnis Zellen und keine naiven T-Zellen detektiert [133, 134], die eine Stimulationszeit von mindestens 16 Stunden benötigen würden [135].

Die durchflusszytometrische Methode zur Bestimmung alloreaktiver CD4 und/oder CD8 T-Zellen aus Vollblut, die im Rahmen dieser Arbeit etabliert und evaluiert wurde, stellt eine Weiterentwicklung einer Methode aus unserer Arbeitsgruppe dar, die auf einer Stimulation von isolierten PBMC beruht [107]. Diese Weiterentwicklung erweist sich als vorteilhaft, da lediglich geringe Blutmengen von Spender und Empfänger benötigt werden und die Verarbeitungszeit geringer wird, da ein weiterer zeitaufwändiger Schritt einer PBMC Isolation entfällt. Beide Verfahren sind in ihrer Aussagekraft identisch, denn bei einem

direkten Vergleich der Vollblut- mit der PBMC-Methode konnte eine gute Korrelation zwischen den alloreaktiven CD4 und CD8 T-Zell Ergebnissen der beiden Testprinzipien festgestellt werden (n=188 Messungen; alloreaktive CD8 T-Zellen $r=0,27$, $p=0,0002$; alloreaktive CD4 T-Zellen $r=0,18$, $p=0,016$; Daten nicht gezeigt). Wenngleich kein direkter Vergleich zwischen dem ELISPOT-Verfahren und der durchflusszytometrischen Vollblutmethode vorgenommen wurde, existiert ein Vergleich des ELISPOT-Verfahrens mit der durchflusszytometrischen PBMC-Methode. Dieser zeigt ebenfalls eine signifikante Korrelation zwischen den Messergebnissen alloreaktiver CD3 T-Zellen bei 35 unabhängig voneinander getesteten Stimulationsreaktionen ($r=0,42$; $p=0,01$) [107]. Da kein direkter Vergleich der durchflusszytometrischen Vollblutmethode mit dem ELISPOT-Verfahren vorhanden ist, wurden die beiden Methoden anhand ihrer Nachweisgrenzen gegeneinander abgewogen. Bei ELISPOT-Messungen werden üblicherweise 20-25 Spots/300.000 Zellen als Nachweisgrenze definiert [99, 102, 104]. Wenn von einem CD4 zu CD8 T-Zell Verhältnis von 2:1 ausgegangen wird und innerhalb der PBMCs 45-70% T-Zellen zu erwarten sind, dann liegt die von uns definierte Nachweisgrenze für eine positive T-Zell Antwort (CD4 und/oder CD8) zwischen 23-35 IFN- γ Spots pro 300.000 PBMC, so dass die Nachweisgrenzen in beiden Verfahren in einer ähnlichen Größenordnung liegen. In klinischen Studien sollte zudem eine klinisch relevante Nachweisgrenze etabliert werden. In einer Studie bei 118 Nierentransplantatempfängern (Verstorbenenenspenden) konnte mittels des IFN- γ -ELISPOTs bei einer Nachweisgrenze von 25 Spots/300.000 Zellen bei 39 (33,05%) Patienten eine Alloreaktivität nachgewiesen werden [136]. Allerdings zeigten nur 14 von 39 positiv getesteten Patienten eine akute Abstoßungsreaktion (36%). Dies lässt vermuten, dass diese Nachweisgrenze zu sensitiv gewählt ist, was zu unserer ermittelten Nachweisgrenze der alloreaktiven Frequenzen in der durchflusszytometrischen Vollblutmethode passen würde. Dort haben wir bei einer entsprechenden Umwandlung unserer prozentualen Nachweisgrenze in IFN- γ -Spots ermittelt, dass erst bei einem Auftreten von 23-35 IFN- γ -Spots pro 300.000 Zellen eine klinisch relevante Alloreaktivität vorliegt und nicht bei 25 IFN- γ -Spots pro 300.000 Zellen wie es in der Publikation von Hricik et al. der Fall ist [136].

Neben den hier etablierten durchflusszytometrischen PBMC- und Vollblut-Methoden auf Basis einer Zytokin-Induktion existieren noch weitere durchflusszytometrische Methoden zum Alloreaktivitätsnachweis, die auf der Antigen-spezifischen Induktion von CD154 oder CD137 (Mitglieder der Tumor Necrose Faktor Rezeptor (TNFR) Familie) beruhen [137, 138].

Ähnlich wie bei der von uns etablierten Methode handelt es sich um eine zwei Wege MLR, bei der Stimulatorzellen nicht inaktiviert, sondern einer Vorfärbung mit CFSE unterzogen wurden. Da die Expression von CD154 lediglich nach Stimulation alloreaktiver CD4 T-Zellen induziert wird, können mit diesem Aktivierungsmarker keine alloreaktiven CD8 T-Zellen nachgewiesen werden [137]. Demgegenüber ist jedoch CD137 sowohl zur Detektion aktivierter CD4 als auch CD8 T-Zellen geeignet [138]. Die Induktion von CD137 erfordert jedoch eine Stimulationszeit von mindestens 24 Stunden, so dass diese Methode ebenfalls die Verwendung isolierter PBMC erfordert [138]. Durch die verlängerte Stimulationszeit war jedoch das Ausmaß einer unspezifischen Reaktion höher. Zudem besteht die Möglichkeit, dass auch naive T-Zellen induziert werden, so dass sich dieser Marker nicht als optimal für eine Messung präformierter alloreaktiver T-Zellen im Setting einer Transplantation erwies [138].

6.4 Limitierungen und Vorzüge der Zytokin-basierten Vollblutmethode

Ebenso wie die beiden eben genannten durchflusszytometrischen Methoden zum Nachweis zellulärer Alloreaktivität hat auch die hier entwickelte durchflusszytometrische Vollblutmethode Limitierungen. Eine Voraussetzung, um diese Methode durchzuführen, ist das Vorhandensein eines in der Erstsanschaffung kostenintensiven Durchflusszytometers und wissenschaftlichen Fachpersonals für den Umgang mit dem Gerät. Auch wenn die autoreaktiven Messungen dieser Arbeit im Gegensatz zur CD137 Expressions-Methode [138] nur sehr selten Hintergrundreaktivitäten aufwiesen, waren die Frequenzen reaktiver T-Zellen bei den meisten Probanden naturgemäß unterhalb oder in der Nähe der Nachweisgrenze. Diese Verteilung lässt vermuten, dass die messbare Frequenz alloreaktiver T-Zellen im Bereich der Nachweisgrenze auch anfällig sein kann für Störfaktoren. Wie sich durch die *in vitro* Experimente gezeigt hat, kann die Einnahme von immunsuppressiven Medikamenten vor der Blutentnahme einen negativen Einfluss auf die Reaktivität der Zellen haben. Zudem kann die Wahl des Antikoagulans (Heparin versus EDTA-Monovetten) bei der Blutentnahme Einfluss auf das Ergebnis nehmen. Zudem sollte das Blut bis zur Verarbeitung kühl gelagert werden und nicht älter als 24 Stunden sein, um noch eine ausreichende Funktionalität der Zellen zu gewährleisten. Bei unsachgemäßer oder zu langer Lagerung besteht daher ebenfalls die Gefahr, dass die Frequenz detektierbarer T-Zellen unter die Nachweisgrenze fällt.

Trotz der oben genannten Limitierungen könnte das Vollblutverfahren optimale Voraussetzungen für einen diagnostischen Test zum Nachweis einer präformierten Alloreaktivität eines Empfängers gegen seinen Spender bieten und damit zur Abschätzung des Risikos einer Abstoßungsreaktion nach solider Organtransplantation beitragen. Funktionelle alloreaktive T-Zellen können innerhalb eines Arbeitstages nach sechs Stunden Stimulation ohne Einflussfaktoren, die durch Zellisolation oder eine verlängerte *in vitro* Kultivierungszeit entstehen, identifiziert werden.

6.5 Charakteristika alloreaktiver T-Zellen

6.5.1 Immunsuppressive Medikamente können alloreaktive T-Zellen inhibieren

Durch die Anwendung von Vollblut kann eine direkte Untersuchung der inhibitorischen Effekte von verschiedenen immunsuppressiven Medikamenten auf alloreaktive T-Zellen unter nahezu physiologischen Bedingungen untersucht werden. So lassen sich alloreaktive CD8 T-Zellen in der Vollblut-Stimulation sowohl durch Calciumneurininhibitoren als auch Steroide *in vitro* inhibieren, allerdings zeigen sich individuelle Unterschiede bei der Wirkung der immunsuppressiven Medikamente auf die Zellen der verschiedenen Probanden. Die inhibitorischen Effekte der Immunsuppression auf alloreaktive T-Zellen sind vergleichbar mit gemessenen inhibitorischen Effekten auf Antigen-spezifische Effektor T-Zellen gegen CMV, Tuberkulose und polyklonale Stimuli [139-141]. Diese Experimente zeigen auch, dass alloreaktive T-Zellen durch immunsuppressive Medikamente inhibierbar sind, welche standardmäßig nach Transplantation eingesetzt werden, was auch für die Therapie von Abstoßungsreaktionen relevant ist.

6.5.2 Alloreaktive CD8 T-Zellen dominieren über alloreaktive CD4 T-Zellen

Bei den Messungen alloreaktiver T-Zellen zeigte sich eine Dominanz alloreaktiver CD8 T-Zellen gegenüber CD4 T-Zellen. Diese Beobachtung stimmt mit den Ergebnissen aus Langzeit-Stimulationen überein, bei denen die Expression von IFN- γ , Granzym und Perforin in CD4 T-Zellen geringer war als die der CD8 T-Zellen [134]. Sowohl die CD4 als auch die CD8 T-Zellen können zu Abstoßungsereignissen führen. CD8 T-Zellen spielen dabei vorwiegend eine Rolle bei der direkt vermittelten frühen akuten Abstoßungsreaktion. MHC Klasse I Moleküle werden auf endothelialen Zellen des Spenders exprimiert und CD8 T-Zellen präsentiert, die dann direkt eine Zytotoxizität einleiten. Alloreaktive CD4 T-Zellen tragen meist indirekt durch

die Sekretion von Zytokinen zu Abstoßungsreaktionen bei. Die Zytokine haben einen unterstützenden Effekt auf CD8 T-Zellen und auf B-Zellen, die ihrerseits zur Produktion von Antikörpern angeregt werden [142]. Da in unserer durchflusszytometrischen Vollblutmethode die Spenderzellen (Spender Antigenpräsentierenden Zellen) direkt zu den Empfängerzellen (Empfänger T-Zellen) gegeben werden, werden den Empfänger T-Zellen intakte Spender-HLA-Peptidkomplexe auf den APZ des Spenders präsentiert. Wenngleich eine zusätzliche Prozessierung von Spenderantigenen und Präsentation in Empfänger APZ nicht ausgeschlossen werden kann, wird vermutlich hauptsächlich die direkte Allogenerkennung angesprochen, bei der es keiner Aufnahme und Prozessierung der Spenderantigene bedarf. Diese Tatsache könnte die bestehende CD8 T-Zell Dominanz erklären. Des Weiteren kann die Länge der Peptide, die an MHC-Moleküle gebunden werden, Ursache für die CD8 T-Zell Dominanz sein. So erkennen CD4 T-Zellen MHC Klasse II Moleküle mit Peptiden einer Länge von etwa 15 Aminosäuren, während CD8 T-Zellen durch MHC Klasse I Moleküle mit Peptiden einer Länge von lediglich 8-10 Aminosäuren stimuliert werden [32, 67]. Die kürzeren Peptide können häufiger zu einer Antwort kreuzreagierender T-Zellen aus vorangegangenen Infektionen führen und somit die Dominanz der alloreaktiven CD8 T-Zellen gegenüber alloreaktiven CD4 T-Zellen erklären [107].

6.5.3 Ursachen für das häufigere Auftreten alloreaktiver T-Zellen bei niereninsuffizienten Patienten gegenüber immungesunden Probanden

Neben der Dominanz alloreaktiver CD8 T-Zellen zeigte sich, dass eine Alloreaktion häufiger bei Patienten mit Niereninsuffizienz auf der Transplantationswarteliste beobachtet wurde als bei immungesunden Probanden. Dabei war nicht nur der prozentuale Anteil an Probanden mit nachweisbarer Alloreaktivität erhöht, sondern bei Patienten war auch die Frequenz alloreaktiver CD4 und CD8 T-Zellen höher als bei gesunden Kontrollen. Ähnliche Ergebnisse wurden auch mittels einer IFN- γ ELISPOT-Methode erzielt [143]. Dabei wiesen Patienten mit Niereninsuffizienz häufiger eine Alloreaktivität gegen Third-Party Stimulatoren auf als immungesunde Probanden [143]. Das erhöhte Ausmaß einer zellulären Alloreaktivität als Folge einer Expansion alloreaktiver T-Zellen bei Patienten der Nieren-Transplantationswarteliste kann mehrere Ursachen haben [144, 145]. So können vermehrt alloreaktive T-Zellen durch Kreuzreaktivitäten gegen Pathogene oder umweltbedingte Antigene [143, 144, 146] und/oder durch weitere immunisierende Ereignisse wie

vorangegangene Schwangerschaften, Bluttransfusionen oder Transplantationen bedingt sein. Sowohl Bluttransfusionen als auch Transplantationen treten bei Patienten auf der Transplantationswarteliste häufiger auf als bei immungesunden Probanden. Beim direkten Vergleich von Patienten mit und ohne nachweisbare Alloreaktivität konnten wir in unserer Studie jedoch keine Unterschiede in der Häufigkeit von Schwangerschaften, Bluttransfusionen oder vorangegangenen Transplantationen feststellen. Dies könnte an der sehr geringen Fallzahl an Patienten mit einer Zweit- oder Dritt-Transplantation liegen. Zudem ist denkbar, dass die Angaben zur Häufigkeit von vorangegangenen Bluttransfusionen unterschätzt wurden, da diese Informationen anamnestisch von den Patienten selbst und nicht aus den Krankenakten erhoben wurden. Eine stärkere Alloreaktivität kann zudem durch eine Immunseneszenz bedingt sein, die durch die Urämie begünstigt wird. Hieraus ergibt sich eine Akkumulation von terminal differenzierten Effektor T-Zellen und eine Abnahme in der Polyklonalität des T-Zell Pools [147, 148], die durch Pathogene wie Herpesviren begünstigt wird [149-151]. Da diese Pathogen-spezifischen T-Zellen auch mit Alloantigenen kreuzreagieren können [69, 134, 146, 152, 153], könnten diese zu einer Akkumulation alloreaktiver T-Zellen bei chronischer Niereninsuffizienz beitragen. Andere Arbeitsgruppen konnten auch eine Korrelation der Alloreaktivität mit der Dialysedauer beobachten [100, 143]. Urämische Toxine, Dialyseinstrumente und Wasserkontaminationen bei chronischer Hämodialyse können zu komplexen immunologischen Effekten führen, wie chronischen Entzündungen, erhöhte Exposition mit infektiösen Erregern, Komplementaktivierung und einer Hochregulation von Adhäsionsmolekülen auf Leukozyten. Durch die so wiederholte Antigen-Stimulation und Bystander Aktivierung bei chronischen Entzündungen kann es zu einer erhöhten Frequenz kreuzreagierender alloreaktiver T-Zellen bei Hämodialyse-Patienten kommen [143]. In unserem Probandenkollektiv konnte diese Korrelation jedoch nicht festgestellt werden ($p=0,1116$; Tabelle 8), denn es gab keine signifikanten Unterschiede in der Dialysedauer bei Patienten die eine Alloreaktivität aufwiesen im Gegensatz zu Patienten ohne Alloreaktivität.

6.5.4 Verteilung alloreaktiver CD4 und CD8 T-Zellen bei immungesunden und niereninsuffizienten Patienten

Bei der simultanen Analyse alloreaktiver CD4 und CD8 T-Zellen konnte gezeigt werden, dass nur 2,15% der Patientenpaarungen der Nieren-Transplantationswarteliste sowohl eine

alloreaktive CD4 als auch CD8 T-Zell Antwort aufwiesen (18 von 838 Messungen). Daher scheinen die meisten Patienten entweder eine CD4 oder eine CD8 T-Zell Antwort aufzuweisen. Als weitere Besonderheit zeigte sich, dass bei Patienten der Nieren-Transplantationswarteliste mit nachweisbaren alloreaktiven CD8 T-Zellen nur wenige eine quantitativ hohe CD8 T-Zell Alloreaktivität aufwiesen (55 von 838 Messungen (6,56%)). Bedeutsam war, dass sich diese hochfrequenten Messungen auf lediglich 8 der 84 Patienten verteilten. Diese hohe Frequenz alloreaktiver CD8 T-Zellen zeigten die betroffenen Patienten dann auch gegen nahezu alle potentiellen Spender. Demgegenüber konnten derart hohe Frequenzen alloreaktiver CD8 T-Zellen bei immungesunden Probanden kaum beobachtet werden (lediglich 6 von 1044 Messungen (0,58%)). Auch war bei Immungesunden lediglich in einer von 1044 Messungen (0,10%) sowohl alloreaktive CD4 als auch CD8 T-Zellen nachweisbar. Dies könnte an den generell geringeren Frequenzen alloreaktiver T-Zellen bei immungesunden Probanden liegen.

6.5.5 Alloreaktive T-Zellen bei Leber- und Lungeninsuffizienten Patienten

Neben den Patienten der Nieren-Transplantationswarteliste und den immungesunden Probanden, mit denen die Etablierungsarbeiten zur Methode und die grundlegende Charakterisierung alloreaktiver CD4 und CD8 T-Zellen durchgeführt wurden, wurden Patienten auf der Leber- und Lungen-Transplantationswarteliste auf ihr alloreaktives T-Zell Potential untersucht. Der Anteil an Patienten auf der Leber-Transplantationswarteliste mit nachweisbarer CD4 und CD8 T-Zell Alloreaktivität und die Frequenz alloreaktiver T-Zellen ähnelte der Situation bei immungesunden Probanden. Demgegenüber zeigten Patienten der Lungen-Transplantationswarteliste eine signifikant erhöhte Frequenz alloreaktiver CD4 T-Zellen im Vergleich zu immungesunden Probanden. Außerdem konnte bei Patienten der Lungen-Transplantationswarteliste im Vergleich zu immungesunden Probanden und Patienten der Leber-Transplantationswarteliste sehr viel häufiger alloreaktive CD4 und CD8 T-Zellen über der Nachweisgrenze detektiert werden. Im Vergleich zu Patienten der Nieren-Transplantationswarteliste zeigten Patienten der Lungen-Transplantationswarteliste beinahe genauso häufig alloreaktive CD8 T-Zellen (14,80% vs 12,94%) und sogar noch häufiger alloreaktive CD4 T-Zellen (4,06% vs 7,06%). Diese gesteigerte CD4 Alloreaktivität und hohe CD8 Alloreaktivität bei Patienten der Lungen-Transplantationswarteliste könnte zum einen bei einer Transplantation aufgrund der Größe des transplantierten Organes und der damit

verbundenen gesteigerten Anzahl Antigenpräsentierender Zellen, die fremdes - vom Spender stammendes Material - präsentieren können, zusammenhängen [154-156]. Außerdem wird postuliert, dass eine akute Abstoßungsreaktion eines Lungentransplantates hauptsächlich über den direkten Allogenerkennungsweg vermittelt wird, da das Lungentransplantat eine hohe Anzahl an APZ des Spenders enthält, die eine hohe Anzahl intakter Spender MHC-Moleküle präsentieren und kostimulatorische Wirkung auf T-Zellen ausüben können [157]. Jedoch kann die Organgröße und die damit verbundene hohe Anzahl der APZ des Spenders nicht die Erklärung für die hohe Alloreaktivität unserer Patienten auf der Lungen-Transplantationswarteliste sein, denn diese waren zum Zeitpunkt der Analyse noch nicht transplantiert. Eventuell könnte das häufigere Auftreten von alloreaktiven Zellen durch vermehrte respiratorische Infektionen erklärt werden. So kommen Patienten der Lungen-Transplantationswarteliste möglicherweise häufiger mit Antigenen respiratorischer Erreger in Kontakt, was zu einer vermehrten Kreuzreaktivität führen kann. Alternativ kommt es durch vermehrte Infektionen zu einem verstärkten proinflammatorischen Milieu, was ebenso eine gesteigerte Alloreaktion begünstigen könnte. Zudem könnte der anhaltende chronische Entzündungsprozess bei Patienten im Endstadium der Lungenerkrankung zu einem vermehrten Auftreten von Autoimmunerkrankungen führen, was wiederum eine zelluläre Alloreaktivität durch eine gestörte Selbsttoleranz begünstigt [158].

6.5.6 Anwendung alloreaktive T-Zellen zur frühzeitigen Identifizierung von Patienten mit Risiko einer akuten Abstoßungsreaktion

Transplantat-Abstoßungsreaktionen können sowohl durch alloreaktive Antikörper als auch durch alloreaktive T-Zellen hervorgerufen werden. Um humorale Abstoßungsreaktionen zu vermeiden werden Patienten auf der Nieren-Transplantationswarteliste routinemäßig auf Panel-reaktive Antikörper (PRA; vor Transplantation) und im Falle einer Transplantation auf Donor-spezifische Antikörper (DSA) getestet. Demgegenüber wird das Risiko einer zellulär-vermittelten Immunität im Setting einer Transplantation in der klinischen Routine nicht erfasst, obwohl gezeigt wurde, dass alloreaktive T-Zellen auch in Abwesenheit von DSA auftreten können und mit akuten Abstoßungsereignissen assoziiert sind [111, 122, 159-162]. Eine zelluläre Alloreaktion kann folglich nicht durch die Bestimmung von DSA vorhergesagt werden und nimmt dennoch eine wichtige Rolle bei Transplantat-Abstoßungsreaktionen ein. Auch bei unseren Messungen sahen wir keinen signifikanten Zusammenhang zwischen dem

Auftreten präformierter alloreaktiver T-Zellen und dem Vorhandensein von PRA (alloreaktive CD8 T-Zellen und aktuelle PRA: $p=0,3154$; und max. PRA: $p=0,3659$; Tabelle 8). In ähnlicher Weise konnten Poggio et al bei 54% der niereninsuffizienten Patienten ($n=41$) PRA und bei 46% PRT (Panel-reaktive T-Zellen (PRT), definiert als Reaktivität gegen $\geq 40\%$ der Stimulatoren) nachweisen, jedoch bei lediglich 12% sowohl alloreaktive T-Zellen als auch PRA detektieren [163]. Das Ziel der Bestimmung von PRA und des HLA-Matching besteht darin, das immunologische Risiko einer Abstoßungsreaktion eines Empfängers gegen seinen Spender zu minimieren. Obwohl eine Studie mit mehreren tausend Nierentransplantierten Patienten eine direkte Korrelation zwischen dem Transplantat-Überleben und einer steigenden Anzahl an HLA-Mismatches zeigte [110], ist eine vollständige Übereinstimmung der HLA-A, -B und -DR Loci zwischen Empfänger und Spender auf individueller Ebene kein Garant für ein erfolgreiches Transplantat-Überleben. So können selbst bei einer kompletten Übereinstimmung auch Nebenhistokompatibilitätsantigene einen Einfluss auf das Transplantat-Überleben ausüben [164]. Unsere Daten bei Immungesunden und bei Patienten mit Niereninsuffizienz zeigen, dass alloreaktive T-Zellen zwar häufiger bei Stimulationsreaktionen mit einer höheren Anzahl an HLA-A, -B und -DR-Mismatches (≥ 4 MM) auftraten, jedoch konnte durch die Anzahl der HLA-Mismatches nicht auf individueller Ebene eine präformierte zelluläre Alloreaktivität vorhergesagt werden. Bei Patienten der Leber- und Lungen-Transplantationswarteliste konnte kein Zusammenhang zwischen dem vermehrten Auftreten alloreaktiver T-Zellen und einer hohen HLA-MM Anzahl festgestellt werden, was möglicherweise an der geringeren Fallzahl an HLA-typisierten Patienten liegt.

Das akute Abstoßungsrisiko nach einer Nierentransplantation liegt derzeit durch das HLA-Matching sowie durch Bestimmung der PRA und DSA bei ca. 10-18% [46, 165], während die meisten Patienten keine akuten Abstoßungsreaktionen erleiden. In unserer Serie bei Patienten mit terminaler Niereninsuffizienz zeigte ein Großteil der getesteten Patienten keine präformierte Alloreaktivität. Interessanterweise stimmt jedoch der prozentuale Anteil an Abstoßungsreaktionen in etwa mit dem Anteil an Patienten mit deutlich nachweisbaren alloreaktiven T-Zellen überein. So zeigen etwa 6% (5/84) der Patienten auf der Nieren-Transplantationswarteliste eine hohe Frequenz alloreaktiver CD8 T-Zellen gegen die meisten Third-Party Stimulatorzellen, was auf eine breite zelluläre Sensibilisierung dieser Patienten gegen ein großes Panel an möglichen Spendern hinweist. Diese Patienten haben vermutlich

das höchste Risiko einer zellulären Abstoßungsreaktion. Ein weiterer Anteil von Patienten (30,95%, 26/84) zeigte alloreaktive CD8 T-Zell Reaktivitäten gegen lediglich einzelne Stimulatoren. Diese Patienten könnten im Falle einer Transplantation ebenso eine Abstoßungsreaktion entwickeln, jedoch vermutlich lediglich gegen die Spender, bei denen eine Alloreaktivität messbar war. Diese Daten lassen, ebenso wie die Alloreaktivitätsmessungen im Zusammenhang mit HLA-Mismatchen, wiederum darauf schließen, dass Patienten mit Risiko einer zellulären Abstoßungsreaktion durch Bestimmung einer präformierten Alloreaktivität vor Transplantation möglicherweise besser als über HLA-Matching identifiziert werden können. Im Rahmen dieser Arbeit wurden auch einige Patienten nach Transplantation nachverfolgt. So zeigte nur einer der vier Lungentransplantierten Patienten eine zelluläre Alloreaktivität vor Transplantation mit einer einhergehenden Abstoßungsreaktion nach Transplantation. Die anderen drei Lungentransplantierten Patienten zeigten weder alloreaktive T-Zellen noch eine Abstoßungsreaktion innerhalb des ersten Jahres nach Transplantation. Möglicherweise hätte bei diesem einen Lungentransplantierten (Fallbeispiel #1), der eine präformierte CD8 T-Zell Alloreaktivität gegen 6 von 7 Spendern aufwies, die Abstoßungsreaktion frühzeitig erkannt bzw. der Transplantatempfänger als Risikopatient bereits vor Transplantation identifiziert werden können. Als Konsequenz hätte man die Abstoßungsreaktion durch eine frühzeitige Abstoßungstherapie mit intensiverer Immunsuppression oder T-Zell Depletions-Therapie unmittelbar vor/nach Transplantation möglicherweise verhindern können. Die alloreaktiven Ergebnisse bei Nierentransplantationen korrelierten ebenfalls mit dem Auftreten von Abstoßungsereignissen. So wiesen 55 Nierentransplantierte Patienten keine alloreaktiven T-Zellen gegen ihre Spender auf und zeigten auch keine zellulären Abstoßungsreaktionen im ersten Jahr nach der Transplantation. Eine Nierenempfängerin (Fallbeispiel #3) einer Verstorbenen-Spende wies eine hohe CD8 und zusätzlich eine mäßige CD4 Alloreaktivität einzig gegen ihren Nierenspender auf. Wenige Tage nach der Transplantation zeigte diese Patientin trotz eines negativen Crossmatches Anzeichen einer akuten Abstoßungsreaktion. Wenngleich das Nieren-Biopsie-Ergebnis keinen eindeutigen Hinweis auf ein Abstoßungsereignis lieferte, wurde aufgrund einer Verschlechterung der Nierenfunktion eine Steroidstoßtherapie und darauffolgende ATG-Gabe eingeleitet, woraufhin sich die Nierenfunktion der Patientin verbesserte [108]. Auch im Fall einer Lebertransplantation (Fallbeispiel #2) hätte die frühzeitige Kenntnis einer nachweisbaren Alloreaktivität dazu

beitragen können, einen Patienten von drei weiteren Patienten mit einer akuten Abstoßungsreaktion als Risikopatienten für eine frühe akute Abstoßung zu identifizieren und dementsprechend frühzeitig eine T-Zell Depletions-Therapie zu veranlassen. Wie zuvor schon erwähnt konnte in anderen Studien, die eine Alloreaktivität vorwiegend über IFN- γ ELISPOT-Testverfahren nachwiesen, ebenfalls Korrelationen der gemessenen Alloreaktivität mit Abstoßungsereignissen und/oder verschlechterten Transplantatfunktionen (bei Nierentransplantationen) beobachtet werden [99, 101, 102, 104-106, 142, 159, 166-168]. Jedoch sind die verwendeten Messverfahren in Hinsicht auf ihre klinische Relevanz noch ausbaufähig. So zeigten, wie zuvor schon unter Abschnitt 6.3 erwähnt, 33% (39/118) der Patienten in einer Arbeit von Hricik et al ein positives IFN- γ -ELISPOT Ergebnis. Es kam jedoch nur bei 14 der 39 ELISPOT positiv getesteten Patienten (36%) zu einer akuten Abstoßungsreaktion innerhalb des ersten Jahres nach Transplantation. Im Weiteren wiesen 11 der 79 ELISPOT negativ getesteten Nierenempfänger (14%) eine akute Abstoßungsreaktion auf [136]. Mittels einer Proliferationsmethode konnte demgegenüber bei Leber-Lebendspenden keine Korrelation proliferierender alloreaktiver T-Zellen mit akuten Abstoßungsreaktionen nachgewiesen werden. So kann spekuliert werden, dass eine Proliferation ohne die Bestimmung funktioneller Effektormoleküle keine klinisch relevante Alloreaktivität reflektieren kann [117]. Obgleich kein Zusammenhang zwischen T-Zellproliferation und akuten Abstoßungsreaktionen bestand, konnten wir anhand einer Subgruppe von 37 Messungen einen Zusammenhang zwischen der Frequenz Zytokin-positiver alloreaktiver CD8 T-Zellen nach Stimulation und der Fähigkeit der CD8 T-Zellen zur Proliferation sehen. Allerdings liegen für diese Messserie keine klinischen Daten nach Transplantation vor, so dass keine Aussage über den prädiktiven Wert proliferierender T-Zellen getroffen werden kann. Interessanterweise konnte eine Assoziation zwischen einer gemessenen Alloreaktivität und einer verschlechterten Transplantatfunktion lediglich bei Patienten beobachtet werden, die keine T-Zell-depletierende Induktions-Therapie erhalten hatten [101, 142].

6.5.7 Anwendung alloreaktive T-Zellen zur Spenderselektion

Neben der Möglichkeit zur Vorhersage von Patienten mit Risiko einer akuten Abstoßung hat unsere Arbeitsgruppe ein weiteres Anwendungsgebiet zur Nutzung alloreaktiver T-Zell Messungen gezeigt, wodurch es möglich war, die Ursache einer akuten Abstoßungsreaktion

nachträglich besser zu verstehen und Vorkehrungen zur Selektion eines geeigneten Spenders zu treffen (Fallbeispiel #4). Hierbei handelte es sich um einen Patienten, der trotz eines negativen Crossmatches und der Abwesenheit von PRA eine Steroid-resistente nicht humoral vermittelte Abstoßungsreaktion erlitten hatte [111]. Dieser Patient zeigte in einer retrospektiven Analyse ein Jahr nach seinem Transplantatverlust hohe alloreaktive CD8 und CD4 T-Zell Frequenzen, die gegen einige HLA-Allele seines ersten Nieren-Spenders gerichtet waren [111]. Mittels alloreaktiver T-Zell Messungen gegen elf Third-Party Stimulatoren konnten diese HLA-Allele und noch weitere identifiziert werden, die höchstwahrscheinlich zur zellulären Alloreaktivität nach Transplantation beitrugen. Diese HLA-Allele wurden als „unacceptable“ Antigene für eine zweite Transplantation bei diesem Patienten eingetragen und bestätigten sich kurze Zeit später nach unseren T-zellulären Alloreaktivitätstestungen auch auf humoraler Ebene mittels Luminex-Festphasen-Messverfahren [111]. Zusätzlich zu diesem Aspekt veranschaulicht dieser Fall auch, dass ein Nachweis einer zellulären Alloreaktivität ein Selektionskriterium darstellen kann, um – sofern eine Auswahl besteht - einen passenden Nieren-Lebendspender zu identifizieren. Im vorliegenden Fall kamen nach dem Nierentransplantatverlust zwei Brüder als potentielle Lebendspender in Frage. Da der Empfänger gegen einen der Brüder eine massive zelluläre Alloreaktivität aufwies (0,79% CD4 T-Zellen und 0,98% CD8 T-Zellen), während gegen den zweiten Bruder keine Alloreaktivität nachweisbar war, hätte man auf Basis dieser Ergebnisse einen Ausschluss des ersten Bruders als Lebendspender erwägen können.

6.5.8 Ausblick einer multizentrischen Studie

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die neu etablierte durchflusszytometrische Vollblutmethode den Nachweis einer präformierten alloreaktiven T-Zell Immunität erlaubt. Hiermit können frühzeitig Patienten mit Risiko einer akuten Abstoßung identifiziert werden, die möglicherweise von einer T-Zell depletierenden Therapie profitieren könnten (Fallbeispiele #1-3). Im Setting der Lebendspende kann die Kenntnis alloreaktiver T-Zellen auch zur Auswahl eines passenden Spenders beitragen. Studien mit anderen Verfahren zeigen ebenfalls bereits eine Assoziation von präformierten Donor-spezifischen alloreaktiven T-Zellen mit akuten zellulären Abstoßungsreaktionen bei Nierentransplantationen [99, 101, 102, 104, 106]. Um diese viel versprechenden Beispiele aus unserer Klinik in größerer Fallzahl zu bestätigen und den tatsächlichen klinischen Nutzen abschätzen zu können, wurde

eine deutschlandweite Multicenterstudie auf der Basis unserer durchflusszytometrischen Vollblutmethode bei Nieren-Lebendspenden initiiert (*Clinicaltrials.gov* #NCT02633826). Diese verfolgt die Frage, inwieweit auf Basis des Nachweises präformierter alloreaktiver T-Zellen über das hier etablierte Vollblutverfahren ebenfalls zellulär bedingte Abstoßungsreaktionen abgeschätzt werden können. Im Rahmen dieser Studie erwarten wir ebenfalls nähere Hinweise darüber, ob Patienten eher Abstoßungsreaktionen entwickeln, wenn sowohl präformierte alloreaktive CD4 als auch CD8 T-Zellen gegen den jeweiligen Organspender vorhanden sind oder/und ob ein Patient mit einer ausgeprägt hochfrequenten CD8 T-Zell Antwort eher zu einer frühen akuten Abstoßungsreaktion neigt.

6.6 Technische Voraussetzungen zum Nachweis einer zellulären Alloreaktivität

In Vorbereitung der deutschlandweiten klinischen Multicenterstudie wurde zunächst das Prozedere zum Versand der Blutproben in mit 4°C gekühlten Thermoskannen etabliert, mit dem funktionell aktive T-Zellen auch am Tag nach der Blutentnahme nachweisbar sind. Die Eignung dieses Prozederes wurde in einer ersten Pilotstudie in Kooperation mit dem Universitätsklinikum Frankfurt bei Nieren-Lebendspender-Paarungen getestet. Wenngleich bei keinem der Nierenempfänger eine zelluläre Alloreaktivität gegen den Organspender detektierbar war, wies ein Empfänger eine CD4 Alloreaktivität gegen einen der mitgeführten Third-Party Stimulatoren auf. Ein Positivnachweis mittels SEB und bei CMV-seropositiven Patienten mittels CMV-Antigen wurde in einer parallel durchgeführten durchflusszytometrischen Vollblut-Stimulation erbracht, was die Eignung dieses Versandprozederes bestätigte.

Eine Bestimmung präformierter zellulärer Alloreaktivität nach kombinierter Stimulation von Blutzellen des Empfängers mit Zellen des Spenders ist sowohl bei Nieren-Lebendspender-Paarungen als auch bei Verstorbenenspenden relevant. Neben der Verwendung von Heparinblut kommt als Quelle der Zellen eines Verstorbenenspenders auch EDTA Blut und Milzgewebe in Frage. Auf Basis einer polyklonalen Stimulation zeigen unsere Daten jedoch bei Verwendung von EDTA Blut trotz zusätzlich durchgeführter Waschschriffe eine geringere Frequenz reaktiver CD4 und CD8 T-Zellen, so dass LiHep-Blut klar favorisiert werden sollte. Entfallen die Waschschriffe des EDTA-Blutes, so werden durch EDTA die für die Signaltransduktion relevanten Calciumionen weggefangen, so dass die Zytokin-Induktion und somit der Nachweis reaktiver T-Zellen unzureichend ist. Da in unserem Projekt lediglich

EDTA-Blut von Verstorbenen Spendern zur Verfügung stand, ist davon auszugehen, dass trotz eingehender Waschschriffe die gemessene Alloreaktivität unterschätzt wurde. Ähnliche Ergebnisse zeigten sich auch beim Nachweis IFN- γ positiver SIV (Simian immunodeficiency virus) spezifischer T-Zellen bei Rhesus-Affen, bei denen die Frequenzen reaktiver T-Zellen bei Verwendung von EDTA als Antikoagulanzen im Vergleich zur Verwendung von Heparin signifikant geringer waren [169]. Als Alternative zur Verwendung von EDTA-Vollblut des Spendermaterials wurden zudem isolierte mononukleäre Zellen der Milz evaluiert. Dabei konnte eine höhere Frequenz alloreaktiver CD8 T-Zellen gegenüber der Verwendung von EDTA-Blut beobachtet werden. Dies weist darauf hin, dass aufgereinigte Zellen aus Milzgewebe besser als Stimulatorzellen einer zellulären Alloreaktivität geeignet sind.

6.7 Vergleich solider Organe und deren Einfluss auf das Transplantatoutcome

Im Allgemeinen kann bei einem Vergleich der Nieren-Lebendspenden zu den Nieren-Verstorbenen Spenden festgestellt werden, dass eine CD4 oder CD8 T-Zell Alloreaktivität der Empfänger gegen ihre Organspender seltener bei Nieren-Lebendspenden im Gegensatz zu Nieren-Verstorbenen Spenden auftritt. In unserem Fall zeigen 0% der Nieren-Lebendempfänger eine CD4 und/oder CD8 Alloreaktivität gegen ihren Organspender, während 3,57% der Nieren-Verstorbenenempfänger eine CD8 Alloreaktivität und 7,14% eine CD4 Alloreaktivität zeigten. Da es sich bei Nieren-Lebendspenden häufiger um verwandte Organspender handelt, die ein höheres Maß an HLA-Übereinstimmung aufweisen, ist bei diesen Patienten vermutlich auch seltener eine zelluläre Alloreaktivität zu erwarten [62]. Beim Vergleich verschiedener Organentitäten fiel auf, dass präformierte alloreaktive CD8 T-Zellen bei Empfängern, die ein Lungen- oder Lebertransplantat erhielten, häufiger vorkamen als bei Nierentransplantierten (Niere 3,57%; Lunge 25%; Leber 16,67%). Das seltenere Auftreten alloreaktiver T-Zellen bei Nierentransplantationen im Gegensatz zu anderen Organen könnte auf die detailliertere Selektion der Nierenspender über HLA-Typisierung oder humorale Antikörpertestungen zurückzuführen sein, die bei anderen Organtransplantationen wie der Leber oder Lunge nicht routinemäßig durchgeführt wird [110, 170, 171].

6.8 De novo Induktion alloreaktiver T-Zellen nach einer Transplantation

Neben der Analyse einer präformierten Alloreaktivität, kann ein Monitoring von alloreaktiven T-Zellen auch auf alloreaktive T-Zell Messungen im Verlauf nach

Transplantation ausgeweitet werden, um auch *de novo* induzierte alloreaktive T-Zellen eines Empfängers gegen den Organspender nachzuweisen bzw. um die Dynamik präformierter alloreaktiver T-Zellen im Verlauf nach einer Transplantation zu untersuchen. Dieses Prozedere erfordert die Kryokonservierung von Spenderzellen. In unserer Studie konnte eine *de novo* induzierte CD4 Alloreaktivität gegen kryokonservierte Zellen des Spenders lediglich bei drei Nierenempfängern und eine *de novo* induzierte CD8 Alloreaktivität lediglich bei einem Patienten festgestellt werden. Ob diese *de novo* induzierte Alloreaktivität im Zusammenhang mit einer Verschlechterung der Transplantatfunktion steht, kann aufgrund der geringen Fallzahl nicht geklärt werden. In einer früheren Arbeit konnten wir generell einen Abfall nachweisbarer alloreaktiver T-Zellen in der Frühphase nach Transplantation feststellen [107], was möglicherweise an einer gezielten Migration alloreaktiver T-Zellen in das Transplantat erklärt werden könnte [52, 107, 172]. Eine andere Studie konnte bereits zeigen, dass ein Absinken der alloreaktiven Frequenzen einen Monat nach Transplantation bei Leberpatienten zu einer besseren Transplantatfunktion führt [96]. Im Vergleich dazu konnte dieses Absinken der Alloreaktivität nach Lungentransplantationen nicht beobachtet werden [96]. Ebenso erfuhren Leberpatienten, die vor Transplantation keine Alloreaktivität aufwiesen bzw. bei denen nach Transplantation ein Abfall ihrer Alloreaktivität nachweisbar war, keine Abstoßungsreaktion im Gegensatz zu Patienten, bei denen eine Alloreaktivität auftrat [173]. Eine DSA-Testung fand bei diesen Patienten zum damaligen Zeitpunkt noch nicht statt, auch wenn es gleichermaßen interessant wäre, ob das Auftreten von DSA mit dem Auftreten *de novo* induzierter T-Zellen in diesem Patientenkollektiv korrelierte. Dass es unmittelbar nach einer Transplantation zu einem Abfall der messbaren Alloreaktivität kommen kann, kann zudem an der Einnahme immunsuppressiver Medikamente liegen, deren Dosierung sich je nach transplantiertem Organ unterscheidet. So nehmen Lungentransplantierte Patienten direkt nach Transplantation eine sehr hohe Immunsuppression ein, sodass in dieser Phase der Transplantation eine Messung alloreaktiver T-Zellen mit ausreichender Sensitivität nicht sinnvoll möglich erscheint [96]. Darüber hinaus können vorimmunisierte Patienten und Patienten mit Abstoßungsereignissen eine T-Zell depletierende Therapie erhalten, so dass alloreaktive T-Zellen nach Gabe dieser Medikamente ebenfalls nicht mehr nachgewiesen werden können.

6.9 Die Rolle der Alloreaktivität bei der Schwangerschaft

Da alloreaktive T-Zellen nicht nur im Zusammenhang mit Transplantat-Abstoßungsreaktionen eine Rolle spielen können, haben wir untersucht, ob alloreaktive T-Zellen auch im Rahmen einer Schwangerschaft induziert werden. Hierzu wurde die hier etablierte Methode bei Frauen vor, im Verlauf und nach einer Schwangerschaft untersucht.

Eine Schwangerschaft stellt physiologisch die Bedingung, dass eine Schwangere mit gewebespezifischen Antigenen die vom Fötus und der Plazenta stammen, ebenso wie mit fremden Antigenen die vom väterlichen Genom stammen, konfrontiert wird und diese trotz Immunkompetenz während der Phase der Schwangerschaft toleriert [174, 175]. Der Fötus stellt dabei eine Art Semi-Transplantat dar [176]. Obwohl eine Schwangere bei ihrer ersten Schwangerschaft immunologisch naiv gegenüber väterlichen Antigenen ist, erlangt sie einen Toleranzzustand während ihrer Schwangerschaft [174]. Der Schlüssel für die mütterlich-fötale Toleranz liegt in der Repression von plazentalen Genen, die mütterliche Immunzellen aktivieren können zusammen mit der Aktivierung von Genen, die Immunzellen unterdrücken [177]. So spielt die MHC Expression plazentaler Trophoblasten bei der Immuninteraktion der Mutter mit dem Fötus eine wichtige Rolle. Unter den Histokompatibilitätsantigenen kommt es hauptsächlich zur Expression von HLA-C, desweiteren exprimieren Trophoblasten Nebenhistokompatibilitätsantigene wie HLA-G, -E, -F. Eine Veränderung im Tryptophan-Metabolismus und dem Verhältnis der Th1/Th2 Zytokinexpression kann ebenso wie das Auftreten regulatorischer T-Zellen die Induktion einer Toleranz beeinflussen [178]. Außerdem wird das Komplementsystem und die Fas Liganden Expression durch Trophoblasten reguliert und reproduktive Hormone führen einen immunmodulatorischen Effekt aus, um einen Toleranzzustand zu erlangen [179]. Trotz dieser mechanistischen Hinweise kann bislang noch nicht vorausgesagt werden, unter welchen Umständen eine Toleranz durchbrochen wird und mütterliche T- und B-Zellen auf fötale Antigene reagieren.

Generell wiesen schwangere Frauen in unserer durchflusszytometrischen Vollblutanalyse keine Unterschiede hinsichtlich ihrer alloreaktiven T-Zell Frequenzen gegenüber nicht schwangeren Frauen und gegenüber Männern auf. Bei Betrachtung SEB-reaktiver T-Zell Frequenzen zeigten Schwangere im Vergleich zu ihren Kindsvätern und auch zu altersgematchten Kontrollen zu den Kindsvätern eine signifikant erniedrigte CD8 Reaktivität ($p=0,0143$; Daten nicht gezeigt). Diese erniedrigten SEB-reaktiven CD8 T-Zell Frequenzen

könnte darauf hinweisen, dass eine Frau während ihrer Schwangerschaft die Aktivität ihres Immunsystems Antigen-unabhängig herunterreguliert, um in einen Toleranzzustand gegenüber dem Fötus übergehen zu können [180]. Allerdings konnte diese T-zelluläre Reduktion nur bei den CD8 T-Zellen, nicht jedoch bei den CD4 T-Zellen festgestellt werden (Daten nicht gezeigt).

Interessanterweise zeigten Schwangere jedoch einen Trend zu einer erhöhten CD8 T-Zell Alloreaktivität gegenüber väterlichen Antigenen nach Geburt ihres Kindes. Diese erhöhte CD8 Alloreaktivität nach Geburt war gegenüber den zum Kindsvater altersgematchten Third-Party Stimulatoren signifikant erhöht. In ähnlicher Weise wurde auch bereits ein Anstieg in der zytotoxischen T-Zell Antwort der Mütter gegen väterliche HLA Antigene des Kindes von sechs zu acht Wochen, bis hin zu zwei Jahren nach Geburt beobachtet, wenngleich jedoch keine vergleichbaren Messungen vor bzw. zum Zeitpunkt der Schwangerschaft vorlagen [181]. Andere Arbeitsgruppen konnten bei Müttern nach Geburt des Kindes antigen-unabhängig einen Anstieg der Leukozyten und der T-Zell Anzahl beobachten [180, 182-184]. Im Vergleich zur Gesamtanalyse SEB-reaktiver Frequenzen bei Schwangeren im Gegensatz zu den Kindsvätern und nicht schwangeren Kontrollen zeigte sich bei der Betrachtung der SEB-reaktiven Frequenzen im Verlauf einer Schwangerschaft und auch in den ersten Wochen nach Geburt des Kindes auf Basis unserer Untersuchungen keine Unterschiede. Da bei der Verlaufsanalyse nur sehr wenige Messungen von Frauen vor ihrer Schwangerschaft (n=4) vorhanden waren, konnte womöglich die Reduktion SEB-reaktiver Frequenzen während einer Schwangerschaft aufgrund der niedrigen Fallzahl nicht nachgewiesen werden. Jedoch könnte es sich aufgrund der gleichbleibenden SEB-Reaktivität während der Schwangerschaft und nach der Geburt des Kindes tatsächlich um eine spezifische Induktion alloreaktiver T-Zellen, die gegen den Kindsvater gerichtet sind, handeln.

Bei einer genaueren Betrachtung der alloreaktiven CD8 T-Zell Frequenzen nach Geburt konnte festgestellt werden, dass ein Anstieg vor allem bei Frauen mit einem männlichen Nachkommen beobachtet werden konnte. Dies konnten auch andere Arbeitsgruppen feststellen, die dieses Phänomen auf eine funktionelle HY-spezifische CD8 T-Zell Antwort bei männlichen Nachkommen [179, 185] bzw. auf die Induktion von spezifischen männlichen Nebenhistokompatibilitätsantigenen zurückführten [186]. Neben der zellulären Komponente

konnte gezeigt werden, dass 30% der Frauen Antikörper entwickelten, die direkt gegen die nicht verwandten väterlichen HLA Antigene des Fötus gerichtet waren [181].

Einen Zusammenhang zwischen alloreaktiven T-Zellen die gegen väterliche Antigene gerichtet sind und vorangegangenen Fehlgeburten konnten wir in dieser Studie nicht feststellen, möglicherweise war die Fallzahl der Probanden mit Fehlgeburten zu gering. Zukünftig wäre die Analyse alloreaktiver T-Zellen auf ein größeres Kollektiv interessant, da Ghafourian [187] in einer prospektiven Fallstudie anhand von 25 Frauen, die mindestens drei Fehlgeburten im 1. Trimenon hatten, im Vergleich zu 17 Frauen mit erfolgreichen Schwangerschaften zeigen konnte, dass eine durchflusszytometrisch gemessene, erhöhte totale CD8 T-Zellzahl mit vorangegangenen mehrfachen Aborten bei Frauen einhergeht.

Zusammenfassend ergeben sich Hinweise, dass eine alloreaktive T-Zell Induktion der Schwangeren unmittelbar nach Geburt des Kindes stattfinden kann und diese eine Spezifität gegen den Kindsvater zu haben scheint. Diese T-Zell Induktion scheint stärker ausgeprägt zu sein, wenn es sich um einen männlichen Nachkommen handelt.

6.10 Ausblick

Im Rahmen dieser Arbeit wurde ein neues durchflusszytometrisches Verfahren zum Nachweis einer zellulären Alloreaktivität etabliert und zur detaillierten Charakterisierung von alloreaktiven CD4 und CD8 T-Zellen bei Gesunden und Patienten auf der Transplantationswarteliste herangezogen. Es konnte anhand einer Reihe von Fallberichten gezeigt werden, dass der Nachweis präformierter alloreaktiver T-Zellen zur frühzeitigen Identifizierung von Risikopatienten einer Transplantat-Abstoßungsreaktion geeignet sein könnte. Des Weiteren kann der Nachweis präformierter alloreaktiver T-Zellen bei Nieren-Lebendspenden zur Selektion eines passenden Spenders beitragen.

Diese Arbeit bildete die Basis zur Konzeption einer deutschlandweiten Multicenterstudie zur klinischen Evaluierung, inwieweit präformierte alloreaktive T-Zellen eines Empfängers gegen den Spender eine Vorhersage akuter Abstoßungsereignisse erlauben. In dieser, an deren Konzeption ich beteiligt war, werden 150 Nierenlebendspenden aus 13 Transplantations-Zentren in Deutschland eingeschlossen, bei denen zunächst unmittelbar vor Transplantation die zelluläre Alloreaktivität des Empfängers gegen seinen Organspender und gegen drei weitere Third-Party Stimulatoren ermittelt wird. Eine Messung der Reaktivität gegen CMV-Antigene und gegen SEB dient als interne Kontrolle. Außerdem werden in der Studie vor

Transplantation sowie 3, 6 und 12 Monate nach Transplantation DSA des Empfängers gegen den Spender bestimmt. Zudem werden im Verlauf des ersten Jahres nach Transplantation klinische Daten erhoben, die eine Beurteilung der Transplantatfunktion erlauben (siehe Tabelle 11).

Tabelle 11: Übersicht über alle klinischen und experimentellen Parameter der Empfänger die in der Multicenterstudie erhoben werden.

Parameter	Baseline	3	6	12
Spender-spezifische alloreaktive T-Zellen*	x	-/-	-/-	-/-
HLA-Antikörper	x	x [§]	x [§]	x
Kreatinin	-/-	X	x	x
Cystatin C	-/-	X	x	x
Proteinurie	x**	X	x	x
Auftretende SAE	-/-	X	x	x
Auftretende Abstoßungsepisoden	-/-	X	x	x
Biopsie	-/-	X	x	x
Aktuelle Immunsuppression	-/-	X	x	x
Änderung der Immunsuppression (Dosierung/Level)	-/-	X	x	x
anti-CMV Behandlung	-/-	X	x	x
BKPyV Intervention	-/-	X	x	x

*inclusive Kontrol-Stimulationen; **im Fall einer verbleibenden Diurese; [§]Lagerung der Serumproben für mögliche Spender-spezifische Antikörper (DSA) Analysen bei Patienten die 12 Monate nach der Transplantation *de novo* DSA entwickelten; HLA, human leukocyte antigen; SAE, serious adverse event.

Es handelt sich um eine reine Beobachtungsstudie ohne Intervention. Die Ergebnisse der alloreaktiven T-Zell Messungen werden den behandelnden Ärzten jedoch nicht zur Verfügung gestellt, so dass Therapieentscheidungen nicht von den Ergebnissen dieser Studie beeinflusst werden.

Sollte sich die Hypothese bestätigen und eine nachweisbare Alloreaktivität zur Vorhersage einer Abstoßungsreaktion geeignet sein, so böte das Vollblutverfahren die Möglichkeit, bei

Patienten mit Abstoßungsrisiko bereits vor oder kurz nach Transplantation die immunsuppressive Medikation zu intensivieren. Zudem könnte die Kenntnis einer Alloreaktivität zur Auswahl geeigneter Spender beitragen. Da das Vollblutverfahren innerhalb eines Arbeitstages durchgeführt werden kann, wäre erstmals eine Bestimmung einer zellulären Alloreaktivität in einem klinisch relevanten Setting denkbar.

7 Literaturverzeichnis

1. Wolfe, R.A., 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**(23): p. 1725-30.
2. Evans, R.W., et al., *The quality of life of patients with end-stage renal disease*. N Engl J Med, 1985. **312**(9): p. 553-9.
3. Fiebiger, W., C. Mitterbauer, and R. Oberbauer, *Health-related quality of life outcomes after kidney transplantation*. Health Qual Life Outcomes, 2004. **2**: p. 2.
4. Kostro, J.Z., et al., *Quality of Life After Kidney Transplantation: A Prospective Study*. Transplant Proc, 2016. **48**(1): p. 50-4.
5. Murphy K, T.P., Walport M, *Janeway Immunologie*. Heidelberg, Spektrum Akademischer Verlag, 2009. **Vol 7**.
6. DSO, *Jahresbericht_Organspende_und_Transplantation_in_Deutschland_2017_WEB*. Deutsche Stiftung für Organtransplantation, 18.09.2018.
7. Nemati, E., et al., *Does kidney transplantation with deceased or living donor affect graft survival?* Nephrourol Mon, 2014. **6**(4): p. e12182.
8. Taminato, M., et al., *[Prevalence of infection in kidney transplantation from living versus deceased donor: systematic review and meta-analysis]*. Rev Esc Enferm USP, 2015. **49**(3): p. 509-14.
9. Guimaraes, J., et al., *Living-donor and Deceased-donor Renal Transplantation: Differences in Early Outcome--A Single-center Experience*. Transplant Proc, 2015. **47**(4): p. 958-62.
10. Voiculescu, A., et al., *Kidney transplantation from related and unrelated living donors in a single German centre*. Nephrol Dial Transplant, 2003. **18**(2): p. 418-25.
11. Hillebrand, G.F., et al., *[Living donors in kidney transplantation. Renaissance by non-related donors?]*. Fortschr Med Orig, 2001. **118**(4): p. 135-9.
12. Williams, R.C., et al., *The Risk of Transplant Failure With HLA Mismatch in First Adult Kidney Allografts 2: Living Donors, Summary, Guide*. Transplant Direct, 2017. **3**(5): p. e152.
13. Opelz, G., *Impact of HLA compatibility on survival of kidney transplants from unrelated live donors*. Transplantation, 1997. **64**(10): p. 1473-5.
14. Gjertson, D.W., *Look-up survival tables for living-donor renal transplants: OPTN/UNOS data 1995-2002*. Clin Transpl, 2003: p. 337-86.
15. Gjertson, D.W. and J.M. Cecka, *Living unrelated donor kidney transplantation*. Kidney Int, 2000. **58**(2): p. 491-9.
16. Panigrahi, A., et al., *Influence of HLA compatibility on renal graft survival using live unrelated & cadaver donors in India*. Indian J Med Res, 2002. **115**: p. 158-64.
17. Meier-Kriesche, H.U. and B. Kaplan, *Waiting time on dialysis as the strongest modifiable risk factor for renal transplant outcomes: a paired donor kidney analysis*. Transplantation, 2002. **74**(10): p. 1377-81.
18. Davis, C.L. and F.L. Delmonico, *Living-donor kidney transplantation: a review of the current practices for the live donor*. J Am Soc Nephrol, 2005. **16**(7): p. 2098-110.
19. Rashedi, I., et al., *Autoimmunity and apoptosis--therapeutic implications*. Curr Med Chem, 2007. **14**(29): p. 3139-51.
20. Fearon, D.T. and R.M. Locksley, *The instructive role of innate immunity in the acquired immune response*. Science, 1996. **272**(5258): p. 50-3.

21. Levy, O., *Innate immunity of the newborn: basic mechanisms and clinical correlates*. Nat Rev Immunol, 2007. **7**(5): p. 379-90.
22. Aderem, A. and R.J. Ulevitch, *Toll-like receptors in the induction of the innate immune response*. Nature, 2000. **406**(6797): p. 782-7.
23. Cardone, J., G. Le Friec, and C. Kemper, *CD46 in innate and adaptive immunity: an update*. Clin Exp Immunol, 2011. **164**(3): p. 301-11.
24. Sheen, J.H. and P.S. Heeger, *Effects of complement activation on allograft injury*. Curr Opin Organ Transplant, 2015. **20**(4): p. 468-75.
25. Sacks, S.H. and W. Zhou, *The role of complement in the early immune response to transplantation*. Nat Rev Immunol, 2012. **12**(6): p. 431-42.
26. Borghesi, L. and C. Milcarek, *Innate versus adaptive immunity: a paradigm past its prime?* Cancer Res, 2007. **67**(9): p. 3989-93.
27. Jung, D., et al., *Mechanism and control of V(D)J recombination at the immunoglobulin heavy chain locus*. Annu Rev Immunol, 2006. **24**: p. 541-70.
28. Matthews, A.J., et al., *Regulation of immunoglobulin class-switch recombination: choreography of noncoding transcription, targeted DNA deamination, and long-range DNA repair*. Adv Immunol, 2014. **122**: p. 1-57.
29. Pape H-C, K.A., Silbernagel S, *Physiologie*. Georg Thieme Verlag, 2014. **7.Auflage**.
30. Muramatsu, M., et al., *Class switch recombination and hypermutation require activation-induced cytidine deaminase (AID), a potential RNA editing enzyme*. Cell, 2000. **102**(5): p. 553-63.
31. A, G.-Q., *Immunobiology: The Immune System in Health and Disease*. Clin Expl Immunol., 2008. **5th edition**
32. Hall, B.M., *T Cells: Soldiers and Spies--The Surveillance and Control of Effector T Cells by Regulatory T Cells*. Clin J Am Soc Nephrol, 2015. **10**(11): p. 2050-64.
33. Walker, L.S. and A.K. Abbas, *The enemy within: keeping self-reactive T cells at bay in the periphery*. Nat Rev Immunol, 2002. **2**(1): p. 11-9.
34. Guermonprez, P., et al., *Antigen presentation and T cell stimulation by dendritic cells*. Annu Rev Immunol, 2002. **20**: p. 621-67.
35. Mahnke, Y.D., et al., *The who's who of T-cell differentiation: human memory T-cell subsets*. Eur J Immunol, 2013. **43**(11): p. 2797-809.
36. Kuhns, M.S., M.M. Davis, and K.C. Garcia, *Deconstructing the form and function of the TCR/CD3 complex*. Immunity, 2006. **24**(2): p. 133-9.
37. Neefjes, J., et al., *Towards a systems understanding of MHC class I and MHC class II antigen presentation*. Nat Rev Immunol, 2011. **11**(12): p. 823-36.
38. O'Garra, A., L. Gabrysova, and H. Spits, *Quantitative events determine the differentiation and function of helper T cells*. Nat Immunol, 2011. **12**(4): p. 288-94.
39. Swain, S.L., K.K. McKinstry, and T.M. Strutt, *Expanding roles for CD4(+) T cells in immunity to viruses*. Nat Rev Immunol, 2012. **12**(2): p. 136-48.
40. de Graav, G.N., et al., *Follicular T helper cells and humoral reactivity in kidney transplant patients*. Clin Exp Immunol, 2015. **180**(2): p. 329-40.
41. Kamradt, T. and K. Ferrari-Kuhne, *[Adaptive immunity]*. Dtsch Med Wochenschr, 2011. **136**(33): p. 1678-83.
42. Barry, M. and R.C. Bleackley, *Cytotoxic T lymphocytes: all roads lead to death*. Nat Rev Immunol, 2002. **2**(6): p. 401-9.
43. Hickey, M.J., N.M. Valenzuela, and E.F. Reed, *Alloantibody Generation and Effector Function Following Sensitization to Human Leukocyte Antigen*. Front Immunol, 2016. **7**: p. 30.

44. Vyas, J.M., A.G. Van der Veen, and H.L. Ploegh, *The known unknowns of antigen processing and presentation*. Nat Rev Immunol, 2008. **8**(8): p. 607-18.
45. Wolf, M., *Diplomarbeit: "Quantifizierung und Charakterisierung alloreaktiver T-Zellen"*. Zentrum für Human- und Molekularbiologie (ZHMB) der Naturwissenschaftlich-Technischen Fakultät III und der Medizinischen Fakultät, Universität des Saarlandes, 2012.
46. Nankivell, B.J. and S.I. Alexander, *Rejection of the kidney allograft*. N Engl J Med, 2010. **363**(15): p. 1451-62.
47. Burgdorf, S., et al., *Distinct pathways of antigen uptake and intracellular routing in CD4 and CD8 T cell activation*. Science, 2007. **316**(5824): p. 612-6.
48. Loupy, A., et al., *Complement-binding anti-HLA antibodies and kidney-allograft survival*. N Engl J Med, 2013. **369**(13): p. 1215-26.
49. Siegmund-Schultze, N.L., A., *Abstoßung von Nierentransplantaten: C1q-bindende Antikörper lassen Abstoßungsrisiko gut abschätzen*. Dtsch Arztebl 2013; 110(45): A-2137 / B-1886 / C-1837, 2013.
50. Gokmen, M.R., G. Lombardi, and R.I. Lechler, *The importance of the indirect pathway of allorecognition in clinical transplantation*. Curr Opin Immunol, 2008. **20**(5): p. 568-74.
51. Safinia, N., et al., *T-cell alloimmunity and chronic allograft dysfunction*. Kidney Int Suppl, 2010(119): p. S2-12.
52. Lakkis, F.G. and R.I. Lechler, *Origin and biology of the allogeneic response*. Cold Spring Harb Perspect Med, 2013. **3**(8).
53. Huang, J.F., et al., *TCR-Mediated internalization of peptide-MHC complexes acquired by T cells*. Science, 1999. **286**(5441): p. 952-4.
54. Angaswamy, N., et al., *Interplay between immune responses to HLA and non-HLA self-antigens in allograft rejection*. Hum Immunol, 2013. **74**(11): p. 1478-85.
55. Andre, F., et al., *Exosomes as potent cell-free peptide-based vaccine. I. Dendritic cell-derived exosomes transfer functional MHC class I/peptide complexes to dendritic cells*. J Immunol, 2004. **172**(4): p. 2126-36.
56. They, C., et al., *Indirect activation of naive CD4+ T cells by dendritic cell-derived exosomes*. Nat Immunol, 2002. **3**(12): p. 1156-62.
57. De Clippel, D., et al., *Screening for HLA antibodies in plateletpheresis donors with a history of transfusion or pregnancy*. Transfusion, 2014. **54**(12): p. 3036-42.
58. Hyun, J., et al., *Effects of different sensitization events on HLA alloimmunization in solid organ transplantation patients*. Transplant Proc, 2012. **44**(1): p. 222-5.
59. Regan, L., P.R. Braude, and D.P. Hill, *A prospective study of the incidence, time of appearance and significance of anti-paternal lymphocytotoxic antibodies in human pregnancy*. Hum Reprod, 1991. **6**(2): p. 294-8.
60. Masson, E., et al., *Incidence and risk factors of anti-HLA immunization after pregnancy*. Hum Immunol, 2013. **74**(8): p. 946-51.
61. Higgins, R., et al., *Human leukocyte antigen antibody-incompatible renal transplantation: excellent medium-term outcomes with negative cytotoxic crossmatch*. Transplantation, 2011. **92**(8): p. 900-6.
62. Terasaki, P.I., et al., *High survival rates of kidney transplants from spousal and living unrelated donors*. N Engl J Med, 1995. **333**(6): p. 333-6.
63. Everly, M.J., et al., *Incidence and impact of de novo donor-specific alloantibody in primary renal allografts*. Transplantation, 2013. **95**(3): p. 410-7.

64. Kaneku, H., et al., *De novo donor-specific HLA antibodies decrease patient and graft survival in liver transplant recipients*. Am J Transplant, 2013. **13**(6): p. 1541-8.
65. Haarberg, K.M. and A.R. Tambur, *Detection of donor-specific antibodies in kidney transplantation*. Br Med Bull, 2014. **110**(1): p. 23-34.
66. Susal, C., et al., *Determination of unacceptable HLA antigen mismatches in kidney transplant recipients: recommendations of the German Society for Immunogenetics*. Tissue Antigens, 2015. **86**(5): p. 317-23.
67. Degauque, N., S. Brouard, and J.P. Soulillou, *Cross-Reactivity of TCR Repertoire: Current Concepts, Challenges, and Implication for Allotransplantation*. Front Immunol, 2016. **7**: p. 89.
68. Brehm, M.A., et al., *Allografts stimulate cross-reactive virus-specific memory CD8 T cells with private specificity*. Am J Transplant, 2010. **10**(8): p. 1738-48.
69. Amir, A.L., et al., *Allo-HLA reactivity of virus-specific memory T cells is common*. Blood, 2010. **115**(15): p. 3146-57.
70. Schreiber, S.L. and G.R. Crabtree, *The mechanism of action of cyclosporin A and FK506*. Immunol Today, 1992. **13**(4): p. 136-42.
71. Chinen, J. and R.H. Buckley, *Transplantation immunology: solid organ and bone marrow*. J Allergy Clin Immunol, 2010. **125**(2 Suppl 2): p. S324-35.
72. Villarreal, M.C., M. Hidalgo, and A. Jimeno, *Mycophenolate mofetil: An update*. Drugs Today (Barc), 2009. **45**(7): p. 521-32.
73. Humiston, D.T., D; Kfoury, A; et al., *Mycophenolate mofetil history and introduction into clinical heart transplantation*. Cardiovascular Engineering, 1997. **2**.
74. De Bosscher, K., W. Vanden Berghe, and G. Haegeman, *Mechanisms of anti-inflammatory action and of immunosuppression by glucocorticoids: negative interference of activated glucocorticoid receptor with transcription factors*. J Neuroimmunol, 2000. **109**(1): p. 16-22.
75. Vincenti, F., et al., *Interleukin-2 receptor antagonist induction in modern immunosuppression regimens for renal transplant recipients*. Transpl Int, 2006. **19**(6): p. 446-57.
76. van den Hoogen, M.W. and L.B. Hilbrands, *Use of monoclonal antibodies in renal transplantation*. Immunotherapy, 2011. **3**(7): p. 871-80.
77. Hellemans, R., J.L. Bosmans, and D. Abramowicz, *Induction Therapy for Kidney Transplant Recipients: Do We Still Need Anti-IL2 Receptor Monoclonal Antibodies?* Am J Transplant, 2017. **17**(1): p. 22-27.
78. Benichou, G., et al., *Role of Memory T Cells in Allograft Rejection and Tolerance*. Front Immunol, 2017. **8**: p. 170.
79. Adams, A.B., M.L. Ford, and C.P. Larsen, *Costimulation Blockade in Autoimmunity and Transplantation: The CD28 Pathway*. J Immunol, 2016. **197**(6): p. 2045-50.
80. Tyden, G., G. Kumlien, and I. Fehrman, *Successful ABO-incompatible kidney transplantations without splenectomy using antigen-specific immunoadsorption and rituximab*. Transplantation, 2003. **76**(4): p. 730-1.
81. Wongsaroj, P., et al., *Modern approaches to incompatible kidney transplantation*. World J Nephrol, 2015. **4**(3): p. 354-62.
82. Wolf, M., et al., *Peripheral administration of antithymocyte globulins: a review of current literature*. Transplant Rev (Orlando), 2013. **27**(1): p. 17-20.
83. Hardinger, K.L., *Rabbit antithymocyte globulin induction therapy in adult renal transplantation*. Pharmacotherapy, 2006. **26**(12): p. 1771-83.

84. Mohty, M., *Mechanisms of action of antithymocyte globulin: T-cell depletion and beyond*. *Leukemia*, 2007. **21**(7): p. 1387-94.
85. Ekberg, H., et al., *Calcineurin inhibitor minimization in the Symphony study: observational results 3 years after transplantation*. *Am J Transplant*, 2009. **9**(8): p. 1876-85.
86. Konvalinka, A. and K. Tinckam, *Utility of HLA Antibody Testing in Kidney Transplantation*. *J Am Soc Nephrol*, 2015. **26**(7): p. 1489-502.
87. Waßmuth R, M.-E., Kiefel V, *Transfusionsmedizin - Grundlagen - Theorie - Methodik*. Springer-Verlag, 2004. **3. Auflage**.
88. Bundesärztekammer, *Richtlinien zur Organtransplantation gem. § 16 TPG*. Richtlinien der Deutschen Ärztekammer, 2015.
89. Terasaki, P., *Interview with Dr Paul Terasaki*. *Am J Transplant*, 2003. **3**(9): p. 1047-51.
90. Mulley, W.R. and J. Kanellis, *Understanding crossmatch testing in organ transplantation: A case-based guide for the general nephrologist*. *Nephrology (Carlton)*, 2011. **16**(2): p. 125-33.
91. Khodadadi, L., M. Adib, and A. Pourazar, *Immunoglobulin class (IgG, IgM) determination by dithiothreitol in sensitized kidney transplant candidates*. *Transplant Proc*, 2006. **38**(9): p. 2813-5.
92. McKenna, R.M., S.K. Takemoto, and P.I. Terasaki, *Anti-HLA antibodies after solid organ transplantation*. *Transplantation*, 2000. **69**(3): p. 319-26.
93. Dheda, S.C., S; Williams, RL; Wong, G; Lim, WH, *Detection of Antibody-Mediated Rejection in Kidney Transplantation and the Management of Highly Sensitized Kidney Transplant Recipients*. INtech, 2012.
94. Schlaf, G.P.-K., B; Altermann, WW, *Solid Phase-Based Cross-Matching in Order to Avoid Kidney Allografting against Donor-Specific Anti-HLA Antibodies: Long Term Experience with a Procedure Allowing Highly Reliable Diagnoses*. *Austin Journal of Nephrology and Hypertension*. **Volume 1**(6).
95. Crespo, E. and O. Bestard, *Biomarkers to assess donor-reactive T-cell responses in kidney transplant patients*. *Clin Biochem*, 2016. **49**(4-5): p. 329-37.
96. de Haan, A., et al., *Rapid decreases in donor-specific cytotoxic T lymphocyte precursor frequencies and graft outcome after liver and lung transplantation*. *Transplantation*, 2001. **71**(6): p. 785-91.
97. Hickling, J., *Limiting-dilution analysis and split-well analysis of human cytotoxic T lymphocytes*. *Expert reviews in molecular medicine*, 1998.
98. Augustine, J.J. and D.E. Hricik, *T-cell immune monitoring by the ELISPOT assay for interferon gamma*. *Clin Chim Acta*, 2012. **413**(17-18): p. 1359-63.
99. Heeger, P.S., et al., *Pretransplant frequency of donor-specific, IFN-gamma-producing lymphocytes is a manifestation of immunologic memory and correlates with the risk of posttransplant rejection episodes*. *J Immunol*, 1999. **163**(4): p. 2267-75.
100. Augustine, J.J., et al., *Hemodialysis vintage, black ethnicity, and pretransplantation antidonor cellular immunity in kidney transplant recipients*. *J Am Soc Nephrol*, 2007. **18**(5): p. 1602-6.
101. Crespo, E., et al., *Pre-transplant donor-specific T-cell alloreactivity is strongly associated with early acute cellular rejection in kidney transplant recipients not receiving T-cell depleting induction therapy*. *PLoS One*, 2015. **10**(2): p. e0117618.
102. Poggio, E.D., et al., *Pretransplant cellular alloimmunity as assessed by a panel of reactive T cells assay correlates with acute renal graft rejection*. *Transplantation*, 2007. **83**(7): p. 847-52.

103. Hricik, D.E., et al., *Enzyme linked immunosorbent spot (ELISPOT) assay for interferon-gamma independently predicts renal function in kidney transplant recipients*. Am J Transplant, 2003. **3**(7): p. 878-84.
104. Augustine, J.J., et al., *Pre-transplant IFN-gamma ELISPOTs are associated with post-transplant renal function in African American renal transplant recipients*. Am J Transplant, 2005. **5**(8): p. 1971-5.
105. Nickel, P., et al., *Enzyme-linked immunosorbent spot assay for donor-reactive interferon-gamma-producing cells identifies T-cell presensitization and correlates with graft function at 6 and 12 months in renal-transplant recipients*. Transplantation, 2004. **78**(11): p. 1640-6.
106. Koscielska-Kasprzak, K., et al., *Pretransplantation cellular alloreactivity is predictive of acute graft rejection and 1-year graft function in kidney transplant recipients*. Transplant Proc, 2009. **41**(8): p. 3006-8.
107. Sester, U., et al., *Rapid identification of preformed alloreactive T cells for use in a clinical setting*. Transplantation, 2004. **78**(4): p. 607-14.
108. Fischer, M., et al., *Donor-specific alloreactive T cells can be quantified from whole blood, and may predict cellular rejection after renal transplantation*. Eur J Immunol, 2017. **47**(7): p. 1220-1231.
109. Maecker, H.T., J., *Selecting Reagents for Multicolor Flow Cytometry* BD Biosciences, San Jose, 2012.
110. Opelz, G. and B. Dohler, *Effect of human leukocyte antigen compatibility on kidney graft survival: comparative analysis of two decades*. Transplantation, 2007. **84**(2): p. 137-43.
111. Leyking, S., et al., *Alloreactive T Cells to Identify Risk HLA Alleles for Retransplantation After Acute Accelerated Steroid-Resistant Rejection*. Transplant Proc, 2015. **47**(8): p. 2425-32.
112. Ekberg, H., et al., *Reduced exposure to calcineurin inhibitors in renal transplantation*. N Engl J Med, 2007. **357**(25): p. 2562-75.
113. Matas, A.J., et al., *OPTN/SRTR 2013 Annual Data Report: kidney*. Am J Transplant, 2015. **15 Suppl 2**: p. 1-34.
114. Martinu, T., et al., *Acute allograft rejection: cellular and humoral processes*. Clin Chest Med, 2011. **32**(2): p. 295-310.
115. Christie, J.D., et al., *The Registry of the International Society for Heart and Lung Transplantation: twenty-seventh official adult lung and heart-lung transplant report--2010*. J Heart Lung Transplant, 2010. **29**(10): p. 1104-18.
116. Ashokkumar, C., et al., *Predicting Cellular Rejection With a Cell-Based Assay: Preclinical Evaluation in Children*. Transplantation, 2017. **101**(1): p. 131-140.
117. Tanaka, Y., et al., *Low incidence of acute rejection after living-donor liver transplantation: immunologic analyses by mixed lymphocyte reaction using a carboxyfluorescein diacetate succinimidyl ester labeling technique*. Transplantation, 2005. **79**(9): p. 1262-7.
118. Dogan, N., et al., *Acute allograft rejection in liver transplant recipients: Incidence, risk factors, treatment success, and impact on graft failure*. J Int Med Res, 2018. **46**(9): p. 3979-3990.
119. Gandolfini, I., et al., *Impact of preformed T-cell alloreactivity by means of donor-specific and panel of reactive T cells (PRT) ELISPOT in kidney transplantation*. PLoS One, 2018. **13**(7): p. e0200696.

120. De Haan, A., et al., *Detection of alloreactive T cells by flow cytometry: a new test compared with limiting dilution assay*. *Transplantation*, 2002. **74**(4): p. 562-70.
121. Sester, M., et al., *The "ABC" of Virus-Specific T Cell Immunity in Solid Organ Transplantation*. *Am J Transplant*, 2016. **16**(6): p. 1697-706.
122. Gebauer, B.S., et al., *Evolution of the enzyme-linked immunosorbent spot assay for post-transplant alloreactivity as a potentially useful immune monitoring tool*. *Am J Transplant*, 2002. **2**(9): p. 857-66.
123. Bestard, O., et al., *Prospective assessment of antidonor cellular alloreactivity is a tool for guidance of immunosuppression in kidney transplantation*. *Kidney Int*, 2013. **84**(6): p. 1226-36.
124. Assi, M.A., et al., *Graft-vs.-host disease in lung and other solid organ transplant recipients*. *Clin Transplant*, 2007. **21**(1): p. 1-6.
125. Smith, D.M., et al., *Liver transplant-associated graft-versus-host disease*. *Transplantation*, 2003. **75**(1): p. 118-26.
126. Taylor, A.L., P. Gibbs, and J.A. Bradley, *Acute graft versus host disease following liver transplantation: the enemy within*. *Am J Transplant*, 2004. **4**(4): p. 466-74.
127. Ferrara, J.L., et al., *Graft-versus-host disease*. *Lancet*, 2009. **373**(9674): p. 1550-61.
128. Triulzi, D.J. and M.A. Nalesnik, *Microchimerism, GVHD, and tolerance in solid organ transplantation*. *Transfusion*, 2001. **41**(3): p. 419-26.
129. Flomenberg, N., et al., *Impact of HLA class I and class II high-resolution matching on outcomes of unrelated donor bone marrow transplantation: HLA-C mismatching is associated with a strong adverse effect on transplantation outcome*. *Blood*, 2004. **104**(7): p. 1923-30.
130. Zhang, Y. and P. Ruiz, *Solid organ transplant-associated acute graft-versus-host disease*. *Arch Pathol Lab Med*, 2010. **134**(8): p. 1220-4.
131. Pavenski, K., et al., *Lung transplantation complicated by graft-versus-host disease and confounded by incidental transfusion-associated macrochimerism*. *Transfusion*, 2008. **48**(10): p. 2190-6.
132. Rentenaar, R.J., et al., *Differentiation of human alloreactive CD8(+) T cells in vitro*. *Immunology*, 2002. **105**(3): p. 278-85.
133. Melenhorst, J.J., et al., *Alloreactivity across HLA barriers is mediated by both naive and antigen-experienced T cells*. *Biol Blood Marrow Transplant*, 2011. **17**(6): p. 800-9.
134. Macedo, C., et al., *Contribution of naive and memory T-cell populations to the human alloimmune response*. *Am J Transplant*, 2009. **9**(9): p. 2057-66.
135. Krummey, S.M. and M.L. Ford, *Heterogeneity within T Cell Memory: Implications for Transplant Tolerance*. *Front Immunol*, 2012. **3**: p. 36.
136. Hricik, D.E., et al., *Effects of cellular sensitization and donor age on acute rejection and graft function after deceased-donor kidney transplantation*. *Transplantation*, 2013. **95**(10): p. 1254-8.
137. Litjens, N.H., et al., *The human alloreactive CD4+ T-cell repertoire is biased to a Th17 response and the frequency is inversely related to the number of HLA class II mismatches*. *Blood*, 2009. **114**(18): p. 3947-55.
138. Litjens, N.H., et al., *Activation-induced CD137 is a fast assay for identification and multi-parameter flow cytometric analysis of alloreactive T cells*. *Clin Exp Immunol*, 2013. **174**(1): p. 179-91.
139. Sester, U., et al., *Differences in CMV-specific T-cell levels and long-term susceptibility to CMV infection after kidney, heart and lung transplantation*. *Am J Transplant*, 2005. **5**(6): p. 1483-9.

140. Sester, U., et al., *Impaired detection of Mycobacterium tuberculosis immunity in patients using high levels of immunosuppressive drugs.* Eur Respir J, 2009. **34**(3): p. 702-10.
141. Leyking, S., et al., *Calcineurin inhibitors differentially alter the circadian rhythm of T-cell functionality in transplant recipients.* J Transl Med, 2015. **13**: p. 51.
142. Hricik, D.E., et al., *Interferon Gamma ELISPOT Testing as a Risk-Stratifying Biomarker for Kidney Transplant Injury: Results From the CTOT-01 Multicenter Study.* Am J Transplant, 2015. **15**(12): p. 3166-73.
143. Andree, H., et al., *Identification of dialysis patients with panel-reactive memory T cells before kidney transplantation using an allogeneic cell bank.* J Am Soc Nephrol, 2006. **17**(2): p. 573-80.
144. Adams, A.B., et al., *Heterologous immunity provides a potent barrier to transplantation tolerance.* J Clin Invest, 2003. **111**(12): p. 1887-95.
145. Ford, M.L. and C.P. Larsen, *Overcoming the memory barrier in tolerance induction: molecular mimicry and functional heterogeneity among pathogen-specific T-cell populations.* Curr Opin Organ Transplant, 2010. **15**(4): p. 405-10.
146. Heutinck, K.M., et al., *Virus-Specific CD8(+) T Cells Cross-Reactive to Donor-Alloantigen Are Transiently Present in the Circulation of Kidney Transplant Recipients Infected With CMV and/or EBV.* Am J Transplant, 2016. **16**(5): p. 1480-91.
147. Betjes, M.G., *Immune cell dysfunction and inflammation in end-stage renal disease.* Nat Rev Nephrol, 2013. **9**(5): p. 255-65.
148. Meijers, R.W., et al., *Uremia causes premature ageing of the T cell compartment in end-stage renal disease patients.* Immun Ageing, 2012. **9**(1): p. 19.
149. Sester, M., et al., *Sustained high frequencies of specific CD4 T cells restricted to a single persistent virus.* J Virol, 2002. **76**(8): p. 3748-55.
150. Shabir, S., et al., *Cytomegalovirus-Associated CD4(+) CD28(null) Cells in NKG2D-Dependent Glomerular Endothelial Injury and Kidney Allograft Dysfunction.* Am J Transplant, 2016. **16**(4): p. 1113-28.
151. Fletcher, J.M., et al., *Cytomegalovirus-specific CD4+ T cells in healthy carriers are continuously driven to replicative exhaustion.* J Immunol, 2005. **175**(12): p. 8218-25.
152. Macdonald, W.A., et al., *T cell allorecognition via molecular mimicry.* Immunity, 2009. **31**(6): p. 897-908.
153. Ford, M.L., *Virally-Induced Heterologous Immunity in Renal Transplant Recipients: Important or Inconsequential?* Am J Transplant, 2016. **16**(5): p. 1348-9.
154. Valentin, G., *Lehrbuch der Physiologie des Menschen.* Braunschweig Vieweg, 1850. **3.Auflage.**
155. Rohen, J.L.-D., E, *Funktionelle Anatomie des Menschen: Lehrbuch der makroskopischen Anatomie nach funktionellen Gesichtspunkten.* Schattauer Verlag, 2005. **11.Auflage.**
156. Anderhuber, F.P.F.S., J, *Waldeyer - Anatomie des Menschen.* De Gruyter Verlag, 2012. **19.Auflage.**
157. Reznik, S.I., et al., *Indirect allorecognition of mismatched donor HLA class II peptides in lung transplant recipients with bronchiolitis obliterans syndrome.* Am J Transplant, 2001. **1**(3): p. 228-35.
158. Bharat, A. and T. Mohanakumar, *Autoimmunity and lung transplantation.* Front Biosci (Elite Ed), 2012. **4**: p. 2378-88.
159. Bestard, O., et al., *Circulating alloreactive T cells correlate with graft function in longstanding renal transplant recipients.* J Am Soc Nephrol, 2008. **19**(7): p. 1419-29.

160. Najafian, N., et al., *Enzyme-linked immunosorbent spot assay analysis of peripheral blood lymphocyte reactivity to donor HLA-DR peptides: potential novel assay for prediction of outcomes for renal transplant recipients*. J Am Soc Nephrol, 2002. **13**(1): p. 252-9.
161. Heeger, P.S., *T-cell allorecognition and transplant rejection: a summary and update*. Am J Transplant, 2003. **3**(5): p. 525-33.
162. Reinsmoen, N.L., et al., *Pretransplant donor-specific and non-specific immune parameters associated with early acute rejection*. Transplantation, 2008. **85**(3): p. 462-70.
163. Poggio, E.D., et al., *Panel of reactive T cells as a measurement of primed cellular alloimmunity in kidney transplant candidates*. J Am Soc Nephrol, 2006. **17**(2): p. 564-72.
164. Dierselhuis, M. and E. Goulmy, *The relevance of minor histocompatibility antigens in solid organ transplantation*. Curr Opin Organ Transplant, 2009. **14**(4): p. 419-25.
165. Jalalzadeh, M., et al., *The impact of acute rejection in kidney transplantation on long-term allograft and patient outcome*. Nephrourol Mon, 2015. **7**(1): p. e24439.
166. Kreijveld, E., et al., *Immunological monitoring of renal transplant recipients to predict acute allograft rejection following the discontinuation of tacrolimus*. PLoS One, 2008. **3**(7): p. e2711.
167. Kim, S.H., et al., *Pretransplant donor-specific interferon-gamma ELISPOT assay predicts acute rejection episodes in renal transplant recipients*. Transplant Proc, 2007. **39**(10): p. 3057-60.
168. Nather, B.J., et al., *Modified ELISPOT technique--highly significant inverse correlation of post-Tx donor-reactive IFNgamma-producing cell frequencies with 6 and 12 months graft function in kidney transplant recipients*. Transpl Immunol, 2006. **16**(3-4): p. 232-7.
169. Pahar, B., et al., *Detection of antigen-specific T cell interferon gamma expression by ELISPOT and cytokine flow cytometry assays in rhesus macaques*. J Immunol Methods, 2003. **282**(1-2): p. 103-15.
170. Bundesärztekammer, *Richtlinien für die Wartelistenführung und die Organvermittlung gem. § 16 Abs. 1 S. 1 Nrn. 2 u. 5 TPG*. Richtlinien der Deutschen Ärztekammer, 2013.
171. Bundesärztekammer, *Richtlinie zur Organtransplantation gemäß § 16 Transplantationsgesetz - „Anforderungen an die im Zusammenhang mit einer Organentnahme und -übertragung erforderlichen Maßnahmen zur Qualitätssicherung“* Richtlinien der Deutschen Ärztekammer, 2001.
172. DeWolf, S., Y. Shen, and M. Sykes, *A New Window into the Human Alloresponse*. Transplantation, 2016. **100**(8): p. 1639-49.
173. Okanami, Y., et al., *Intracellular interferon-gamma staining analysis of donor-specific T-cell responses in liver transplant recipients*. Transplant Proc, 2012. **44**(2): p. 548-54.
174. Petroff, M.G., *Review: Fetal antigens--identity, origins, and influences on the maternal immune system*. Placenta, 2011. **32 Suppl 2**: p. S176-81.
175. Taglauer, E.S., K.M. Adams Waldorf, and M.G. Petroff, *The hidden maternal-fetal interface: events involving the lymphoid organs in maternal-fetal tolerance*. Int J Dev Biol, 2010. **54**(2-3): p. 421-30.
176. Trowsdale, J. and A.G. Betz, *Mother's little helpers: mechanisms of maternal-fetal tolerance*. Nat Immunol, 2006. **7**(3): p. 241-6.

177. Petroff, M.G., *Immune interactions at the maternal-fetal interface*. J Reprod Immunol, 2005. **68**(1-2): p. 1-13.
178. Huddleston, H. and D.J. Schust, *Immune interactions at the maternal-fetal interface: a focus on antigen presentation*. Am J Reprod Immunol, 2004. **51**(4): p. 283-9.
179. Lissauer, D., et al., *Fetal-specific CD8+ cytotoxic T cell responses develop during normal human pregnancy and exhibit broad functional capacity*. J Immunol, 2012. **189**(2): p. 1072-80.
180. Watanabe, M., et al., *Changes in T, B, and NK lymphocyte subsets during and after normal pregnancy*. Am J Reprod Immunol, 1997. **37**(5): p. 368-77.
181. van Kampen, C.A., et al., *Kinetics of the pregnancy-induced humoral and cellular immune response against the paternal HLA class I antigens of the child*. Hum Immunol, 2002. **63**(6): p. 452-8.
182. Tafuri, A., et al., *T cell awareness of paternal alloantigens during pregnancy*. Science, 1995. **270**(5236): p. 630-3.
183. Lurie, S., et al., *Total and differential leukocyte counts percentiles in normal pregnancy*. Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol, 2008. **136**(1): p. 16-9.
184. Iwatani, Y., et al., *Changes of lymphocyte subsets in normal pregnant and postpartum women: postpartum increase in NK/K (Leu 7) cells*. Am J Reprod Immunol Microbiol, 1988. **18**(2): p. 52-5.
185. Piper, K.P., et al., *Functional HY-specific CD8+ T cells are found in a high proportion of women following pregnancy with a male fetus*. Biol Reprod, 2007. **76**(1): p. 96-101.
186. James, E., et al., *Multiparity induces priming to male-specific minor histocompatibility antigen, HY, in mice and humans*. Blood, 2003. **102**(1): p. 388-93.
187. Ghafourian, M., A. Abuhamidy, and N. Karami, *Increase of peripheral blood TCD8+ cells in women with recurrent miscarriage*. J Obstet Gynaecol, 2014. **34**(1): p. 36-9.

8 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Schematische Darstellung der intrazellulären und extrazellulären Antigenprozessierung.....	21
Abbildung 2: Einteilung von Abstoßungsreaktionen nach ihrem immunologischen Mechanismus in akute Antikörper-vermittelte und zellulär-vermittelte Abstoßungsreaktionen.....	24
Abbildung 3: Schematische Darstellung der drei Alloantigen-Präsentationswege..	26
Abbildung 4: Schematische Darstellung verschiedener Testprinzipien zum Nachweis einer humoral- oder zellulär-vermittelten präformierten Alloreaktivität.....	33
Abbildung 5: Übersichtsdarstellung des verwendeten Patienten- und Kontrollkollektives..	45
Abbildung 6: Darstellung des Vollblutverfahrens und Festlegung der Gating-Strategie zum Nachweis alloreaktiver T-Zellen.....	57
Abbildung 7: Alloreaktive T-Zellen sind mittels des Vollblutverfahrens nachweisbar.....	73
Abbildung 8: Charakterisierung alloreaktiver CD8 T-Zellen.....	76
Abbildung 9: Alloreaktive T-Zellen bleiben im zeitlichen Verlauf stabil messbar..	79
Abbildung 10: Patienten auf der Transplantationswarteliste für eine Niere weisen höhere alloreaktive CD4 und CD8 T-Zell Frequenzen auf als immungesunde Probanden.....	80
Abbildung 11: Quantitative Unterschiede in der Verteilung alloreaktiver CD4 und CD8 T-Zellen bei Patienten auf der Transplantationswarteliste für eine Niere und immungesunden Probanden.....	81
Abbildung 12: Interindividuelle Analyse alloreaktiver T-Zellen bei Patienten auf der Transplantationswarteliste für eine Niere.	83
Abbildung 13: Zusammenhang alloreaktiver T-Zellen mit der Anzahl an HLA-A/-B/-DR Mismatchen.	85

Abbildung 14: Das Auftreten alloreaktiver T-Zellen im Zusammenhang mit der Anzahl an HLA-A/-B/-DR-Mismatchen bei immungesunden Probanden und niereninsuffizienten Patienten.....	86
Abbildung 15: Alloreaktive T-Zellen bei Patienten auf der Transplantationswarteliste für eine Leber oder Lunge.	88
Abbildung 16: Anwendung von EDTA-Vollblut als weiteres Antikoagulanzen bei der alloreaktiven und SEB-reaktiven T-Zell Bestimmung ist nur bedingt geeignet.....	90
Abbildung 17: Analyse alloreaktiver T-Zellen vor und im Verlauf nach Transplantation.....	93
Abbildung 18: Nachweis alloreaktiver T-Zellen eines Patienten vor Lungentransplantation und klinischer Verlauf nach Transplantation.	95
Abbildung 19: Nachweis alloreaktiver T-Zellen eines Patienten vor Lebertransplantation und klinischer Verlauf nach Transplantation.	98
Abbildung 20: Nachweis alloreaktiver T-Zellen einer Patientin vor Nierentransplantation und klinischer Verlauf nach Transplantation.	101
Abbildung 21: Klinischer Verlauf eines Patienten auf der Warteliste für eine Niere und histologische Analyse des abgestoßenen Nierentransplantats.....	103
Abbildung 22: Charakterisierung der Immunantwort eines Patienten mit Zustand nach akuter Abstoßungsreaktion und Transplantatverlust.....	107
Abbildung 23: Humorale und zelluläre Alloreaktivität nach der ersten Nierentransplantation und alloreaktive T-Zell Messungen unmittelbar vor der zweiten Nierentransplantation.....	111
Abbildung 24: Austestung der Transportbedingungen von Vollblutproben zum Nachweis reaktiver T-Zellen.....	115
Abbildung 25: Evaluation des Übernachtversands zum nachfolgenden Nachweis alloreaktiver, CMV-spezifischer und SEB-reaktiver CD4 und CD8 T-Zellen von Nieren-Lebenspendler-Paarungen.	117
Abbildung 26: Alloreaktive T-Zellen bei Schwangeren und bei Probanden ohne Schwangerschaft.....	121

Abbildung 27: Querschnittsanalyse alloreaktiver und SEB-reaktiver T-Zellen im Verlauf einer Schwangerschaft.	123
Abbildung 28: Longitudinale Analyse alloreaktiver und SEB-reaktiver T-Zellen im Verlauf einer Schwangerschaft.	124
Abbildung 29: Frauen mit männlichen Nachkommen zeigten mit Fortschritt der Schwangerschaft eine erhöhte CD8 T-Zell Alloreaktivität.	126

9 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Verwendete Antikörper zur durchflusszytometrischen Analyse oder zur Stimulation.....	41
Tabelle 2: Demographische und klinische Daten der Patienten bei Nierentransplantationen	46
Tabelle 3: Demographische und klinische Daten der Patienten bei Lebertransplantationen	47
Tabelle 4: Demographische und klinische Daten der Patienten bei Lungentransplantationen	49
Tabelle 5: Fluorochrom-Spezifität eingeteilt nach Fluoreszenz Emissionsfarbe, Anregungswellenlänge des Fluorochroms, Anregungswellenlänge des Lasers und Emissionsmaximum	64
Tabelle 6: Zusammensetzung der in dieser Arbeit angewandten Antikörper-Mischungen.	66
Tabelle 7: Anteil von Probanden mit alloreaktiven CD4 und/oder CD8 T-Zellen über bzw. unter der Nachweisgrenze	75
Tabelle 8: Parameter, die möglicherweise das Auftreten alloreaktiver CD8 T-Zellen beeinflussen können	87
Tabelle 9: Alloreaktive T-Zell Frequenzen des Empfängers und HLA-Status des Empfängers, der Spender und der Third-Party Stimulatoren.	108
Tabelle 10: Alloreaktive T-Zell Testungen bei Schwangeren und Probanden ohne Schwangerschaft: Anzahl der Messungen und mittleres Alter der Probandengruppen	119
Tabelle 11: Übersicht über alle klinischen und experimentellen Parameter der Empfänger die in der Multicenterstudie erhoben werden.....	147

10 Abkürzungsverzeichnis

Ag	Antigen
AK	Antikörper
ALAT	Alanin-Aminotransferase
APC	Allophycocyanin
APZ	Antigenpräsentierende Zelle
ATG	Antithymozytenglobulinantikörper
β2-m	β2-Microglobulin
Bfa	Brefeldin A
BrdU	Bromdesoxyuridin
BSA	Bovines Serumalbumin
CAPD	continuous ambulatory peritoneal dialysis „Peritonealdialyse“
CD	Cluster of Differentiation „Unterscheidungsgruppen“
CDC	Complement dependent crossmatch
CFSE	Carboxyfluorescein succinimidyl ester
CLIP	Class II-associated invariant chain peptide
CMV	Cytomegalievirus
CTL	Zytotoxischer T-Zellen
CTLA-4	cytotoxic T-lymphocyte-associated Protein 4
CV	Variationskoeffizient
CyA	Cyclosporin A
DC	Dendritische Zelle
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure

DSA	Donor/Spender-spezifische Antikörper
DTT	Dithiothreitol
EBV	Epstein-Barr-Virus
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ELISA	Enzyme Linked Immunosorbent Assay
ELISPOT	Enzyme Linked Immuno Spot Assay
FACS	Fluorescence activated cell sorting
FCS	Fetales Kälberserum
FCS-Z	Fetales Kälberserum zur Benutzung für Zellkultur
FEV-1	forced expiratory volume in 1 second
FITC	Fluorescein-Isothiocyant
FKBP	FK506 bindendes Protein
FK506	Tacrolimus
FSC	Forward scatter (Vorwärtsstreulicht)
g	Erdbeschleunigung
Gln	Glutamin
GvHR	Graft-versus-Host Reaktion
HBV	Hepatitis B Virus
HCV	Hepatitis C Virus
HD	Hämodialyse
HLA	Human leucocyte antigen
HSA	Humanes Serumalbumin
IFN- γ	Interferon gamma
Ig	Immunglobulin

IL	Interleukin
IR	Interquartal Range
Ko-Ag	Kontroll-Antigen
LiHep	Lithium-Heparin
MELD	Model for End-stage Liver Disease
MFI	Mittlere Fluoreszenzintensität
MHC	Major histocompatibility complex (Hauptgewebeverträglichkeitsgruppierung im Genom)
MICA	MHC class I polypeptide-related sequence A
MICB	MHC class I polypeptide-related sequence B
MLR	Mixed Lymphocyte Reaction
MM	Mismatch
MMF	Mycophenolatmofetil
MP	Methylprednisolon
mTOR	mammalian Target of Rapamycin
n. a.	Nicht auswertbar
n. b.	Nicht bekannt
NB	Nierenbiopsie
NG	Nachweisgrenze
NK	Natürliche Killerzellen
NTx	Nierentransplantation
p-ANCA	perinuclear anti-neutrophil cytoplasmic antibody
P/S	Penicilin/Streptomycin
PBMC	Mononukleäre Zellen des peripheren Blutes
PBS	Phosphate buffered saline

PE	Phycoerythrin
PE-Cy7	Phycoerythrin-Cyanin 7
PerCP	Peridinin Chlorophyll Protein
PFA	Paraformaldehyd
PRA	Panel reaktiver Antikörper
RAI	Rejektions-Aktivitäts-Index
RNA	Ribonukleinsäure
RPMI	Roswell Park Memorial Institute (Medium)
RT	Raumtemperatur
SEB	<i>Staphylococcus aureus</i> Enterotoxin B
SSC	Side Scatter (Seitwärtsstreulicht im Durchflusszytometer)
TAP	Transporter associated with antigen presentation
TZR	T-Zell-Rezeptor
T _H X-Zellen	T-Helfer-x-Zellen
T _{reg} -Zellen	T-regulatorische Zellen
T _{CM} -Zellen	Zentrale T-Gedächtnis-Zellen
T _{EM} -Zellen	Effektro T-Gedächtnis-Zellen
T _{EMRA} -Zellen	Enddifferenzierte Effektro T-Gedächtnis-Zellen
TNF- α	Tumor-Nekrose Faktor alpha
Tx	Transplantation
U/min	Umdrehung pro Minute
VB	Vollblut

11 Publikationen und Kongressbeiträge

11.1 Originalarbeiten

11.1.1 Originalarbeiten dieser Dissertation

Leyking, S.*, **Wolf, M.***, Mihm, J., Schaefer, M., Bohle, R.M., Fliser, D., Sester, M., and Sester, U. (*Geteilte Erstautorenschaft)

Alloreactive T-cells to identify risk HLA-alleles for re-transplantation after acute accelerated steroid resistant rejection.

Transplantation Proceedings (2015) 47(8):2425-32.

Fischer, M., Leyking, S., Schäfer, M., Elsässer, J., Janssen, M., Mihm, J., van Bentum, K., Fliser, D., Sester, M. and Sester, U.

Donor-specific alloreactive T cells can be quantified from whole blood, and may predict cellular rejection after renal transplantation.

Eur J Immunol (2017) 47(7): 1220-1231.

11.1.2 Weitere Originalarbeiten

Schmidt, T., Adam, C., Hirsch, H.H., Janssen, M.W., **Wolf, M.**, Dirks, J., Kardas, P., Ahlenstiel-Grunow, T., Pape, L., Rohrer, T., Fliser, D., Sester, M., and Sester, U.

BK polyomavirus-specific cellular immune responses are age-dependent and strongly correlate with phases of virus replication.

Am J Transplant (2014) 14:1334-1345.

Schmidt, T., Schub, D., **Wolf, M.**, Dirks, J., Ritter, M., Leyking, S., Singh, M., Zawada, A.M., Blaes-Eise, A.B., Samuel, U., Sester, U., and Sester, M.

Comparative analysis of assays for detection of cell-mediated immunity toward cytomegalovirus and M. tuberculosis in samples from deceased organ donors.

Am J Transplant (2014) 14:2159-2167.

11.2 Kongressbeiträge und Auszeichnungen

Im folgenden sind die Kongresse und Veranstaltungen mit aktiver Beteiligung gelistet. Posterpreise und besondere Auszeichnungen sind ebenfalls dargestellt.

Mai 2012	Eingeladener Vortrag: Alloreaktive T-Zellen bei Lebend-Nierentransplantationen im Zusammenhang mit dem HLA-System Wolf, M.
----------	---

	HLA-Workshop – Stefan-Morsch Stiftung, Birkenfeld
Juli 2012	<p><u>Vortrag:</u> BK virus-specific immune responses are age-dependent and strongly correlate with phases of virus replication</p> <p>Adam, C., Schmidt, T., Hirsch, H.H., Janssen, M., Wolf, M., Dirks, J., Ahlenstiel, T., Pape, L., Fliser, D., Sester, M. und Sester, U.</p> <p>The Transplantation Society (TTS), Berlin</p>
Juli 2012	<p><u>Vortrag:</u> Comparative analysis of assays for detection of cellular immunity towards CMV and <i>M. tuberculosis</i> in samples from deceased donors</p> <p>Schmidt, T., Schub, D., Wolf, M., Dirks, J., Ritter, M., Sester, U., Blaes-Eise, A.-B., Samuel, U. und Sester, M.</p> <p>The Transplantation Society (TTS), Berlin</p>
April 2013	<p><u>Poster:</u> Entwicklung eines neuen durchflusszytometrischen Messverfahrens zum Nachweis präformierter zellulärer Alloreaktivität</p> <p>Wolf, M., Kirsch, S., Janssen, M., Sester, M. und Sester, U.</p> <p>5. Transplantationssymposium von Astellas, München</p>
<p>April 2013</p> <p><u>Auszeichnung mit 1. Posterpreis</u></p>	
Mai 2013	<p><u>Vortrag:</u> Rapid flow-cytometric detection of cell-mediated alloreactivity in healthy individuals and dialysis patients</p> <p>Wolf, M., Kirsch, S., Sester, M. und Sester, U.</p> <p>American Transplant Congress (ATC), Seattle, USA</p>
September 2013	<p><u>Poster:</u> Pre-formed cell-mediated alloreactivity is dominated by CD8 T-cells and is more frequently observed in renal transplant candidates as compared to</p>

	<p>controls</p> <p>Wolf, M., Kirsch, S., Janssen, M., Sester, M., und Sester, U.</p> <p>43. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Immunologie (DGfI), Mainz</p>
<p>Oktober 2013</p> <p><u>Auszeichnung mit Posterpreis</u></p>	<p>Poster: Preformed cellular alloreactivity is dominated by CD8 T-cells and is more frequently observed in renal transplant candidates as compared to controls.</p> <p>Wolf, M., Kirsch, S., Janssen, M., Sester, M. und Sester, U.</p> <p>22. Jahrestagung der Deutschen Transplantationsgesellschaft (DTG), Frankfurt am Main</p>
<p>Mai 2014</p>	<p>Eingeladener Vortrag: Identifizierung gegen HLA-Antigene gerichteter alloreaktiver T-Zellen bei Transplantatempfängern</p> <p>Leyking, S. und Wolf, M.</p> <p>HLA-Workshop – Stefan-Morsch Stiftung, Birkenfeld</p>
<p>Mai 2014</p> <p><u>Auszeichnung mit 1. Posterpreis</u></p>	<p>Poster: Frühzeitige Identifizierung einer Patientin mit akuter zellulärer Abstoßung durch die Bestimmung von präformierten alloreaktiven T-Zellen gegen den Organspender</p> <p>Wolf, M., Leyking, S., Mihm, J., Fliser, D., Sester, M. und Sester, U.</p> <p>6. Transplantationssymposium von Astellas, München</p>
<p>Juli 2014</p> <p><u>„Poster of Distinction“</u> (Auszeichnung der besten 20% der Abstracts des jeweiligen Themengebietes)</p>	<p>Poster: Preformed cellular alloreactivity is associated with human leukocyte antigen mismatches</p> <p>Wolf, M., Leyking, S., Janssen, M., Mihm, J., Schäfer, M., Sester, U. und Sester, M.</p>

	World Transplant Congress, San Francisco, USA
Oktober 2014	<p>Poster: Preformed cellular alloreactivity is associated with human leukocyte antigen mismatches</p> <p>Wolf, M., Leyking, S., Janssen, M., Mihm, J., Schäfer, M., Sester, U. und Sester, M.</p> <p>23. Jahrestagung der Deutschen Transplantationsgesellschaft (DTG), Mannheim</p>
Oktober 2014 <u>Auszeichnung mit Posterpreis</u>	<p>Poster: Early identification of a patient with acute cellular rejection by detection of preformed alloreactive T-cells against the donor</p> <p>Wolf, M., Leyking, S., Mihm, J., Fliser, D., Sester, M. und Sester, U.</p> <p>23. Jahrestagung der Deutschen Transplantationsgesellschaft (DTG), Mannheim</p>
Oktober 2015	<p>Poster: Nachweis präformierter alloreaktiver CD8 T-Zellen bei Patienten auf der Leberwarteliste</p> <p>Wolf, M., Roller, J., Leyking, S., Sester, U., Appenrodt, B., Jüngst, C., Grünhage, F., Flieser, D., Sester, M. und Eisele, R.</p> <p>24. Jahrestagung der Deutschen Transplantationsgesellschaft (DTG), Dresden</p>
Oktober 2015	<p>Poster: Messung präformierter alloreaktiver T-Zellen vor einer Nierenlebendspende – Funktionalität bleibt auch nach Übernachtversand der Proben erhalten</p> <p>Wolf, M., Freiwald, T., Leyking, S., Sester, U., Flieser, D., Hauser, I.A. und Sester, M.</p> <p>24. Jahrestagung der Deutschen Transplantationsgesellschaft (DTG), Dresden</p>

<p>Oktober 2015</p> <p><u>Auszeichnung mit Bernd Schönberger Preis</u></p>	<p><u>Eingeladener Vortrag:</u> Alloreaktivität Vorhersagen</p> <p>Wolf, M.</p> <p>Nierenworkshop des Arbeitskreises Nierentransplantation der DGU in Homburg</p>
<p>Juni 2016</p>	<p><u>Eingeladener Vortrag:</u> Die Rolle präformierter alloreaktiver T-Zellen im Transplantationssetting</p> <p>Wolf, M.</p> <p>HLA-Workshop – Stefan-Morsch Stiftung, Birkenfeld</p>
<p>September 2016</p>	<p><u>Poster:</u> Prevalence of preformed alloreactive CD4 and CD8 T-cells in renal transplant candidates and healthy controls characterized by a rapid whole blood assay</p> <p>Fischer, M., Leyking, S., Schäfer, M., Elsäßer, J., Janssen, M., Mihm, J., van Bentum, K., Fliser, D., Sester, M. und Sester, U.</p> <p>46. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Immunologie (DGfI), Hamburg</p>
<p>November 2016</p>	<p><u>Eingeladener Vortrag:</u> Alloreaktivität vorhersagen</p> <p>Fischer, M.</p> <p>40. Preisverleihung und Jahrestreffen der C.E. Alken-Preisträger, Düsseldorf</p>
<p>April 2018</p>	<p><u>Eingeladener Vortrag:</u> Zelluläre Abstoßungsdiagnostik</p> <p>Fischer, M.</p> <p>HLA-Workshop – Stefan-Morsch Stiftung, Birkenfeld</p>

12 Danksagung

An dieser Stelle möchte ich allen danken, die mich über die Jahre hinweg bei meiner wissenschaftlichen Arbeit unterstützt haben.

Allen voran möchte ich meiner Doktormutter Frau Prof. M. Sester danken. Dafür, dass Sie es mir ermöglicht hat meine Doktorarbeit in ihrer Abteilung und mit einem Thema zu verwirklichen, das mir ans Herz gewachsen ist. Dafür, dass Sie immer ein offenes Ohr hatte, mich in die Konzeption neuer Projekte - aufbauend auf meine Studie - mit einbezogen hat und dafür dass Sie mir die Möglichkeit bot mich bei einer Vielzahl an Kongressveranstaltungen behaupten zu können. „Liebe Tine, du bist wirklich eine super Chefin von der man sehr viel lernen kann.“

Meinen klinischen Betreuern Dr. med. S. Leyking und Prof. U. Sester möchte ich danken. Ohne Ihr Wissen und Ihre ständige Unterstützung bei klinischen und statistischen Fragestellungen wäre diese Arbeit so nicht möglich gewesen. In der Hinsicht auch lieben Dank für die unzähligen spontanen Einsätze und die vielen Überstunden, die Sie eingelegt haben, um mich mit meiner Arbeit zu unterstützen. Ihre Tipps haben mir sehr weitergeholfen. Auch dafür lieben Dank, dass Sie im Klinikalltag mein Projekt nicht vergessen haben und ich Dank Ihrer Hilfe immer wieder neue Probanden für mein Projekt gewonnen habe. Für die Aufklärungen und die Blutentnahmen die Sie geleistet haben und auch die persönlich wieder aufbauenden „Frustrations“-Gespräche, wenn es mal nicht so lief, wie ich es mir vorgestellt habe. Desweiteren möchte ich Ihnen danken, dass Sie mich mit Rat und Tat bei der Niederschrift meiner Arbeit unterstützt und beraten haben.

Ebenso möchte ich mich bei Frau K. Schmitt, C. Guckelmus und L. Lieblang bedanken. Sie standen mir im Labor immer tatkräftig zur Seite, wenn ich spontan Hilfe benötigt habe oder es mal wieder ein sehr langer Arbeitstag wurde. Lieben Dank für Euren Einsatz und Euer Engagement.

Ein weiterer Dank gilt Frau Dr. med. J. Schoch und Herrn Dr. rer. nat. J. Dirks für die sorgfältige Durchsicht meines Skriptes und ihren hilfreichen Anmerkungen.

Desweiteren danke ich Dr. rer. nat. J. Dirks, Dr. rer. nat. T. Schmidt, Dr. rer. nat. D. Schub und S. Marx für gute Tipps bzgl. der Durchflusszytometrie und statistischen Auswertstrategien

und auch spontanen Aushilfsaktionen im Labor. Auch allen weiteren medizinischen Mitarbeitern im Labor und der Klinik sei gedankt. Ohne sie wären meine Tage im Labor nicht so lustig verlaufen. Sie konnten mich auch bei schlechten Situationen immer aufheitern und sind immer für mich da gewesen. Es war wunderbar ein so gutes Arbeitsverhältnis zu haben, das auch noch darüberhinaus fortbesteht. Ebenso möchte ich mich bei allen für spontane Probandenaufklärungen und Blutspendeaktionen bedanken.

Schließlich möchte mich bei allen Blutspendern bedanken. Dafür, dass sie immer, egal zu welcher Tageszeit, bereit waren mich mit meinem Projekt zu unterstützen. Ich weiß ihre vielzähligen Spenden wirklich sehr zu schätzen. Ohne sie wäre diese Arbeit nie zustande gekommen. Deshalb gilt ihnen ein ganz großer Dank!!

Meinen Mann, meinen Eltern und meiner Familie möchte ich danken, dafür dass sie mir immer unterstützend zur Seite standen und Verständnis für meine Arbeit aufbrachten.