

Aus der Fachrichtung Innere Medizin
Abteilung Nephrologie
Klinische Medizin
der Medizinischen Fakultät
der Universität des Saarlandes, Homburg/Saar

**Monitoring von T-zellulären Immunantworten nach Organtransplantation am Beispiel
der HBV-spezifischen Immunantwort und der endogenen Immunsuppression durch
regulatorische T Zellen**

Dissertation zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin

der Medizinischen Fakultät

der UNIVERSITÄT DES SAARLANDES

2014

vorgelegt von:

Janine Mihm geb. Mohrbach

geb. am 26.06.1985 in Neunkirchen (Saar)

Inhaltsverzeichnis

1	Zusammenfassung	5
1.1	Summary	7
2	Einleitung	9
2.1	Die Bedeutung des Hepatitis B Virus bei der Nierentransplantation	9
2.1.1	Das Hepatitis B Virus	9
2.1.2	Klinik und Verlauf	10
2.1.3	Diagnostik	11
2.1.4	Therapie	13
2.1.5	Prävention	14
2.1.6	Verwendung von Nierentransplantaten mit HBV-Infektionsrisiko	14
2.2	Endogene Immunregulation durch regulatorische T Zellen	16
2.2.1	Regulatorische T Zellen (Treg)	16
2.2.2	Subpopulationen von Treg	17
2.2.3	Marker zur Identifizierung von Treg	17
2.2.4	Wirkmechanismen der Treg	18
2.2.5	Therapeutischer Nutzen von Treg	19
2.2.6	Treg nach Nierentransplantation	20
2.2.7	Urämischer Immundefekt bei Patienten mit chronischer Niereninsuffizienz	21
2.3	Zielsetzung dieser Arbeit	21
3	Material und Methoden	23
3.1	Geräte und Reagenzien	23
3.1.1	Materialien und Geräte	23
3.1.2	Reagenzien	24
3.1.3	Immunsuppressiva	25
3.1.4	Dynabeads	26
3.1.5	Antikörper	26
3.1.6	Antigene und Costimulantien	27
3.1.7	Lösungen	28
3.2	Probandenkollektiv	30
3.2.1	Probenmaterial	32
3.2.2	Arbeitsbedingungen	32

3.3	Labordiagnostik	33
3.3.1	Virologische Parameter	33
3.3.2	Routinemäßig kontrollierte Laborparameter nach Nierentransplantation.....	33
3.4	Depletion von Treg über Magnete	33
3.4.1	Waschen des Lithium-heparinisierten Vollblutes	33
3.4.2	Depletion CD25 ⁺ T Zellen	34
3.5	Stimulation der Zytokinproduktion von T Zellen.....	35
3.5.1	Stimulation der Zytokinproduktion antigenspezifischer T Zellen im Vollblut..	35
3.5.2	Stimulation der der T-zellulären Zytokinproduktion nach Depletion regulatorischer T Zellen	36
3.5.3	Fixierung	37
3.6	Durchflusszytometrische Färbungen und Messung.....	37
3.6.1	FACS Färbungen zur Quantifizierung und Charakterisierung von Treg	40
3.6.2	FACS Färbung zur Quantifizierung antigenspezifischer T Zellen.....	42
3.7	Computerprogramme und Statistik.....	43
4	Ergebnisse	45
4.1	Präemptive Therapie bei Transplantation von Nieren einer Spenderin mit chronischer Hepatitis B.....	45
4.1.1	Klinischer Verlauf und Nierenfunktion nach Transplantation.....	45
4.1.2	Immunologisches Monitoring	47
4.2	Treg bei Patienten mit terminaler Niereninsuffizienz	51
4.2.1	Marker zur Identifizierung von Treg.....	51
4.2.2	Treg-Oberflächencharakterisitka.....	54
4.2.3	Funktionelle Charakterisierung der Treg bei HD-Patienten	58
4.3	Optimierung des funktionellen Zytokin-Assays.....	61
4.3.1	Optimierung der Vollblutdepletion	61
4.3.2	Funktionelle Charakterisierung von Treg bei Gesunden.....	68
4.3.3	Beeinflussung der Treg-Funktionalität durch Immunsuppressiva	70
5	Diskussion	72
5.1	Monitoring der HBV-spezifischen T-zellulären Immunantwort nach Nierentransplantation	73
5.2	Monitoring der endogenen Immunsuppression nach Organtransplantation.....	77
5.2.1	Phänotypische Identifizierung von Treg	77
5.2.2	Quantitative Analyse der Treg	78

5.2.3	Phänotypische Charakterisierung von Treg	80
5.2.4	Funktionelle Charakterisierung von Treg	82
5.2.5	Einfluss von Immunsuppressiva auf die Treg nach Nierentransplantation.....	83
5.2.6	Etablierungsarbeiten zur Treg-Depletion aus Vollblut	84
5.2.7	Funktionelle Charakterisierung von Treg bei Gesunden.....	86
5.2.8	Wirkung von Immunsuppressiva auf die Funktionalität von Treg	88
6	Abbildungsverzeichnis	92
7	Tabellenverzeichnis.....	92
8	Abkürzungsverzeichnis	93
9	Literaturverzeichnis.....	96
10	Publikationen.....	107
10.1	Manuskripte	107
10.2	Kongressbeiträge.....	107
10.3	Preise.....	108
10.4	Weitere Publikationen.....	108
10.4.1	Manuskripte.....	108
10.4.2	Kongressbeiträge	108
11	Danksagung	110
12	Lebenslauf	111

1 Zusammenfassung

Die heute verfügbaren Medikamente zur immunsuppressiven Therapie und Prophylaxe von Abstoßungsreaktionen nach Organtransplantation haben wesentlich dazu beigetragen das Transplantat- und Patientenüberleben nach solider Organtransplantation zu verbessern. Infektiöse Komplikationen unter immunsuppressiver Therapie sind jedoch gefürchtet und tragen als eine der Hauptursachen zur Gesamtmortalität dieser Patienten bei. So können Reaktivierungen zuvor kontrollierter, persistierender Virusinfektionen wie beispielsweise des Cytomegalievirus (CMV) oder Hepatitis B Virus (HBV) unter Immunsuppression beobachtet werden. Das Monitoring der CMV-spezifischen Immunantwort bietet eine Möglichkeit zur Individualisierung und Risikoadaptation der antiviralen und immunsuppressiven Therapie des Patienten. Für HBV wurde ein solches T-Zellmonitoring bislang jedoch noch nicht evaluiert.

Die ideale Therapie zur Vermeidung von Abstoßungsreaktionen nach Organtransplantation würde unter Erhaltung pathogen-spezifischer Abwehrreaktionen die gezielte Toleranzinduktion gegenüber Transplantaten erlauben. Die körpereigenen endogenen immunregulatorischen Prozesse unter Beteiligung regulatorischer T Zellen (Treg) sind vor diesem Hintergrund von besonderem Interesse. Bislang ist jedoch unklar, wie regulatorische T Zellen durch die urämische Immundysfunktion bei Patienten mit chronischer Niereninsuffizienz und durch die iatrogen wirkende immunsuppressive Medikation nach Nierentransplantation beeinflusst werden.

Ziel dieser Arbeit war es zum einen den Verlauf eines präemptiven HBV-Therapieansatzes nach Transplantation der Nieren einer chronisch HBV-infizierten Spenderin (HBs-Antigen positiv, anti-HBc positiv, HBV-DNA positiv) in zwei Empfänger mit ausgeheilter HBV-Infektion (anti-HBs positiv, anti-HBc positiv) zu verfolgen und die hierzu gebräuchlichen Viruslastbestimmungen um ein Monitoring der HBV-spezifischen T-zellulären Immunantwort zu ergänzen. Zum anderen sollten Treg von Hämodialysepatienten vor dem Hintergrund des urämischen Immundefektes quantifiziert sowie phänotypisch und funktionell charakterisiert werden. Abschließend sollte die Beeinflussbarkeit der Funktionalität von regulatorischen T Zellen durch Immunsuppressiva im Vollblutmilieu untersucht werden.

Bei beiden untersuchten Patienten, von denen keiner Anzeichen einer HBV-Replikation zeigte, konnte eine stabile HBV-spezifische humorale und zelluläre Immunität trotz immunsuppressiver Therapie nach Nierentransplantation nachgewiesen werden. Die beobachtete Stabilität der HBV-spezifischen Immunantwort vor und insbesondere nach

Transplantation im Zusammenspiel mit nicht nachweisbarer HBV-Last und dem Fehlen klinischer Symptome scheint in Analogie zu CMV Ausdruck einer protektiven Immunität gegenüber HBV zu sein. Methodisch konnte somit das Monitoring der HBV-spezifischen patienteneigenen Immunität erfolgreich in ein präemptives therapeutisches Vorgehen integriert werden. Um jedoch abschließend den Nutzen und die Risiken präemptiver HBV-Therapiestrategien beurteilen zu können, ist es notwendig prospektive Studien, die prophylaktische und präemptive Therapien vergleichen, mit ausreichenden Patientenzahlen durchzuführen.

Unter Verwendung etablierter Marker zur Identifizierung von Treg konnten bei Hämodialysepatienten mit $8,70\% \pm 2,86\%$ signifikant mehr Treg in der CD4 T-Zellpopulation nachgewiesen werden als bei gesunden Kontrollpersonen ($6,44\% \pm 1,57\%$) und nierentransplantierten Patienten ($4,22\% \pm 1,41\%$). Mit Ausnahme einer verminderten CD28-Expression als Hinweis auf eine veränderte Treg-Funktionalität ließen sich keine wesentlichen phänotypischen Unterschiede detektieren. Funktionelle Messungen der Treg-vermittelten Inhibition der Zytokinproduktion von Effektor T Zellen im Vollblut ohne und nach Treg-Depletion zeigten, dass die Funktionalität der Treg terminal niereninsuffizienter Patienten kompromittiert ist. Nach Etablierungsarbeiten konnte im Vollblutmilieu auch die suppressive Wirkung der Treg und deren Beeinflussung durch einzelne immunsuppressive Medikamente analysiert werden. Hierbei zeigte sich, dass die Treg-Funktionalität unter Einwirkung von Prednisolon und Cyclosporin A erhalten blieb, wohingegen sie unter Tacrolimus inhibiert wurde.

Die in dieser Arbeit angewandten Techniken zum Monitoring zellulärer Immunantworten können die Steuerung einer individualisierten und risikoadaptierten Immunsuppression und antiviralen Therapie erleichtern. Die Erkenntnisse über die eingeschränkte Funktionalität von Treg bei Patienten mit Niereninsuffizienz und die differenzielle Beeinflussung der Treg-Funktionalität durch Immunsuppressiva können zu einem verbesserten Verständnis des Zusammenwirkens der endogenen Immunregulation durch Treg und einer exogenen medikamentösen Immunsuppression nach Transplantation beitragen.

1.1 Summary

Monitoring of T-cellular immune responses after organ transplantation using the example of HBV-specific immune responses and the endogenous immunosuppression mediated by regulatory T cells

Currently available drugs for immunosuppressive therapies and for prophylaxis of transplant rejection substantially improved both graft and patient survival after solid organ transplantation. However, infectious complications still represent a major factor for all-cause mortality of these patients. Thus, reactivations of persistent viruses such as cytomegalovirus (CMV) or hepatitis B virus (HBV) can be observed in association with immunosuppression. The monitoring of CMV-specific immune responses offers the opportunity for individualization of both antiviral and immunosuppressive therapies for the single patient. In case of HBV, however, a specific T cell monitoring has not yet been evaluated.

The ideal therapy for prevention of organ transplant rejections would allow selective induction of tolerance towards the graft while the pathogen-specific mechanisms of immune defense are preserved. In this respect, endogenous immunoregulatory processes involving regulatory T cells (Treg) are of particular interest. At present, however, it is not clear how regulatory T cells are influenced by the uraemic immune cell dysfunction of patients with chronic kidney disease, or by iatrogenically prescribed immunosuppressive medication after renal transplantation.

The first part of this thesis aimed at monitoring two patients with cleared HBV-infection (anti-HBs positive, anti-HBc positive) who received the kidney transplants of a chronically HBV-infected donor (HBs-antigen positive, anti-HBc positive, HBV-DNA positive). A pre-emptive HBV therapy approach that not only included standard detection of viral load but also monitoring of HBV-specific T-cell responses was used. In the second part of this thesis, the impact of uraemic immunodeficiency on the quantity, phenotype and function of Treg was characterized in hemodialysis patients. Finally, the impact of immunosuppressants on the functionality of Treg was examined under physiologically relevant whole blood conditions.

Both kidney recipients did not show any sign of HBV-replication after transplantation and a stable HBV-specific humoral and cellular immune response was detected despite immunosuppressive drug therapy. As with CMV-specific immunity, the documented stability in HBV-specific immunity before and especially after transplantation in combination with

non-detectable HBV load and the absence of clinical symptoms seems to indicate a protective HBV-specific immunity. These data show that monitoring of the patients own HBV-specific immunity may be successfully integrated into a pre-emptive therapy approach. However, to finally assess the benefits and risks of pre-emptive therapy regimens in the setting of HBV infection prospective studies comparing prophylaxis and pre-emptive therapies with larger numbers of patients are required.

When using the established markers for the identification of Treg, hemodialysis patients had significantly more Treg among CD4 T cells ($8,70\% \pm 2,86\%$) than healthy controls ($6,44\% \pm 1,57\%$) and renal transplant recipients ($4,22\% \pm 1,41\%$). Except for a slightly lower expression of CD28 as sign of reduced Treg functionality no substantial phenotypical differences could be found. Functional analysis of the Treg-mediated inhibition of effector T cell cytokine production in whole blood with and without Treg depletion showed that the functionality of Treg from patients with end-stage kidney disease was impaired. Moreover, after refining technical details, the suppressive activity of Treg and its modulation by immunosuppressive drugs could be analyzed. It was shown that the functionality of Treg was maintained under the influence of prednisolone and cyclosporin A, whereas tacrolimus inhibited their functionality.

The techniques applied in this study to monitor cellular immune responses may have potential to be used to individualize immunosuppressive and antiviral therapy. The impaired functionality of Treg from patients with kidney dysfunction and the differential effects of immunosuppressants on Treg functionality can contribute to an improved understanding of the interaction between endogenous immune regulation mediated by Treg and exogenous immunosuppressive therapy after transplantation.

2 Einleitung

2.1 Die Bedeutung des Hepatitis B Virus bei der Nierentransplantation

Ziel der Transplantationsmedizin ist es Patienten, deren Grunderkrankungen zu einer irreversiblen vital bedrohenden Organschädigung geführt haben, durch die Neueinpflanzung eines Spenderorgans eine Therapieoption bieten zu können. Ein großes Problem stellt jedoch die begrenzte Verfügbarkeit von Organtransplantaten dar, so dass nach immer neuen Wegen gesucht wird diese Organknappheit zu überwinden. Eine Möglichkeit bietet die selektive Akzeptanz von Spendern mit chronischen Viruserkrankungen wie HIV oder den Hepatitiden B und C für Patienten, die gegenüber dem betreffenden Pathogen immun sind oder selbst chronisch infiziert sind, da hier bei relativ geringer Wahrscheinlichkeit für zusätzliche Virus-assoziiertes Komplikationen mehr Organe für diese Patienten zur Verfügung stehen könnten.

In Einzelfällen wurden bereits Nieren von chronisch an Hepatitis B erkrankten Spendern erfolgreich transplantiert. Trotzdem sind die Nieren chronisch Hepatitis B Virus (HBV)-infizierter Spender laut Richtlinien zur Organtransplantation der Bundesärztekammer nur als eingeschränkt vermittlungsfähig einzustufen (BUNDESÄRZTEKAMMER, 2013) und ihre Transplantation wird im Allgemeinen nicht empfohlen. Jedoch könnte deren Verwendung eine Möglichkeit darstellen die Wartezeit auf der Transplantationsliste von Patienten mit schützender HBV-Immunität zu verkürzen, gerade vor dem Hintergrund des herrschenden Organmangels. Durch die Transplantationsskandale der letzten Jahre ist laut Deutscher Stiftung für Organtransplantation (DSO) die Zahl der Organspender 2012 deutschlandweit im Vergleich zu den mittleren Werten des Zeitraums von 2003-2011 um 13,8% gesunken und dieser Trend hält weiter an (DSO, 2012). Aber auch in Ländern, in denen HBV endemisch ist und ein hoher Prozentsatz der Bevölkerung chronisch mit HBV infiziert ist, würden die Organempfänger von der Erweiterung des Spenderpools profitieren, gerade weil in Endemiegebieten viele Empfänger durch eine ausgeheilte HBV-Infektion immun sind oder selbst chronisch infiziert sind, denn auch eine chronische HBV-Infektion des Empfängers stellt keine Kontraindikation für eine Organtransplantation dar (CORNBURG et al., 2011).

2.1.1 Das Hepatitis B Virus

Das Hepatitis B Virus (HBV) ist ein kleines hepatotropes DNA-Virus (mit überwiegend doppelsträngigem Genom) und gehört zur Familie der Hepadnaviridae. Das infektiöse Virion enthält in seiner äußeren Lipidhülle HBs-(Surface-) Antigen (Hbs-Ag), wohingegen das

Viruskapsid im Inneren durch HBc-(Core-) Antigen (HBc-Ag) gebildet wird. Hierin befinden sich die virale Nukleinsäure und eine Polymerase. Während des viralen Replikationszyklus wird in den Hepatozyten zudem HBe- Antigen (HBe-Ag) als „exkretorische“ Variante des HBc-Antigens exprimiert und sezerniert (LIANG, 2009).

Laut Angaben der Weltgesundheitsorganisation haben weltweit etwa 2 Milliarden Menschen eine HBV-Infektion durchgemacht und mehr als 240 Millionen Menschen sind chronisch infiziert (HBs-Antigennachweis > 6 Monate). Schätzungsweise 600.000 Menschen sterben jährlich an HBV-assoziierten akuten und chronischen Komplikationen, wie dem Leberversagen, der Leberzirrhose, und dem hepatozellulären Carcinom (HCC) (DIENSTAG, 2008; WHO, updated July 2013). In Deutschland ist die Prävalenz der Hepatitis B Virusinfektion auf 0,3% gesunken (POETHKO-MULLER et al., 2013) und der häufigste Übertragungsweg stellt die sexuelle Exposition dar. Dennoch haben bestimmte Personengruppen ein erhöhtes Infektionsrisiko durch möglichen Kontakt zu infiziertem Blut (z.B.: medizinisches Personal und Hämodialysepatienten) (GIRNDT, KOHLER, 2002; ROBERT-KOCH-INSTITUT, 2012). Das Erregerreservoir ist der Mensch.

2.1.2 Klinik und Verlauf

Der klinische Verlauf einer HBV-Infektion hängt erheblich vom Alter zum Infektionszeitpunkt und der immunologischen Kompetenz des Infizierten ab. Eine akute Infektion im Erwachsenenalter geht in ca. einem Drittel der Fälle mit Ausbildung eines Ikterus einher, heilt aber in > 90% der Fälle spontan vollständig aus und hinterlässt eine lebenslange Immunität. Die übrigen 10% der Fälle verlaufen chronisch und stellen bei oftmals asymptomatischen Personen eine erhebliche Infektionsquelle dar. Dahingegen verläuft die akute Infektion peripartal oder im frühen Kindesalter zumeist asymptomatisch, wird aber in ca. 90% der Fälle chronisch. Bei immunkompromittierten Personen wiederum mündet die akute Infektion in 30–90% der Fälle in einem chronischen Verlauf (LIANG, 2009; ROBERT-KOCH-INSTITUT, 2011).

Besonders kritisch ist zudem, dass es unter immunsuppressiver Therapie zu einer HBV-Reaktivierung kommen kann. Diese kann auch nach klinisch ausgeheilten HBV-Infektionen auftreten (LIANG, 2009; ROBERT-KOCH-INSTITUT, 2011), da das Virus in Hepatozyten persistieren kann (CORNBURG et al., 2011).

2.1.3 Diagnostik

Die Diagnostik der HBV-Infektion erfolgt bei entsprechendem klinischem Verdacht auf eine vorliegende Erkrankung etwa zur Abklärung erhöhter Lebertransaminasen oder bei Ikterus bzw. sollte auch ohne klinischen Verdacht bei Personengruppen mit hohem Infektionsrisiko (z.B. Personen in Gesundheitsberufen, enge Kontaktpersonen HBV-Infizierter, Hämodialysepatienten) oder bei Personen, deren bestehende Grunderkrankung durch eine HBV-Infektion verursacht oder exazerbieren kann (z. B. bei Leberzirrhose) durchgeführt werden (CORNBERG et al., 2011).

Aus der stufenweisen serologischen Testung auf die viralen Antigene HBs und HBe, sowie deren korrespondierenden Antikörper anti-HBs und anti-HBe, sowie anti-HBc Antikörpern im Blut, kann der Infektionsstatus geklärt werden. Abbildung 1 zeigt den Verlauf der Seromarker im Rahmen des natürlichen Verlaufs einer HBV-Infektion, die ausheilt (A) bzw. chronisch (B) verläuft. Tabelle 1 wiederum fasst verschiedene Krankheitsstadien und die entsprechenden Ergebnisse der Virusserologie zusammen.

Grundsätzlich ist bei jedem HBs-Antigen positivem Patienten von einer aktiven Erkrankung und damit einhergehender Infektiosität auszugehen. Zur Einschätzung der Infektiosität dient letztlich aber nur das Ergebnis der quantitativen HBV-PCR. Bei Viruslasten $>10^7$ Internationalen Einheiten/ml (IE/ml) ist von hoher Infektiosität auszugehen, bei Werten $<10^4$ IE/ml ist die Gefahr der Übertragung auf die Transfusion großer infizierter Blutvolumina beschränkt (ROBERT-KOCH-INSTITUT, 2011). In seltenen Fällen gibt es allerdings auch HBV-Stämme, deren HBs-Antigen durch Mutation mit den konventionellen Testmethoden nicht detektiert werden kann. Hier kann trotz negativem HBs-Antigennachweis eine hohe Infektiosität vorliegen. Bei begründetem Verdacht kann nur die Testung auf HBV-DNA die Diagnose sichern (ROBERT-KOCH-INSTITUT, 2011).

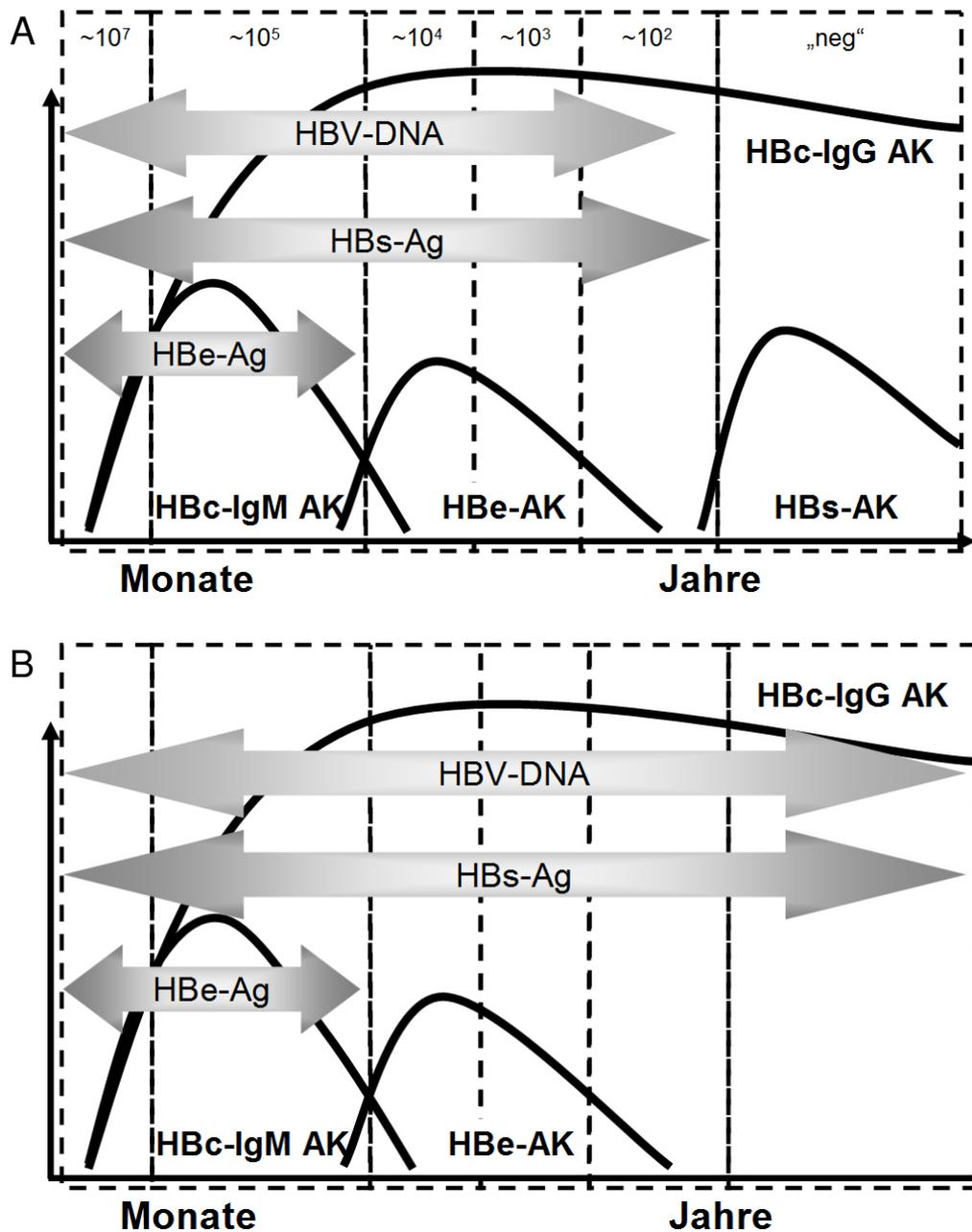


Abbildung 1 Natürliche Verläufe einer HBV-Infektion

Im Rahmen einer HBV-Infektion können im Blut zunächst das virale Erbgut mittels PCR (HBV-DNA) und dann die viralen Antigene HBs (HBs-Ag) und HBe (HBe-Ag) nachgewiesen werden. Die frühzeitig nachweisbaren IgM-Antikörper sind gegen das HBe-Antigen (HBe-IgM AK) gerichtet und persistieren nach Klassenwechsel als IgG (HBc-IgG AK) langfristig. **A** Wird die virale Replikation erfolgreich kontrolliert, heilt die Infektion aus und hinterlässt lebenslange Immunität. Zunächst ist dabei die Serokonversion des HBe-Antigens zu anti-HBe (HBe-AK) zu beobachten. Danach sinkt die Viruslast unter die Nachweisgrenze und letztlich folgt die Serokonversion des HBs-Antigens. **B** Im Rahmen eines chronischen Verlaufes ist es dem Immunsystem des Infizierten nicht möglich die virale Replikation suffizient zu kontrollieren. HBs-Ag ist über mindestens 6 Monate nachweisbar. Falls eine Serokonversion des HBe-Antigens beobachtet werden kann, ist dies oft mit einem Abfall der Viruslast assoziiert. Abhängig von der persistierenden Viruslast besteht fortan Infektiosität.

Tabelle 1 Ergebnisse der HBV-Diagnostik im Krankheitsverlauf

Diagnose	HBsAg	anti-HBs	anti-HBc	HBe-Ag	anti-HBe	HBV-DNA
Impfantwort	-	+	-	-	-	-
akute Infektion	+	-	+	+	-	+
ausgeheilte Infektion	-	(+)	+	-	(+)	-
chronische Infektion	+	-	+	+	-	+
HBs-Carrier	+	-	+	-	(+)	-

+ = positives und - = negatives Testergebnis, (+) = Testergebnis kann positiv sein, je nach Alter der Infektion.

2.1.4 Therapie

In Anbetracht der hohen Spontanheilungsraten akuter Hepatitis B Infektionen im Erwachsenenalter besteht hier in der Regel keine Indikation für eine antivirale Therapie. Diese ist komplizierten Verläufen mit Einbruch der Lebersyntheseleistung und fulminanten Hepatiden vorbehalten. Dahingegen ist sie grundsätzlich für Patienten mit chronischer Hepatitis B in Betracht zu ziehen. Die antivirale Therapie stellt dann im Regelfall eine Monotherapie dar und zunächst sollte für jeden behandlungsbedürftigen Patienten evaluiert werden, ob Interferon α eingesetzt werden kann. Danach kann die Indikation für Hemmstoffe der viralen Replikation (Virustatika) geprüft werden. Präparate wie Lamivudin, Entecavir und Telbivudin bzw. Adefovir und Tenofovir hemmen als Nucleosid- und Nucleotidanaloga die virale Polymerase und somit die Virusreplikation (CORNBURG et al., 2011).

Das Ziel der Therapie einer chronischen Hepatitis B ist die Morbidität und Mortalität der HBV-Infektion zu senken. Es ist eine dauerhafte Suppression der HBV-DNA unter die Nachweisgrenze sowie langfristig eine Serokonversion von HBs-Antigenen zu anti-HBs-Antikörpern anzustreben (CORNBURG et al., 2011). Eine primär kurative Therapie existiert bislang jedoch nicht.

2.1.5 Prävention

Zur Prävention einer HBV-Infektion und ihrer Komplikationen steht eine gut verträgliche und hochwirksame Impfung, deren Nutzen zwischenzeitlich vielfach belegt worden ist, zur Verfügung (ZUCKERMAN, 2006). Aktuell wird von der Ständigen Impfkommision (STIKO) neben der Grundimmunisierung von Kindern und Jugendlichen auch eine HBV-Impfung für Erwachsene empfohlen, sofern diese Risikogruppen mit erhöhtem HBV-Infektionsrisiko angehören (z.B. medizinisches Personal, Hämodialysepatienten) oder wenn wegen einer vorbestehenden Erkrankung ein schwerer Verlauf einer Hepatitis-B-Erkrankung zu erwarten ist (z. B.: leber- und niereninsuffiziente Patienten). Spätestens vor geplanter Organtransplantation sollte eine HBV-Immunsierung angestrebt werden (CORNBERG et al., 2011; KDIGO, 2009; ROBERT-KOCH-INSTITUT, 2013).

2.1.6 Verwendung von Nierentransplantaten mit HBV-Infektionsrisiko

Damit Organe mit HBV-Übertragungsrisiko sicher verwendet werden können, muss der Infektionsstatus von Spender und Empfänger genau erhoben werden. Einerseits können so geeignete HBV-immune (natürlich immunisiert oder geimpft) oder bereits chronisch infizierte Empfänger ausgewählt werden und andererseits das Transmissionsrisiko bzw. Reaktivierungsrisiko einer HBV-Infektion konkreter abgeschätzt werden. In Abhängigkeit dieses Risikos stellt sich die Frage welche Maßnahmen zur Prävention einer klinisch symptomatischen HBV-Infektion und damit assoziierter Komplikationen nach Transplantation zu ergreifen sind.

Prinzipiell ist die Anwendung von zwei unterschiedlichen therapeutischen Ansätzen möglich. Einfach durchzuführen, aber mit eventuellen Nebenwirkungen belastet, ist eine generelle medikamentöse Prophylaxe. Alternativ ist ein präemptives therapeutisches Vorgehen mit engmaschiger Kontrolle des Patienten und Einleitung einer Therapie nur bei Auftreten einer viralen Replikation anwendbar. Bei der Wahl des geeigneten Vorgehens ist neben dem individuellen Risiko des Patienten jedoch auch die Verfügbarkeit von diagnostischen und therapeutischen Möglichkeiten von entscheidender Bedeutung.

Vor genauerer Kenntnis der Transmissions- und Reaktivierungsraten und vor Zulassung der neuen, besser verträglichen nucleosidischen und nucleotidischen Reverse Transkriptase-Inhibitoren (Adefovir, Telbivudin und Tenofovir) wurden HBV-infizierte Empfänger von HBV-positiven Transplantaten prophylaktisch mit Lamivudin und/oder HBV-spezifischen Immunglobulinen antiviral behandelt, um das Risiko infektiöser Komplikationen zu minimieren (CHUNG et al., 2001; LEVITSKY, DOUCETTE, 2009). Heute ist jedoch unter

bestimmten Voraussetzungen auch ein präemptives therapeutisches Vorgehen gerechtfertigt und leitlinienkonform (CORNBERG et al., 2011).

Die aktuelle Leitlinie der Deutschen Gesellschaft für Verdauungs- und Stoffwechselerkrankungen (CORNBERG et al., 2011) empfiehlt beispielsweise zur Prävention von HBV-Reaktivierungen nach solider Organtransplantation (Lebern ausgenommen) für Patienten mit ausgeheilter HBV-Infektion (anti-HBc positiv oder anti-HBc und anti-HBs positiv) keine generelle antivirale Prophylaxe, da das Reaktivierungsrisiko gering ist (KNOLL et al., 2005). Es sollten jedoch engmaschige Kontrollen der HBV-DNA erfolgen und bei positivem DNA-Nachweis eine präemptive Therapie mit Nucleosid- oder Nucleotidanaloga eingeleitet werden. Eine Interferon-Therapie ist aufgrund des erhöhten Transplantatabstoßungsrisikos für diese Patienten zu vermeiden (KDIGO, 2009). Erhalten Patienten Nierentransplantate eines anti-HBc-positiven Spenders, wird aufgrund des geringen Übertragungsrisikos einer HBV-Infektion (<5%, (DE FEO et al., 2005)) ebenfalls keine antivirale Prophylaxe, sondern ein präemptives Vorgehen unter Kontrolle von HBs-Antigen und HBV-DNA empfohlen (CORNBERG et al., 2011).

Die Vorteile präemptiver Therapiestrategien liegen unter anderem in der Vermeidung unerwünschter Arzneimittelwirkungen (wie Nephrotoxizität) und –Interaktionen der prophylaktisch eingesetzten Medikamente, wie es im Fall der CMV Infektion gezeigt wurde (KOTTON, 2013). Für die HBV-Infektion gibt es bisher allerdings nur begrenzt Erfahrungen zur Anwendbarkeit und dem Nutzen eines präemptiven Therapiekonzeptes und umfangreiche prospektive Studien zum direkten Vergleich prophylaktischer und präemptiver Therapieansätze fehlen bislang. Zudem herrscht Uneinigkeit über die genaue Konzeption beider Ansätze, zu verwendende Präparate und Therapiedauer (HWANG et al., 2011; TSAI et al., 2010). Im Falle der CMV-Prävention hingegen werden präemptive Therapiestrategien routinemäßig in der Transplantationsmedizin angewandt und ihr klinischer Nutzen konnte vielfach belegt werden (KOTTON, 2013). Das präemptive Monitoringkonzept der CMV-Infektion in unserem Transplantationszentrums umfasst nicht nur die Testung auf den Nachweis einer viralen Replikation (wie bei HBV empfohlen) mittels PCR und Testung auf virale Antigene, sondern berücksichtigt auch ein Monitoring von Parametern der erregerspezifischen Immunantwort, die Rückschlüsse auf die Immunkompetenz des Patienten erlauben. So können bereits im Vorfeld einer unkontrollierten Virämie mit konsekutiver symptomatischer CMV-Infektion quantitative und qualitative Veränderungen der CMV-spezifischen T Zellen detektiert werden und dadurch frühzeitig eine Therapie eingeleitet werden (SESTER et al., 2001; SESTER et al., 2005; SESTER et al., 2008). Inwieweit ein

präemptives Therapiemonitoring, das neben der Bestimmung der Viruslast auch die erregerspezifische T-zelluläre Immunantwort des Patienten berücksichtigtauch bei HBV-Infektionen möglich ist, ist bislang nicht evaluiert.

2.2 Endogene Immunregulation durch regulatorische T Zellen

Bei persistierenden Virusinfektionen stellt sich nach Transplantation ein stabiles Erreger-Wirt-Gleichgewicht ein, welches wie bei der CMV-Infektion durch konstant nachweisbare erregerspezifische T Zellen charakterisiert ist (SESTER et al., 2001). Damit es in der Akutphase einer Infektion jedoch zur Ausbildung einer erregerspezifischen Immunantwort kommen kann, ist nach Antigenkontakt zunächst eine zum Teil massive Expansion Antigen-spezifischer T Zellen erforderlich, die sich in der Folge zu Effektor T Zellen differenzieren. Nach der erfolgreichen Erregerkontrolle muss dann die Aktivierung des Immunsystems unter Ausbildung einer erregerspezifischen Memory-Antwort wieder auf ein Basisniveau zurückgeführt werden (BAUMGARTNER, MALHERBE, 2011; FEAU, SCHOENBERGER, 2009). Um unerwünschte Immunpathologien zu vermeiden und auch potentiell autoreaktive Immunantworten zu unterdrücken, sind regulatorische T Zellen (Treg), die als eine Form der endogenen Immunsuppression verstanden werden können, hierbei von entscheidender Bedeutung (SAKAGUCHI et al., 2008).

2.2.1 Regulatorische T Zellen (Treg)

Das Konzept immunsuppressiv wirkender T Zellen wurde bereits seit Beginn der 70er Jahre diskutiert. Die initiale Vorstellung von CD8⁺ Suppressor T Zellen konnte sich jedoch aufgrund einer schlechten Charakterisierung der Zellen und fehlender Marker nicht durchsetzen (CORTHAY, 2009). 1995 begründeten Sakaguchi et al. (SAKAGUCHI et al., 1995) durch ihre Arbeit die Theorie der CD4⁺ regulatorischen T Zellen (Treg). Im Mausmodell wurde erstmals gezeigt, dass durch die Depletion von CD4⁺CD25⁺ Zellen sowohl Autoimmunerkrankungen ausgelöst, als auch allogene Immunreaktionen verstärkt werden können. Durch Co-Transfer von CD4⁺CD25⁺ Zellen konnte wiederum das Auftreten von Autoimmunerkrankungen dosisabhängig verhindert werden (SAKAGUCHI et al., 1995). Seither haben intensive Forschungsbemühungen zu einem besseren Verständnis der Treg hinsichtlich ihrer Marker und Wirkmechanismen beigetragen. Als zentraler Transkriptionsfaktor konnte Foxp3 zunächst in der Maus und später im Menschen identifiziert werden (FONTENOT et al., 2003; HORI et al., 2003; RONCADOR et al., 2005). Das durch Mutationen im Foxp3-Gen verursachte IPEX-Syndrom verdeutlicht die Bedeutung der immunregulatorischen Eigenschaften von Foxp3 im Menschen. Da dieses X-chromosomal

vererbt wird, leiden betroffene männliche Nachkommen einer Konduktorin an einer Kombination aus Immundysregulation, Polyendokrinopathie und Enteropathie. Ohne kurative Stammzelltransplantation endet die Erkrankung in der Regel innerhalb des ersten Lebensjahres letal (OCHS et al., 2007).

2.2.2 Subpopulationen von Treg

Prinzipiell wird zwischen zwei Treg-Subpopulationen unterschieden: den im Thymus im Rahmen der T-Zelldifferenzierung gereiften, natürlich vorkommenden Treg (nTreg) und den nach Antigenkontakt aus naiven konventionellen CD4⁺ T Zellen im sekundär lymphatischen Gewebe entstandenen, induzierten Treg (iTreg) (CUROTTO DE LAFAILLE, LAFAILLE, 2009; GEIGER, TAURO, 2012).

Während die nTreg unter anderem anhand ihrer Foxp3-Expression einheitlich identifiziert werden können, stellen die iTreg eine heterogene Population dar. Neben Foxp3⁺ iTreg existieren auch Foxp3⁻ T Zellen mit regulatorischer Funktion. Dazu gehören die durch Antigenkontakt und Interleukin 10 induzierten Tr1 Zellen, wie auch die antigenspezifischen TGFβ produzierenden Th3 Zellen. Je nach induzierendem Stimulus unterscheiden sich iTreg phänotypisch und vermutlich funktionell. Die genaue Bedeutung dieser Zellen und ihre funktionelle Stabilität in vivo bedürfen jedoch noch genauerer Untersuchungen (SAKAGUCHI et al., 2008; ZHENG et al., 2002).

2.2.3 Marker zur Identifizierung von Treg

Vor dem Hintergrund der heterogenen Treg-Populationen stehen zu deren Identifizierung verschiedenste phänotypische Marker zur Verfügung (CORTHAY, 2009). Zu den am häufigsten angewandten Markern zählen neben dem Transkriptionsfaktor Foxp3 die Oberflächenmoleküle CD4, CD25, und CD127. Foxp3⁺ Treg zeichnen sich dadurch aus, dass sie die α-Kette des IL2-Rezeptors (CD25) hoch exprimieren (DIECKMANN et al., 2001) und die α-Kette des IL7-Rezeptors (CD127) nicht (LIU et al., 2006; SEDDIKI et al., 2006). Foxp3 selbst wird in Treg konstitutiv exprimiert und weist gegenüber aktivierungsbedingter, transients Foxp3 Expression in nicht-regulatorischen CD4 T Zellen eine höhere mittlere Fluoreszenzintensität (MFI) auf (ALLAN et al., 2007). Treg im engeren Sinne sind also CD4⁺CD25⁺CD127⁻Foxp3⁺ T Zellen.

Darüber hinaus wurden Treg hinsichtlich der Expression von GITR (MCHUGH et al., 2002), CTLA-4 (TAKAHASHI et al., 2000), CD62L (ERMANN et al., 2005), LAG3 (HUANG et al., 2004) und CD39 (BORSELLINO et al., 2007; DWYER et al., 2007) charakterisiert. Bei

der Verwendung als Marker zum Nachweis von Treg ist allerdings zu berücksichtigen, dass Transkriptionsfaktoren intrazellulär lokalisiert sind und lediglich nach Fixierung sowie Permabilisierung der Zellen zugänglich sind und in der Folge keine funktionellen Analysen mit diesen Zellen durchgeführt werden können. Andere Marker wie CD49d (KLEINWIETFELD et al., 2009), HLA-G (FEGER et al., 2007) oder HLA-DR (SCHAIER et al., 2012) ermöglichen nur den Zugang zu Treg-Subpopulationen, für die zwar eine besonders hohe immunsuppressive Wirkung gezeigt ist, die aber nicht das gesamte Treg-Repertoire umfassen.

2.2.4 Wirkmechanismen der Treg

Wie Treg ihre immunregulatorischen Effekte entfalten, ist Thema zahlreicher Publikationen. Die dazu erforderlichen Methoden beruhen im Kern auf vergleichenden Messungen von Responderzellfunktionen in An- und Abwesenheit von Treg. Einerseits konnten somit Zielzellen der Treg wie, antigenpräsentierende Zellen, NK Zellen, B und T Lymphozyten identifiziert werden und andererseits konnte untersucht werden, ob die immunregulatorische Wirkung der Treg den direkten Kontakt mit der Zielzelle erfordert. Was letztlich jedoch für alle in vitro postulierten Wirkmechanismen zu überprüfen ist, ist inwieweit diese in vivo relevant sind (PETERSON, 2012; SAKAGUCHI et al., 2009; SHEVACH, 2009).

Sakaguchi et al. postulieren, dass es zentrale Wirkmechanismen der Treg-vermittelten Immunmodulation gibt, ohne die es zum Zusammenbruch der Immunhomöostase mit Auftreten von Autoimmunerkrankungen kommt. Dazu gehören die CTLA-4 und IL2 basierten Interaktionen. Zusätzliche synergistische Mechanismen sollen letztlich dazu führen, dass die Treg über einen mehrstufigen Prozess ihre volle immunsuppressive Wirksamkeit entfalten. Maßgeblich hierfür ist das Umgebungsmilieu der Treg und die Art der ablaufenden Immunreaktion, denn daraus resultieren die zur Verfügung stehenden Metabolite und etwaige Zielzellen der Treg (SAKAGUCHI et al., 2009).

CTLA-4-vermittelt hemmen Treg durch Interaktion mit antigenpräsentierenden Zellen deren Expression von CD80 und CD86. Diese beiden Moleküle werden jedoch für costimulatorische Signale via CD28 auf den T Zellen im Rahmen der Antigenerkennung benötigt (WING et al., 2008). CTLA-4-unabhängig können Treg in vitro durch das Adhäsionsmolekül LFA-1 an dendritische Zellen binden und so den Zellkontakt zwischen konventioneller T Zelle und antigenpräsentierender Zelle blockieren (ONISHI et al., 2008). Beide Mechanismen sind Vertreter einer Zellkontakt-abhängigen Inhibition und führen letztlich durch Beeinflussung der Antigenpräsentation zur Hemmung der T-Zellaktivierung.

Diskutiert werden zudem direkte zytotoxische Effekte auf B und T Zellen, bei denen Granzym B und Perforin wichtige Mediatoren darstellen (CAO et al., 2007).

Zellkontaktunabhängig hingegen können Treg durch die Sekretion immunsuppressiver Zytokine (TGF β , IL10, IL35 (COLLISON et al., 2007; JOETHAM et al., 2007; NAKAMURA et al., 2001)) oder die Produktion immunsuppressiver Metabolite (extrazelluläres Adenosin (BORSELLINO et al., 2007)) immunregulatorisch wirken. Durch den Verbrauch von extrazellulärem IL2 durch die Treg fehlt zudem für die übrigen T Zellen ein essenzielles Zytokin zur Zellaktivierung und Proliferationsinduktion, was letztlich zu deren Apoptoseinduktion führt (PANDIYAN et al., 2007).

Treg sind in ihrer Aktivierung und ihrem Überleben wie konventionelle T Zellen auf IL2 angewiesen, das sie im Gegensatz zu den übrigen T Zellen nicht selbst produzieren können (D'CRUZ, KLEIN, 2005; DE LA ROSA et al., 2004; FONTENOT et al., 2005a; SAKAGUCHI et al., 2008). Darüber hinaus scheint eine Costimulation via CD28 für die Expansion und Funktionalität der Treg von Bedeutung zu sein (GOLOVINA et al., 2008; SCOTTA et al., 2008).

2.2.5 Therapeutischer Nutzen von Treg

Durch die Kenntnis der genauen Wirkmechanismen der Treg würde sich die vielversprechende Möglichkeit bieten diese Zellen für therapeutische Zwecke nutzen zu können. In der Transplantationsmedizin etwa könnten Treg zur gezielten Toleranzinduktion gegenüber Spenderorganen Anwendung finden (BATTAGLIA, 2010). Realität ist aktuell jedoch, dass alloreaktive Immunantworten gegenüber Transplantaten und in deren Folgen Abstoßungsreaktionen lediglich exogen, das heißt durch die Gabe immunsuppressiver Medikamente unterdrückt werden können. In diesem Zusammenhang stellt sich die Frage, wie sich diese exogene immunsuppressive Therapie auf die durch Treg vermittelte endogene körpereigene Immunsuppression auswirkt. Beeinflussen die einzelnen Wirkstoffe einer medikamentösen Immunsuppression Treg differenziell oder werden Effektor T Zellen und Treg gleichermaßen inhibiert? Würden Effektor T Zellen durch ein Immunsuppressivum stark, Treg hingegen nur schwach in ihrer Funktionalität beeinflusst werden, so hätten die exogene und die endogene Immunsuppression einen synergistischen Effekt. Würden Treg hingegen stärker als Effektor T Zellen gehemmt werden, so würde der Nettoeffekt von Immunsuppressiva durch die Hemmung der endogenen Immunsuppression abgeschwächt werden. Da es im Verlauf nach solider Organtransplantation auch zu Verschiebungen in den T-Zellsubpopulationen kommt (BETJES, 2013), wäre eine genaue Kenntnis der Interaktion

von exogener und endogener Immunsuppression zur Optimierung zukünftiger Therapiestrategien von entscheidender Bedeutung, um Treg gegebenenfalls bewusst als Therapietarget nutzen zu können.

2.2.6 Treg nach Nierentransplantation

Die Einflüsse der bisher etablierten immunsuppressiven Kombinationstherapien auf quantitative Veränderungen von Treg bei organtransplantierten Patienten waren bereits Gegenstand von Untersuchungen. Dabei wurde einerseits versucht zu klären, ob geringe Frequenzen im peripheren Blut zirkulierender oder Transplantat-infiltrierender Treg mit einem erhöhten Abstoßungsrisiko assoziiert sind (BROWN, WONG, 2008; KREIJVELD et al., 2008). Andererseits wurde beobachtet, dass die Treg-Frequenzen unter der Erhaltungsimmunsuppression in Abhängigkeit von den verwendeten Wirkstoffgruppen voneinander abweichen. Calcineurininhibitoren wie Cyclosporin A und Tacrolimus führen im Blut zu einer Reduktion der Treg-Frequenzen nach Organtransplantation (PRESSER et al., 2009; SAN SEGUNDO et al., 2006; SEGUNDO et al., 2006). Konträr dazu kann es unter dem mTOR-Inhibitor Rapamycin zu einer Expansion der Treg-Population kommen, auch wenn zuvor mit einem Calcineurininhibitor behandelt worden ist (HENDRIKX et al., 2009b). Eine Hochdosistherapie mit Glukokortikoiden zur Behandlung von Abstoßungsreaktionen oder Schüben einer Multiplen Sklerose führt passager zu einem Anstieg der peripher zirkulierenden Treg (BRAITCH et al., 2009; SEISSLER et al., 2012).

Vor dem Hintergrund der beobachteten quantitativen Unterschiede in der Treg-Population wurden in geringerem Umfang auch Untersuchungen der Treg-Funktionalität bei nierentransplantierten Patienten durchgeführt. Dass diese Patienten üblicherweise eine Kombinationstherapie erhalten und die beobachteten Effekte nicht auf einen einzelnen Wirkstoff zurückzuführen sind, ist bei der Interpretation der Ergebnisse allerdings zu berücksichtigen. Unsere Arbeitsgruppe konnte zeigen, dass unter einer Calcineurininhibitor-basierten Therapie eine inhibitorische Wirkung der Treg auf die Zytokinproduktion von Effektor T Zellen nach Antigenstimulation zu beobachten ist. Konkordant zu den im Vergleich zu Gesunden geringeren Treg-Frequenzen war der Anstieg der Zytokinproduktion nach Treg-Depletion bei den nierentransplantierten Patienten jedoch nicht so stark ausgeprägt wie bei gesunden Kontrollpersonen (PRESSER et al., 2009). Unter Therapie mit Rapamycin konnte eine Treg-vermittelte Inhibition der Effektor T Zellproliferation in einer gemischten Lymphozytenreaktion gezeigt werden (HENDRIKX et al., 2009b). Der isolierte Effekt einer Kortisontherapie auf die Treg kann bei organtransplantierten Patienten nur unzureichend

untersucht werden, da diese Patienten in der Regel diese Wirkstoffgruppe nicht als Monotherapie erhalten.

2.2.7 Urämischer Immundefekt bei Patienten mit chronischer Niereninsuffizienz

Im Fall von Patienten, die eine Nierentransplantation erhalten, haben nicht nur die eingenommenen Immunsuppressiva einen negativen Einfluss auf die Immunfunktion. Bedingt durch die Einwirkung der Urämietoxine bei terminaler Niereninsuffizienz kommt es bereits im Vorfeld einer Transplantation zu einer erworbenen Immundysfunktion, die auch nach erfolgreicher Nierentransplantation nicht vollständig reversibel ist und unter dem Begriff des urämischen Immundefektes zusammengefasst wird. Klinisch imponiert eine hohe Infektanfälligkeit bei gleichzeitig beeinträchtigter Etablierung einer adaptiven Immunantwort nach Infektion oder aktiver Immunisierung, wie auch ein erhöhtes Malignomrisiko. Immunologisch sind sowohl die Mechanismen von angeborenem als auch erworbenem Abwehrsystem beeinträchtigt und es resultiert eine chronische inflammatorische Aktivität mit erhöhter Zytokinproduktion, verstärkter akute Phase-Reaktion begleitet von quantitativen und qualitativen Veränderungen in fast allen Leukozytensubpopulationen (BETJES, 2013; GIRNDT et al., 2003; STENVINKEL et al., 2005). Es besteht unter anderem eine ausgesprochene Neigung zur Lymphopenie (DESCAMPS-LATSCHA, CHATENOU, 1996) mit zusätzlicher Verschiebung des Verhältnisses von CD4⁺ zu CD8⁺ T Zellen (BETJES, 2013).

Inwieweit Treg pathophysiologisch in der Genese des urämischen Immundefektes beteiligt sind, oder ob sie durch die Urämietoxine in ihrer Funktionalität beeinträchtigt werden, ist unklar. Es stellte sich daher die Frage, ob sich als immunologisches Korrelat phänotypische Veränderungen der Treg feststellen lassen und ob sich Hinweise für eine Beeinträchtigung der Treg-Funktionalität ergeben.

2.3 Zielsetzung dieser Arbeit

Thematisch gliedert sich die vorliegende Arbeit in zwei Teilabschnitte. Zum einen wurde die erregerspezifische Immunantwort gegenüber HBV nach Nierentransplantation mit HBV-Übertragungsrisiko untersucht werden. Zum anderen sollten regulatorische T Zellen (Treg) phänotypisch und funktionell bei Patienten mit Immundefizienz untersucht werden. Ein weiterer Schwerpunkt lag auf der Analyse der Wirkung von Immunsuppressiva auf regulatorische T Zellen.

Konkretes Ziel dieser Arbeit war es zunächst die Anwendbarkeit, den Nutzen und Erfolg eines präemptiven Therapieansatzes nach Transplantation der Nieren einer chronisch HBV-infizierten Spenderin (HBs-Antigen-positiv, anti-HBc-positiv, HBV-DNA-positiv) in zwei Empfänger mit ausgeheilter HBV-Infektion (anti-HBs positiv, anti-HBc positiv) zu evaluieren. Darüber hinaus sollte untersucht werden, ob ein Monitoring der HBV-spezifischen T-zellulären Immunantwort in Kombination mit Viruslastbestimmungen in Analogie zu CMV im Rahmen einer präemptiven Vorgehensweise angewendet und interpretiert werden kann.

Des Weiteren sollten die Treg von Hämodialysepatienten vor dem Hintergrund des urämischen Immundefektes quantifiziert sowie phänotypisch und funktionell charakterisiert werden. Dazu sollte zunächst geklärt werden, ob die bisher etablierten Marker zur phänotypischen Analyse von Treg auch bei Hämodialysepatienten angewendet werden können. In der Folge sollten dann quantitative und aufbauend auf das zuvor im Labor etablierten Protokoll funktionelle Analysen durchgeführt werden. Ein weiteres Ziel der Arbeit war es die Interaktion zwischen exogener (medikamentöser) und endogener (Treg) Immunsuppression zu untersuchen und zu klären, inwieweit Immunsuppressiva eine synergistische Wirkung mit Treg ausüben. Die suppressive Wirkung der Treg und deren Beeinflussung durch immunsuppressive Medikamente wurde hierbei durch vergleichende Messung der Treg-vermittelten Inhibition von Effektor T Zellfunktionen im Vollblut ohne und nach Treg-Depletion analysiert.

3 Material und Methoden

3.1 Geräte und Reagenzien

3.1.1 Materialien und Geräte

Tabelle 2 Verwendete Materialien und Geräte

Name	Hersteller
1,5ml Reaktionsgefäße	Sarstedt, Nümbrecht
2ml Reaktionsgefäße	Eppendorf
5ml Polypropylen Rundboden Röhrchen (FACS-Röhrchen)	Sarstedt, Nümbrecht
15ml Falcon-Gefäße	Sarstedt, Nümbrecht
20ml BD Discardit II Spritzen	Becton Dickinson S.A., Fraga, Spanien
20ml B. Braun Injekt Spritzen	B. Braun, Melsungen
50ml Falcon-Gefäße	Sarstedt, Nümbrecht
Brutschrank	Heraeus, Hanau
Centrifuge 5415C ($\leq 1,5$ ml Röhrchen), Rotor F-38-30-6	Eppendorf, Hamburg
Durchflusszytometer BD FACS Canto II	BD Biosciences, Heidelberg
Einmal-Plastikpipetten (1ml, 2ml, 5ml, 10ml, 25ml)	Sarstedt, Nümbrecht; Costar, Corning, NY, USA
Kolbenhubpipetten	Gilson / Labmate, Abimed, Langenfeld
Klebestreifen	Tesa, Hamburg
Laborfuge GL	Heraeus, Hanau
MACS-Roller	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach
Magneten	Supermagnete, Gottmadingen
Megafuge 1.0R (≥ 5 ml Röhrchen)	Heraeus, Hanau

Name	Hersteller
Ausschwingrotor #2704, Herstellnummer: 40826102	
Pipettenspitzen für Kolbenhubpipetten	Sarstedt, Nümbrecht
Pipettierhilfe (Pipetboy acu)	Integra Biosciences, Fernwald
Reagenzglasmixer Vortex	Neolab, Heidelberg
Sterile Werkbank:	
“Clean Air“ Typ DLF BSS4	Clean Air Technik bv, Woerden, NL
Tecnoflow	Integra Biosciences, Fernwald

3.1.2 Reagenzien

Tabelle 3 Benötigte Reagenzien

Name	Hersteller
Aqua bidest.	B. Braun, Melsungen
BD FACS Lysingsolution (10-fach)	BD Biosciences, Heidelberg
BD FACS Clean	BD Biosciences, Heidelberg
BD FACS Flow	BD Biosciences, Heidelberg
BD FACS Shutdown Solution	BD Biosciences, Heidelberg
Brefeldin A (BFA)	Sigma-Aldrich, Steinheim
Bovines Serumalbumin (BSA)	Serva, Heidelberg
Ethanol	SAV, Flintsbach a. Inn
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	Sigma-Aldrich, Steinheim
Fötale Kälberserum (FCS)	PAA Laboratories, Pasching, Österreich

Name	Hersteller
Foxp3 Staining Kit: -Diluent -Fixperm Konzentrat - α Foxp3 APC -Permeabilisierungs- Puffer 10fach -Rattennormalserum	eBioscience, San Diego, CA, USA
Glutamin (100-fach, 200mM)	PAA, Cölbe
Humanes Serumalbumin (HSA) (20%)	Baxter, Unterschleißheim
Natrium-Heparin (25000 IE/5ml)	B. Braun, Melsungen
NaN ₃ (Natriumazid)	Serva, Heidelberg
Penicillin/Streptomycin (P/S) (100-fach, 10000U)	PAA, Cölbe
Paraformaldehyd (PFA) (10000 μ g/ml)	Sigma-Aldrich, Steinheim
PBS Dulbecco Instamed 9,55g/l, w/o Ca ²⁺ , Mg ²⁺	Biochrom AG, Berlin
Rattennormalserum	eBioscience, San Diego, CA, USA
VLE RPMI 1640 Medium (1x)	Biochrom AG, Berlin
Saponin	Sigma-Aldrich, Steinheim

3.1.3 Immunsuppressiva

Tabelle 4 Getestete Immunsuppressiva

Immunsuppressivum	Endkonzentration	Hersteller
Cyclosporin A	350ng/ml	Novartis, Nürnberg
FK506 (Tacrolimus)	20ng/ml	Astellas, München
Methylprednisolon	1 μ g/ml	Sigma-Aldrich, Steinheim
Lösungsmittel (100% Ethanol)	0,2%	SAV, Flintsbach a. Inn

3.1.4 Dynabeads

Tabelle 5 Beads für die Depletionsexperimente

Name	Hersteller*
Dynabeads α -CD25	Invitrogen Dynal AS, Oslo, Norwegen
Dynabeads α -mouse CD4 (L3T4)	Invitrogen Dynal AS, Oslo, Norwegen

*aktuell erhältlich bei Life Technologies, Darmstadt

3.1.5 Antikörper

Tabelle 6 Fluorochrom-gekoppelte monoklonale Antikörper für durchflusszytometrische Färbungen

Name	Herkunftspezies, Klon	Volumen*	Hersteller
α -CD3 PerCP	Maus, SK7	4 μ l	BD, Heidelberg
α -CD4 APC	Maus , SK3	0,5 μ l	BD, Heidelberg
α -CD4 APC-H7	Maus, SK3	0,5 μ l	BD, Heidelberg
α -CD4 PerCP	Maus, SK3	4 μ l	BD, Heidelberg
α -CD8 FITC	Maus, SK1	4 μ l	BD, Heidelberg
α -CD8 V500	Maus, RPA-T8	1 μ l	BD, Heidelberg
α -CD25 PE	Maus, M-A251	6 μ l	BD, Heidelberg
α -CD25 V450	Maus, M-A251	1,25 μ l	BD, Heidelberg
α -CD28 PerCP-Cy5.5	Maus, L293	5 μ l	BD, Heidelberg
α -CD39 APC	Maus, TU66	10 μ l	BD, Heidelberg
α -CD45RO PE-Cy7	Maus, UCHL1	1,25 μ l	BD, Heidelberg
α -CD62L PE	Maus, DREG-56	8 μ l	BD, Heidelberg
α -CD69 PerCP	Maus, L78	2 μ l	BD, Heidelberg
α -CD127 AlexaFluor 647	Maus, HIL-7R-M21	7,5 μ l	BD, Heidelberg

Name	Herkunftspezies, Klon	Volumen*	Hersteller
α -CD127 FITC	Maus, eBioRDR5	7,5 μ l	eBioscience, San Diego, CA, USA
α -Foxp3 APC	Ratte, PCH101	5 μ l	eBioscience, San Diego, CA, USA
α -IFN γ FITC	Maus, 4S.B3	0,5 μ l	BD, Heidelberg
α -IL2 PE	Ratte, MQ1-17H12	2 μ l	BD, Heidelberg

*bezogen auf 10⁶ Zellen bzw. 150 μ l Vollblut

3.1.6 Antigene und Costimulantien

Tabelle 7 Zur T-Zellstimulation eingesetzte Antigene und Costimulantien

Name	Endkonzentration	Hersteller
α -CD28 (Klon L293)	1 μ g/ml	BD, Heidelberg
α -CD49d (Klon 9F10)	1 μ g/ml	BD, Heidelberg
CMV-Zelllysate	32 μ l/ml	Virion, Würzburg
HBc-virus-like particles	5 μ g/ml	Ralf Wagner, Universität Regensburg
HBs-virus-like particles	5 μ g/ml	Ralf Wagner, Universität Regensburg
Kontroll-Zelllysate	32 μ l/ml	Virion, Würzburg
Kontroll-virus-like particles	5 μ g/ml	Ralf Wagner, Universität Regensburg
Staphylococcus aureus Enterotoxin B (SEB)	2,5 μ g/ml	Sigma-Aldrich, Steinheim

3.1.7 Lösungen

Tabelle 8 Benötigte Lösungen

Name	Zusammensetzung	Anwendung
EDTA 10%	10g EDTA auf 100ml mit Aqua dest auffüllen	PBS-0,02% EDTA
EDTA 500mM (pH 8)	MW = 372,2g/mol (18,612g/100ml Aqua dest)	EDTA 20mM
EDTA 20mM	2ml 500mM EDTA 48ml Aqua dest	Fixierung
FACS-Puffer	500ml PBS (1fach) 25ml FCS für FACS-Puffer 2,5g BSA 305ml 10% NaN ₃	Waschpuffer, Färbepuffer, Saponinpuffer
Fixperm	1 Teil Fixperm-Konzentrat 3 Teile Diluent	Permeabilisierung, Fixierung
Lysing-Solution (1fach)	450ml Aqua dest. 50ml 10fach Lysing-Solution	Fixierung
Medium	50ml VLE RPMI 1,25ml HSA (20%) 0,5ml Penicillin/Streptomycin (200mM) 0,5ml L-Glutamin (10000U/ml)	Proliferationsassay, Zytokinstimulatin
Natriumazid (10%)	10g NaN ₃ auf 100ml mit PBS (1fach) auffüllen	FACS-Puffer, Saponin 5%
PBS (1fach)	50ml PBS (10fach) 450ml Aqua bidest.	FACS-Puffer, BrdU, PFA 1% und 4%, 5% Saponin
PBS (10fach)	10fach Pulver in	PBS (1fach), PBS-0,02%

Name	Zusammensetzung	Anwendung
	1l Aqua bidest. lösen	EDTA
PBS-0,02% EDTA	50ml PBS 10fach 450ml Aqua bidest 1ml 10% EDTA	Waschen von Vollblut
PBS-0,1% HSA	49,75ml PBS (1fach) 0,25ml HSA (20%)	Depletion
PFA 4% (pH 7,4-7,6)	8g Paraformaldehyd zu 200ml PBS (1fach) geben, bei 56°C im Wasserbad lösen	PFA 1%
PFA 1%	25ml 4% PFA 75ml PBS (1fach)	Probenaufnahme zur FACS-Messung
Permeabilization Buffer	1 Teil Konzentrat mit 9 Teilen Aqua dest. verdünnen	eBioscience
RPMI-0,5% HSA	48,75ml (VLE) RPMI 1,25ml 20%iges humanes Serumalbumin (HSA)	Waschen von Vollblut
5% Saponin	2g Saponin 0,28ml 10% NaN ₃ 39,7ml steriles PBS (1fach)	Permeabilisierung bei intrazellulären Färbungen
Saponin-Puffer	200ml FACS-Puffer 4ml 5% Saponin	Permeabilisierung bei intrazellulären Färbungen

3.2 Probandenkollektiv

Im ersten Teil der Arbeit wurden die beiden Empfänger der Nieren einer chronisch HBV-infizierten Spenderin untersucht. Die Charakteristika von Spenderin und Patienten sind in Tabelle 9 aufgeführt.

Tabelle 9 Charakterisierung der Organspenderin und den beiden Empfängern der Nierentransplantate

	Spenderin	Patient #1	Patientin #2
Alter [Jahre]	42	53	58
Geschlecht	weiblich	männlich	weiblich
Zeit mit Hämodialyse [Monate]	entfällt	14	27
Wartezeit [Monate]	entfällt.	12	25
Blutgruppe	A pos	A pos	A pos
HBV-Status			
HBs-Antigen	pos	neg	neg
anti-HBs-Antikörper	neg	pos (336 IU/l)	pos (>1000 IU/l)
anti-HBc Antikörper	pos	pos (11,6 s/co)	pos (10,5 s/co)
HBV-DNA	pos	neg	neg
CMV-Status	pos	pos	pos
Renale Grunderkrankung	entfällt	Fokal segmentale Glomerulosklerose	Chronische Glomerulonephritis

neg = negativ, pos = positiv

Die Charakteristika der gesunden Kontrollpersonen, Hämodialysepatienten und nierentransplantierten Patienten, die zur Frequenzbestimmung und phänotypischen Charakterisierung regulatorischer T Zellen aus dem Vollblut herangezogen wurden, sind in Tabelle 10 dargestellt. Alle Patienten wurden in unserem Zentrum betreut. Die chronische Dialysebehandlung war als Nierenersatzverfahren bei terminaler Niereninsuffizienz bereits über mindestens 3 Monate durchgeführt worden. Die Untersuchungen der nierentransplantierten Patienten fanden mindestens 3 Monate nach Nierentransplantation bei stabilem Verlauf und Einnahme einer Erhaltungssimmunsuppression statt.

Tabelle 10 Charakteristika der gesunden Kontrollpersonen, Dialyse- und nierentransplantierten Patienten

Versuch	Treg-Marker			Treg-Phänotypisierung		
	Kontrollen	HD	NTx	Kontrollen	HD	NTx
Kohorte	Kontrollen	HD	NTx	Kontrollen	HD	NTx
Probandenanzahl	n=15	n=15	n=15	n=10	n=16	n=18
Alter [Jahre]	36±14,3	64,5±13,3	62,0±9,9	47,3±10,2	59,4±11,8	60,4±12,6
Geschlecht (m/w)	4/11	8/7	9/6	5/5	11/5	13/5
Zeit mit Hämodialyse [Monate]	entfällt	72,9±26,9	51,7±35,2	entfällt	49,7±39,7	60,6±34,1
Zeit nach Transplantation [Monate]	entfällt	entfällt	93,6±74,6	entfällt	entfällt	38,9±52,9
Lebenspende	entfällt	entfällt	3/15	entfällt	entfällt	2/18
Immunsuppression:	entfällt	entfällt		entfällt	entfällt	
CNI-basiert			11/15			16/18
CNI+Rapa			0/15			1/18
Aza/MP			0/15			1/18
MMF/MP			4/15			0/18

CNI: Calcineurininhibitor, Rapa: Rapamycin, Aza: Azathioprin, MP: Methylprednisolon, MMF: Mycophenolat-Mofetil

Die funktionelle Charakterisierung der Treg von Hämodialysepatienten fand bei insgesamt 8 Patienten (3 Männer, 5 Frauen) mit einem mittleren Alter von 63,6±12,1 Jahren und einer mittleren Dialysepflichtigkeit von 86,5±36,2 Monaten statt. Die Charakteristika und Testergebnisse der in diesem Zusammenhang von Daniela Presser untersuchten Kontrollpersonen und nierentransplantierten Patienten sind bereits publiziert (PRESSER et al., 2009).

Zur Untersuchung der Beeinflussbarkeit des Effekts von regulatorischen T Zellen auf Effektor T Zellen durch Immunsuppressiva sind Blutproben von 9 gesunden Spendern verwendet worden. Die 4 Frauen und 5 Männer waren im Mittel $31,4 \pm 8,6$ Jahre alt.

Gemeinsam ist allen Teilnehmern, dass kein Proband bzw. Patient zum Untersuchungszeitpunkt an einer Infektion oder einem bekannten Malignom litt. Immunsuppressiva wurden nur von den nierentransplantierten Patienten im Rahmen ihrer Standard-Abstoßungsprophylaxe eingenommen. Die Teilnehmer wurden über die Untersuchungen aufgeklärt und erteilten ihr Einverständnis.

3.2.1 Probenmaterial

Die PCR-Untersuchungen sowie die Oberflächenfärbungen und Foxp3-Färbungen zur Charakterisierung von regulatorischen T Zellen wurden mit EDTA-Blut durchgeführt. Die Quantifizierung von HBc-, HBs- und CMV-spezifischen T Zellen erfolgte aus Lithium-Heparin-Vollblut. Für die Depletionsexperimente mit nachfolgender Stimulation erfolgte die Antikoagulation anfänglich mit Lithium-Heparin, sowie später zum Vergleich mit EDTA und Natrium-Heparin (20 IE/ml). Bei Verwendung von Lithium-Heparin oder EDTA, wurden handelsübliche Monovetten eingesetzt.

3.2.2 Arbeitsbedingungen

Die Stimulation des Vollblutes zur Quantifizierung von HBV-spezifischen und CMV-spezifischen T Zellen und alle folgenden Arbeitsschritte wurden unter nicht-sterilen Bedingungen durchgeführt.

Alle Versuchsabschnitte zur Untersuchung des Treg-Effektes wurden, sofern es in Anbetracht der langen noch folgenden Inkubationsdauer (in der Regel 18h) erforderlich war, unter sterilen Bedingungen durchgeführt. Dies umfasste neben dem Waschen des antikoagulierten Vollblutes, die Depletion der Treg, die Stimulation und die Zugabe von Medium.

Die Inkubation im Brutschrank erfolgte bei 37°C sowie 6% CO_2 . Im Rahmen des Versuchsablaufs wurden die Proben, nach den es erfordernden Arbeitsschritten, mit Hilfe eines Vortexgerätes gemischt. Die Zentrifugationsgeschwindigkeiten werden als Vielfache der Erdbeschleunigung g [m/s^2] angegeben.

3.3 Labordiagnostik

3.3.1 Virologische Parameter

Die Bestimmung von HBs-Antigen, anti-HBc [sample/cut-off, s/co], anti-HBs [IU/L], anti-HCV und anti-CMV Antikörpern erfolgte mittels kommerziell erhältlichen Standard-Immunoassays (Architect, Abbott, Wiesbaden). Die HBV-DNA wurde durch real time Polymerase-Kettenreaktion (PCR) quantifiziert (Cobas Ampliprep/Cobas TaqMan HBV, Roche Diagnostics, Mannheim). Die CMV-Last wurde regelmäßig mittels quantitativer PCR kontrolliert (Cobas Amplicor, Roche Diagnostics, Mannheim).

3.3.2 Routinemäßig kontrollierte Laborparameter nach Nierentransplantation

Differentialblutbilder, Serumkreatinin, die Leberenzyme Aspartat- und Alaninaminotransferase (AST bzw. ALT) sowie die Immunsuppressiva-Talspiegel (Tacrolimus) wurden regelmäßig im Verlauf nach der Nierentransplantation kontrolliert. Die Messungen wurden im Zentrallabor des Universitätsklinikums des Saarlandes im Rahmen der Routinediagnostik durchgeführt.

3.4 Depletion von Treg über Magnete

Die Depletion von Treg erfolgte über CD25-gekoppelte Dynabeads (Invitrogen, Oslo, Norwegen) mit nachfolgender Trennung über Magnete. Im Folgenden wird das Ausgangsprotokoll in seinen einzelnen Schritten beschrieben. Dieses Protokoll wurde im Rahmen der vorliegenden Arbeit auf die Anwendung im Vollblut zur Untersuchung der Immunsuppressivawirkung optimiert.

3.4.1 Waschen des Lithium-heparinisierten Vollblutes

Um lösliches CD25 zu entfernen, an das die Dynabeads binden könnten und das folglich die Depletionseffizienz vermindern könnte, wurden die Vollblutproben gewaschen. Zusätzlich wurde das Vollblut 1:1 mit Medium (RPMI-0,5%HSA) verdünnt, damit die Viskosität des Blutes bei der Depletion erniedrigt wird und so die Durchmischbarkeit mit den Beads verbessert wird.

Zunächst wurden zum Waschen 2ml des antikoagulierten Blutes pro 15ml Falcon vorgelegt. Danach wurden insgesamt drei gleiche Waschschritte durchgeführt, indem mit RPMI (ohne Zusätze) auf 15ml aufgefüllt und gemischt wurde, 10min bei 350g und 4°C zentrifugiert wurde und danach der Überstand über den Erythrozyten/Leukozyten abgesaugt wurde. Dabei war zu beachten, dass man nicht zu nah an die Zellen kam, damit diese nicht mitabgesaugt

wurden. Nach dem dritten Waschschrift wurde ad 4ml mit RPMI-0,5%HSA aufgefüllt und gemischt. Auf diese Weise lag eine 1:1 Mischung aus Vollblut und RPMI-0,5% HSA vor.

3.4.2 Depletion CD25⁺ T Zellen

Tabelle 11 stellt das Herstellerprotokoll zur Zeldepletion aus mononukleären Zellen des peripheren Blutes (PBMC) und das im Labor etablierte Ausgangsprotokoll für Vollblutproben vergleichend gegenüber.

Tabelle 11 Vergleich von Hersteller- und Ausgangsprotokoll zur Depletion CD25⁺ T Zellen

	Herstellerprotokoll	Ausgangsprotokoll
Ausgangsmaterial	Mindestens 30ml Vollblut für empfohlene $2,5 \times 10^7$ PBMC	2ml LiHep Vollblut /2 Proben
Vorbereitung	PBMC-Isolierung mittels Dichtegradientenzentrifugation	3 mal mit RPMI 1x waschen
Waschen der Beads	Mindestens 1ml Isolationspuffer (PBS-0,1% HSA 2mM EDTA)	1ml PBS-0,1% HSA
Depletion	50µl α-CD25 Beads für $2,5 \times 10^7$ PBMC 30 min Inkubation	30µl α-CD25 Beads in 1,2ml einer 1:1 Mischung aus Vollblut und RPMI 0,5% HSA 45 min Inkubation

Im Folgenden wurde pro Waschansatz an einer Probe die Depletion der CD25⁺ T Zellen durchgeführt und eine zweite Probe zur Kontrolle ohne Depletion mitgeführt (mock-Behandlung). Alle Arbeitsschritte wurden bei beiden Proben gleich durchgeführt. Lediglich das Anbringen der Magnete entfiel bei den mock-Proben.

Da die Dynabeads Eisen enthalten, kann dieses auch in das Lösungsmittel übertreten und zu unerwünschter unspezifischer Zellaktivierung führen. Um gelöstes Eisen zu entfernen wurden die Beads unmittelbar vor Gebrauch gewaschen. Dazu wurde das benötigte Beadvolumen mit 1ml PBS-0,1%HSA versetzt und gemischt. Danach wurde ein Magnet an das Reaktionsgefäß angebracht. Nachdem sich die Beads sich über dem Magneten abgesetzt hatten und der Überstand klar war, wurde dieser mit einer Pipette entfernt. Anschließend wurden die Beads

in PBS-0,1% HSA aufgenommen. Dabei entsprach das Lösungsmittelvolumen dem ursprünglich eingesetzten Beadvolumen.

Zur Depletion von Treg wurden je 1200µl pro Waschansatz (4ml Gesamtvolumen) für eine Depletions- und eine mock-Probe entnommen und in neue Röhrchen überführt. Zur Depletion CD25⁺ T Zellen (Treg) wurden 30µl gewaschene CD25 Dynabeads [4x10⁸/ml] in jedes Depletionsröhrchen pipettiert. Zu den mock-Proben wurden 30µl PBS-0,1% HSA (Waschpuffer für die Dynabeads) als Kontrolle hinzugefügt. Es war zu beachten, dass das Gefäß vor Entnahme der Beads gründlich gevortext wurde, da sich die Beads sehr schnell absetzen. Danach wurden die Proben zur Bindung der Beads an die Zielzellen (Treg) 45min bei 4°C auf einem MACS-Roller unter ständigem Mischen inkubiert. Im Anschluss wurde an das untere Ende jedes Depletions-Röhrchens ein Magnet mittels Klebestreifen befestigt und alle Röhrchen wurden 10min bei 4°C in 45° Schräglage ruhend inkubiert. In dieser Zeit setzen sich die Beads aufgrund ihres Eisengehaltes über dem Magneten ab. Die um die Treg depletierten Zellsuspensionen im Überstand bzw- mock-Proben wurden an der gegenüberliegenden Probengefäßwand mit einer Pipette abgenommen und in neue Röhrchen überführt. Die Magnetbehandlung mit dazugehöriger Inkubation wurde einmal wiederholt und die Zellsuspensionen erneut in frische Röhrchen überführt.

3.5 Stimulation der Zytokinproduktion von T Zellen

Um T-zelluläre Immunantworten genauer zu charakterisieren, kann als Messparameter die Zytokinproduktion der T Zellen als Reaktion auf eine Antigenstimulation herangezogen werden. Je nach verwendetem Antigen können dabei erregerspezifische Immunantworten oder polyklonale Reaktionen auf Superantigenstimulation untersucht werden. Als Ausgangsmaterial können frisches Vollblut, vorbehandelte (z.B Treg-depletierte) Proben aber auch Zellisolate verwendet werden.

3.5.1 Stimulation der Zytokinproduktion antigenspezifischer T Zellen im Vollblut

Es wurden sowohl HBV-, als auch CMV-spezifische T Zellen stimuliert. Heparinisiertes Vollblut wurde dazu mit 5µg/ml HBs-virus-like-particles (VLP), 5µg/ml HBc-VLPs oder 32µl/ml CMV-Lysat in Anwesenheit von 1µg/ml α-CD28 und 1µg/ml α-CD49d 6 Stunden aufrecht mit angeschraubten Deckeln bei 37°C und 6% CO₂ inkubiert. Als Negativkontrollen wurde Proben mitgeführt, denen statt der oben genannten Antigene im Fall von CMV ein Kontrolllysat nicht infizierter Zellen und für HBV VLPs ohne Hepatitis-Antigene (freundlicherweise bereitgestellt von Ralf Wagner, Universität Regensburg) zugesetzt waren. Als Stimulanz der Positivkontrolle diente in beiden Fällen 2,5µg/ml des Superantigens SEB,

das antigenunspezifisch, durch Bindung an die V β -Region des T-Zellrezeptors und Quervernetzung mit MHC II Molekülen antigenpräsentierender Zellen zur T-Zellaktivierung führt. Nach 2 Stunden Inkubation wurden 10 μ g/ml Brefeldin A (BFA) hinzupipettiert, um die Sekretion der gebildeten Zytokine zu hemmen.

3.5.2 Stimulation der T-zellulären Zytokinproduktion nach Depletion regulatorischer T Zellen

Die Stimulation der T Zellen zur Zytokinproduktion erfolgte mit SEB unmittelbar im Anschluss an die Depletion und wurde über einen Zeitraum von 18h durchgeführt.

Für die Stimulation wurden je 600 μ l der depletierten und nicht-depletierten (mock) Zellsuspensionen in neue 15ml Röhrchen überführt. Anschließend wurde in RPMI-10% FCS stimuliert. Dazu wurden 60 μ l FCS in die Zellsuspensionen pipettiert. Zusätzlich wurden noch 6 μ l L-Glutamin und 6 μ l Penicillin/Streptomycin (je 100x) hinzupipettiert. Die zugefügten Substanzen dienten als Substrate (FCS, L-Glutamin) oder waren antibiotisch wirksam (Penicillin/Streptomycin). SEB wurde als Antigen in einer Endkonzentration von 2,5 μ g/ml zugesetzt. Danach wurde insgesamt 18h aufrecht im Brutschrank mit lose angeschraubten Deckeln bei 37°C und 6% CO₂ inkubiert. 4h vor Ende der Inkubation wurden 10 μ g/ml Brefeldin A hinzupipettiert.

Zur Untersuchung des Einflusses von Immunsuppressiva (Cyclosporin A, Tacrolimus und Prednisolon) auf die Wirkung von Treg wurden die Immunsuppressiva zusammen mit dem stimulierenden Antigen zugegeben. Kontrollansätzen wurde statt der Immunsuppressiva deren Lösungsmittel (100% Ethanol) zugesetzt.

3.5.2.1 Hitzeinaktivierung von FCS

Fötales Kälberserum (FCS), welches aus dem Blut von Rinderfeten gewonnen wird, dient in der Zellkultur als Quelle für Bindungsproteine, anorganische Salze, Spurenelemente, Puffer (Albumin)- und Neutralisationsysteme (Immunglobuline). Darüber hinaus liefert es Hormone und diverse Aminosäuren. Um Zellverklumpungen und spätere Lyse durch das FCS-eigene Komplementsystem zu verhindern, wird dieses mittels Hitze inaktiviert. Dafür wird das Serum 30min bei 56°C im Wasserbad erwärmt. Bei Verwendung im FACS Puffer, der bei FACS-Färbungen zur Blockierung unspezifischer Bindungen genutzt wird, wird das FCS zusätzlich über einen Leukozytenfilter filtriert, wodurch Proteinpräzipitate entfernt werden, die sonst unnötige Artefakte bei der durchflusszytometrischen Messung verursachen würden.

3.5.3 Fixierung

Damit bei der später folgendem Saponinbehandlung zur Färbung intrazellulär gelegener Zielmoleküle die gebildeten Zyokine nicht aus den Zellen diffundieren und auch keine weiteren produziert werden, wurde nach Ende der Stimulationsperiode eine Fixierung der Lymphozyten durchgeführt. Für die unterschiedlichen Stimulationsvarianten (s. 3.5) wurde die Fixierung nach gleichem Protokoll vorgenommen.

Durch die Zugabe von EDTA in einer Endkonzentration von 2mM wurden zunächst bestehende Zellaggregate und an der Probengefäßwand haftende Zellen gelöst. Um dies sicher zu erreichen, wurden die Proben mindestens 10 Sekunden mittels Vortexgerät gemischt und 15 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Erythrozyten wurden durch Mischen mit 1facher Lysingsolution (9ml/ml Vollblut) lysiert und die Lymphozyten wurden gleichzeitig fixiert. Nach 10-minütiger Inkubation bei Raumtemperatur wurde 10min bei 350g zentrifugiert. Der Überstand über dem Zellpellet wurde abgesaugt und das Pellet gelockert. Um Reste der Lysingsolution zu entfernen, wurde mit 2ml FACS-Puffer gewaschen, erneut 10min bei 350g zentrifugiert, der Überstand abgesaugt und das Zellpellet gelockert. Die Zellen wurden in 400µl FACS-Puffer aufgenommen und im Anschluss sofort gefärbt oder im Kühlschrank bei 4°C bis zur Färbung gelagert (s.3.6.2).

3.6 Durchflusszytometrische Färbungen und Messung

Zur Untersuchung immunologischer Fragestellungen ist die Durchflusszytometrie als Messmethode besonders gut geeignet. Verschiedene Lymphozytensubpopulationen können erfasst, quantifiziert und hinsichtlich ihrer Funktion charakterisiert werden. Dazu bedient man sich fluorochromgekoppelter, monoklonaler Antikörper, die gegen Oberflächenproteine oder intrazelluläre Strukturen der Zielzellen gerichtet sind. Oft werden die Durchflusszytometer allgemein als FACS Geräte (fluorescence-activated cell sorter) bezeichnet, obwohl die gemessenen Zellen bei rein analytischen Geräten nicht sortiert werden können. Während des Messvorgangs werden die Zellen durch eine Kapillare angesaugt und in einer Salzlösung (FACSflow) einzeln an Lasern vorbeigeführt (hydrodynamische Fokussierung). Dabei wird zum einen Licht an den Zellen gestreut und zum anderen emittieren die durch das Laserlicht angeregten, an die Antikörper gebundenen Fluorochrome ebenfalls Licht. Diese Signale werden von Photomultipliern erfasst, verstärkt, elektronisch verarbeitet und mittels Computer ausgewertet. Abhängig von der Zellgröße wird das Licht des Lasers in einem Winkel von bis zu 20° entlang der Laserachse gebeugt (forward scatter). Streulicht zur Seite (side scatter) repräsentiert hingegen die Zellkomplexität, die unter anderem durch die Zellgranularität und

Eigenschaften des Zellkerns bestimmt wird. Mit Hilfe dieser beiden Messwerte, die sich auch in ungefärbten Proben erfassen lassen, können schon verschiedene Leukozytensubpopulationen, wie Lymphozyten, Granulozyten und Monozyten, unterschieden werden (Abbildung 2A). Durch gezieltes Auswählen und Darstellen (Gaten) der Lymphozyten kann man in den folgenden Schritten diese Population isoliert betrachten und anhand der gefärbten Moleküle (z.B. CD3, CD4, CD8 und CD25) weiter differenzieren und charakterisieren (Abbildung 2B-E). Als Ausgangsmaterial für die Färbungen und FACS-Messungen können unbehandeltes frisches Vollblut oder vorbehandelte Proben nach Treg-Depletion oder Antigenstimulation eingesetzt werden.

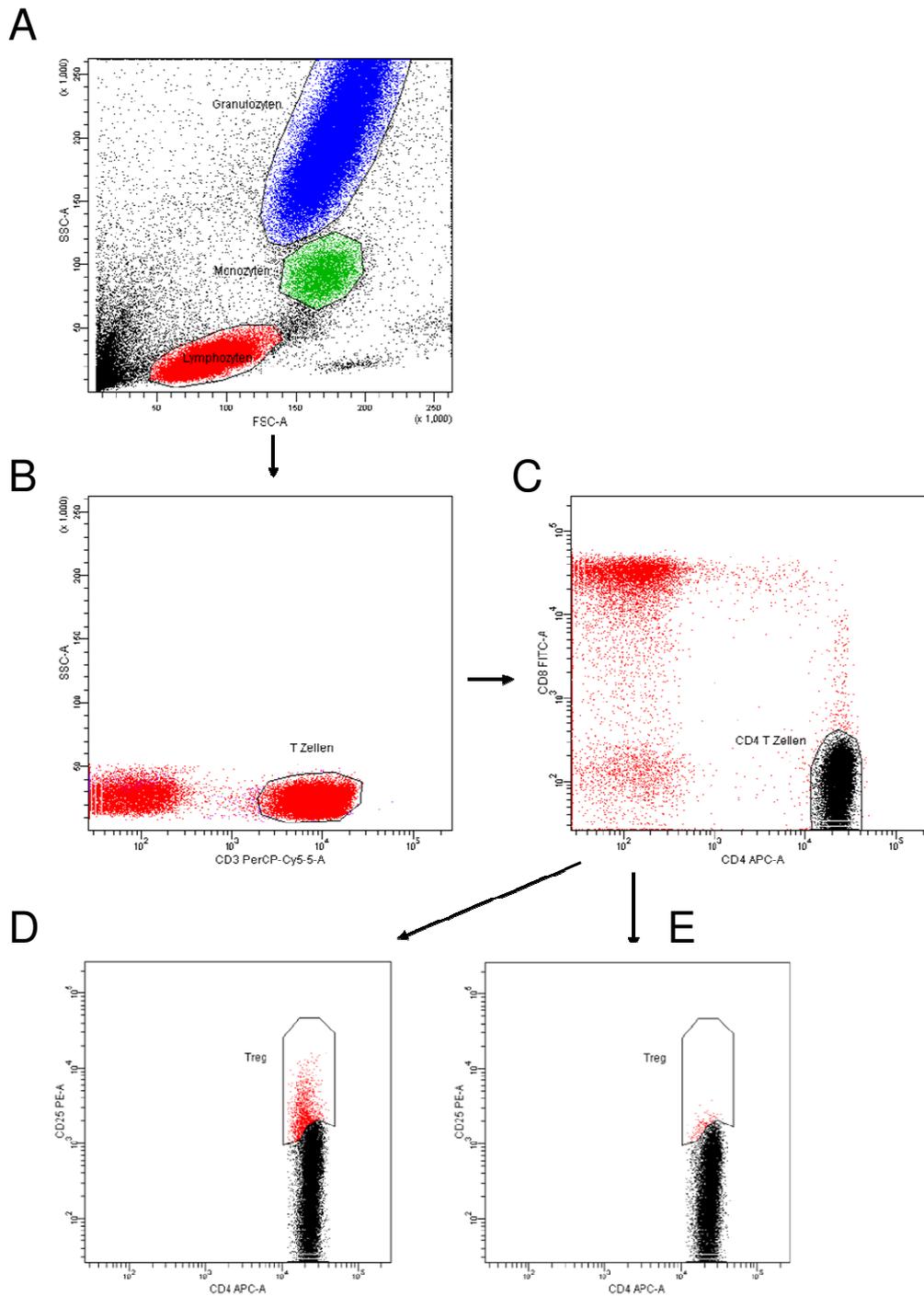


Abbildung 2 Auswertstrategie durchflusszytometrischer Messungen am Beispiel der Identifizierung regulatorischer T Zellen

A Identifizierung der Lymphozytenpopulation anhand von Forward und Side Scatter (FSC bzw. SSC) in frischem Vollblut. In einem FSC/SSC-Plot können die Lymphozyten, Monozyten und Granulozyten als relativ homogene Populationen gegeneinander abgegrenzt werden. (Nach Permeabilisierung der Zellen kann dies erschwert sein, sodass in solchen Fällen zusätzliche Backgating-Strategien zur Anwendung kommen können; hier nicht gezeigt). **B** Die T Zellen können durch separate Darstellung der Lymphozytenpopulation in einem CD3/SSC-Plot anhand ihrer CD3-Positivität identifiziert werden. **C** Darstellung der T Zellen in einem CD4/CD8-Plot zur Identifizierung der CD4-positiven T Zellen (CD4 T Zellen). **D** Darstellung der CD4 T Zellen in einem CD4/CD25-Plot, so können durch Analyse der CD25-Expression die regulatorischen T Zellen (Treg) identifiziert werden. **E** Darstellung der entsprechenden Probe nach Depletion der Treg.

3.6.1 FACS Färbungen zur Quantifizierung und Charakterisierung von Treg

Methodisch am einfachsten durchzuführen sind Färbungen von Antigenen auf Zelloberflächen. Hierfür kann frisches Vollblut unmittelbar, ohne Vorbehandlung verwendet werden. Eine solche Färbung wurde zur phänotypischen Charakterisierung der Treg eingesetzt. Neben Markern zur Identifizierung von Treg (CD4, CD25 und CD127) wurden Oberflächenantigene wie der Homingmarker CD62L, das costimulatorische Molekül CD28, der Reifungsmarker CD45RO sowie CD39, das ebenfalls als Marker für hochsuppressive Treg identifiziert wurde, untersucht. CD8 wurde zudem zum verbesserten CD4 Lymphozytengating mitgefärbt.

Zur Färbung wurden 100µl EDTA-Vollblut in FACS-Röhrchen vorgelegt und die entsprechende Antikörpermischung hinzupipettiert (Tabelle 12):

Tabelle 12 Antikörpermischung zur phänotypischen Charakterisierung von Treg im Vollblut

Bestandteil	Volumen/Ansatz
α-CD39 APC	10µl
α-CD4 APC-H7	0,5µl
α-CD127 FITC	1,25µl
α-CD62L PE	8µl
α-CD45RO PE-Cy7	1,25µl
α-CD28 PerCP-Cy5.5	5µl
α-CD25 V450	1,25µl
α-CD8 V500	1µl

Die Proben wurden 30 min bei Raumtemperatur im Dunkeln inkubiert. Anschließend wurde 1ml Lysing-Solution zugegeben und 10min bei Raumtemperatur, dunkel inkubiert und 10min bei Raumtemperatur und 350g zentrifugiert. Der Überstand wurde abgesaugt und das Zellpellet anschließend mit 3ml FACS-Puffer gewaschen. Dazu wurde nach Zugabe des FACS-Puffers 10min bei 350g zentrifugiert, der Überstand der Probe abgesaugt und das Zellpellet in 150µl 1% PFA zur Messung aufgenommen.

Zur Überprüfung der Depletionseffizienz wurde im Anschluss an die Depletion ebenfalls eine direkte Oberflächenfärbung der Zellen aus den depletierten und nicht-depletierten (mock)

Ansätzen durchgeführt. In der Regel wurde zusätzlich 100µl unbehandeltes Vollblut zum Vergleich mitgefärbt.

Zur Färbung wurden pro Probe 100µl Zellsuspension entnommen und in FACS-Röhrchen überführt. Die Antikörpermischung (Tabelle 13) wurde in einem Gesamtvolumen von 12,5µl/Probe direkt in die Zellsuspension pipettiert und anschließend wurde zur Antikörperbindung 30min im Dunkeln bei Raumtemperatur inkubiert. Durch Zugabe von 900µl Lysingsolution wurden vorhandene Erythrozyten lysiert. Die Proben wurden dazu 10 weitere Minuten im Dunkeln bei Raumtemperatur inkubiert. Zur Entfernung der Lösung und ungebundener Antikörper wurde anschließend 10min bei 350g zentrifugiert, der Überstand abgesaugt und mit 3ml FACS-Puffer gewaschen. Nach 10min Zentrifugieren bei 350g wurde der Überstand abgesaugt und das Zellpellet in 200µl 1%PFA aufgenommen und gemessen. Bis zur Messung wurden die Proben bei 4°C im Kühlschrank aufbewahrt.

Tabelle 13 Färbemischung der Depletionskontrolle

Bestandteil	Voumen/Ansatz
α-CD4 APC	0,5µl
α-CD3 PerCP	4µl
α-CD25 PE	4µl
α-CD8 FITC	4µl

Sofern in Proben jedoch intrazellulär gelegene Antigene gefärbt werden sollen, ist es erforderlich die Zellen zu permeabilisieren, damit die Fluorochrom-gekoppelten Antikörper auch ins Zellinnere gelangen können. Dies ist etwa notwendig um Foxp3, den Transkriptionsfaktor der Treg, detektieren zu können. Eingesetzt wurde eine solche Färbung um regulatorische T Zellen anhand der Marker CD4, CD25, CD127 und Foxp3 identifizieren und quantifizieren zu können.

Sämtliche Zentrifugationsschritte für diese Färbung erfolgten mit auf 4°C gekühlter Zentrifuge und dauerten 10 Minuten bei 350g.

Zur Färbung wurden 150µl EDTA-Vollblut in ein FACS-Röhrchen vorgelegt und folgende Antikörper (Tabelle 14) hinzupipettiert, um zunächst die Oberflächenantigene zu färben:

Tabelle 14 Antikörpermischung zur Färbung der Treg-Oberflächenmarker

Bestandteil	Volumen/Ansatz
α -CD4 PerCP	4 μ l
α -CD25 PE	6 μ l
α -CD127 FITC	7,5 μ l

Die Proben wurden 30 min bei Raumtemperatur im Dunkeln inkubiert. Durch die Zugabe von 1ml Lysing-Solution und 10minütiger Inkubation bei Raumtemperatur wurden die im Vollblut enthaltenen Erythrozyten lysiert. Die Lösung und ungebundene Antikörper wurden entfernt, indem zentrifugiert und der Überstand abgesaugt wurde. Anschließend wurde mit 2ml FACS-Puffer gewaschen, erneut zentrifugiert sowie der Überstand abgesaugt. Das Zellpellet wurde durch Vortexen aufgelockert und mit 1ml Fixperm (frisch nach Herstellerangaben angesetzt) 30-40min bei 4°C permeabilisiert, damit der Foxp3-Antikörper später ins Zellinnere gelangen konnte. Nach Zugabe von 1ml PBS wurde erneut zentrifugiert und der Überstand abgesaugt. Der Waschvorgang wurde mit 2ml Permeabilisierungspuffer wiederholt. Das Zellpellet wurde zum Abblocken unspezifischer Bindungen mit 2 μ l Rattennormalserum und 100 μ l Permeabilisierungspuffer 15min bei 4°C inkubiert. Ohne weiteres Waschen wurden 5 μ l α -Foxp3 APC hinzupipettiert und 30min bei 4°C inkubiert. Danach wurden freie Antikörper durch Waschen mit 2ml Permeabilisierungspuffer, Zentrifugieren und Absaugen des Überstandes entfernt. Zur Messung wurden die Zellen in 200 μ l 1% PFA aufgenommen. Bis zur Messung wurden die Proben bei 4°C im Kühlschrank aufbewahrt.

3.6.2 FACS Färbung zur Quantifizierung antigenspezifischer T Zellen

Nach antigenspezifischer oder Superantigen-Stimulation der T-zellulären Zytolinproduktion und anschließender Fixierung wurde eine durchflusszytometrische Färbung zur Quantifizierung reaktiver Zellen durchgeführt. Auch hierfür war es erforderlich die Zellen zu permeabilisieren um die Zytokine den Färbeantikörpern zugänglich zu machen. Je nach Fragestellung können sich die zugegebenen Antikörpermischungen in ihrer Zusammensetzung unterscheiden, was den Ablauf einer solchen Färbung jedoch nicht beeinflusst. Prinzipiell werden Marker zur Identifizierung der Zielzellen eingesetzt (CD4) und mit den eigentlichen Messparametern zur Detektion der Zytokinproduktion wie dem

Zellaktivierungsmarker CD69 und den Zytokinen Interferon γ und Interleukin 2 kombiniert. Der Anteil reaktiver T Zellen wird dann als prozentualer Anteil an allen CD4 T Zellen angegeben.

Für eine einzelne Färbung wurde jeweils die Hälfte der fixierten Zellen in FACS-Röhrchen überführt (200 μ l). Die Permeabilisierung der Zellen wurde durch Zugabe von 2ml Saponin-Puffer und anschließender 10-minütiger Inkubation bei Raumtemperatur vorgenommen. Die Proben wurden dann 10min bei 350g zentrifugiert und der Überstand abgesaugt. Die ebenfalls Saponin-haltige Antikörperfärbemischung wurde in einem Gesamtvolumen von 50 μ l auf das Zellpellet gegeben und die Proben inkubierten 30-45min im Dunkeln bei Raumtemperatur. Ungebundene Antikörper wurden mit 3ml FACS-Puffer ausgewaschen. Dazu wurde nach Zugabe des Puffers 10min bei 350g zentrifugiert und der Überstand abgesaugt. Zur Messung wurden die Proben in 150 μ l 1% PFA aufgenommen.

Die Zusammensetzung der Färbemischungen zur Messung der Zytokinproduktion nach 18h Stimulation zur Untersuchung des Treg-Effektes oder Messung der CMV- bzw. HBc-spezifischen T Zellen nach 6stündiger Inkubation sind in Tabelle 15 zusammengefasst.

Tabelle 15 Zusammensetzung der Antikörperfärbemischung nach Antigenstimulation

Bestandteil	Volumen/ Ansatz
α -CD4 APC	0,5 μ l
α -CD69 PerCP	2 μ l
α -IL2 PE	2 μ l
α -IFN γ FITC	0,5 μ l
5% Saponin	1 μ l
FACS-Puffer	44 μ l
Gesamtvolumen	50 μ l

3.7 Computerprogramme und Statistik

Die Auswertung der mittels Durchflusszytometer generierten Daten erfolgte mit dem Computerprogramm FACS Diva (Version 6.2.). Damit ist es möglich Zellpopulationen von Interesse in Diagrammen darzustellen, zu markieren, auszuwählen und bezüglich weiterer erfasster Messparameter zu charakterisieren.

Zur Verwaltung dieser Auswertungsergebnisse wurde Microsoft Access 2003 genutzt. Microsoft Excel 2003 diente zur Datenaufbereitung, um diese einer statischen Auswertung und graphischen Darstellung mittels GraphPad Prism 5 zuzuführen. Bei normalverteilten Stichproben (D'Agostino & Pearson omnibus normality test) wurde der Mittelwert \pm Standardabweichung angegeben und bei der statistischen Analyse kam der t Test für nicht-gepaarte Stichproben zur Anwendung. Bei nicht normalverteilten Stichproben wurde der Median sowie der Interquartilsabstand zwischen den 25% und 75% Quartilen [IQR] angegeben und die statistische Analyse erfolgte mittels Mann-Whitney Test.

Für die Textverarbeitung wurde Microsoft Word 2003 in Verbindung mit dem Literaturverwaltungsprogramm EndNote X3 verwendet.

4 Ergebnisse

4.1 Präemptive Therapie bei Transplantation von Nieren einer Spenderin mit chronischer Hepatitis B

Im Rahmen eines Transplantatangebotes beider Nieren einer Spenderin mit chronischer Hepatitis B (HBs-Antigen positiv und anti-HBc-Antikörper positiv) für zwei Patienten unseres Transplantationszentrums, bei denen serologisch eine alte ausgeheilte HBV-Infektion mit protektiven anti-HBs-Titern von >100 IU/l nachgewiesen werden konnte, wurde ein präemptives Therapiekonzept durchgeführt, wie es bereits bei CMV erfolgreich angewendet wird. Auf eine Lamivudinprophylaxe wurde bewusst verzichtet. Neben einem Monitoring der Transplantat- und Leberfunktion erfolgten eine regelmäßige Kontrolle der HBV-spezifischen humoralen und zellulären Immunantwort, sowie Bestimmungen der HBV-Last. Nach ausführlicher Aufklärung über die Risiken einer HBV-Reinfektion und Therapiemöglichkeiten nach Transplantation hatten die Patienten der Nierentransplantation bei deutlich verkürzter Wartezeit zugestimmt.

4.1.1 Klinischer Verlauf und Nierenfunktion nach Transplantation

Der unmittelbare postoperative Verlauf gestaltete sich bei beiden Patienten komplikationslos, wengleich Patient #1 bei verzögertem Einsetzen der Transplantatfunktion bis zum 12. postoperativen Tag dialysepflichtig war. Danach fielen die Retentionsparameter stetig und erreichten ein minimales Kreatinin von 1,6 mg/dl, das bis zur letzten Kontrolluntersuchung stabil geblieben ist (1,8 mg/dl nach 39 Monaten). Im Rahmen einer steroidsensitiven Abstoßungsreaktion zeigte Patientin #2 einen Anstieg des Serumkreatinins bis auf 5,3 mg/dl zwei Wochen nach Transplantation. Histologisch konnte eine zelluläre Abstoßung entsprechend dem Banff-Stadium Ib gesichert werden. Das Serumkreatinin sank unter einer Steroidstoßtherapie auf 2,7 mg/dl, fiel danach kontinuierlich weiter und stabilisierte sich im folgenden Jahr bei 1,2 mg/dl. Der letzte Kreatininspiegel im Verlauf 38 Monate nach Transplantation betrug 0,8 mg/dl. Zuvor hatte sich die Patientin wegen eines Ovarialcarcinoms 11 Zyklen Chemotherapie unterzogen und erheblich an Muskelmasse verloren.

Der Verlauf der Leberenzyme wurde überwacht, um Leberaffektionen im Rahmen einer potentiell übertragenen HBV-Infektion und/oder Reaktivierung unter immunsuppressiver Therapie beurteilen zu können. Patient #1 zeigte leicht erhöhte AST-Werte in den ersten

Tagen nach Transplantation, die durch allgemein zu beobachtende Medikamentennebenwirkungen bei vorbestehender, Adipositas-bedingter Steatohepatitis zu erklären sind. Die AST fiel rasch nach Reduktion der initial höheren Steroidgabe und blieb im Langzeitverlauf stabil. Analog dazu fanden sich bei Patientin #2 auch grenzwertig erhöhte AST-Spiegel, die sich im ersten Jahr nach Transplantation ebenfalls normalisierten. Die ALT-Spiegel beider Patienten waren in der ersten Zeit nach der Transplantation ebenfalls nur leicht erhöht und sanken danach wieder.

14 Monate nach der Transplantation war bei Patientin #2 ein Spontanascites aufgefallen und im Verlauf ein fortgeschrittenes Ovarial-Carcinom diagnostiziert worden. Die ausgezeichnete Nierenfunktion erlaubte die erfolgreiche Gabe verschiedener palliativer Chemotherapien auf Basis von Topotecan, Carboplatin, Doxorubicin und Treosulfan, wodurch es möglich war den körperlichen Zustand der Patientin zu stabilisieren und in den folgenden 24 Monaten erheblich die Lebensqualität der Patienten zu verbessern bzw. zu erhalten. Letztlich starb die Patientin 41 Monate nach der Transplantation an ihrem Ovarial-Carcinom bei erhaltener Transplantatfunktion.

Abbildung 3 zeigt den Verlauf von Leber- und Nierenfunktion anhand der Bestimmung von AST, ALT bzw. Kreatinin für beide Patienten post transplantationem.

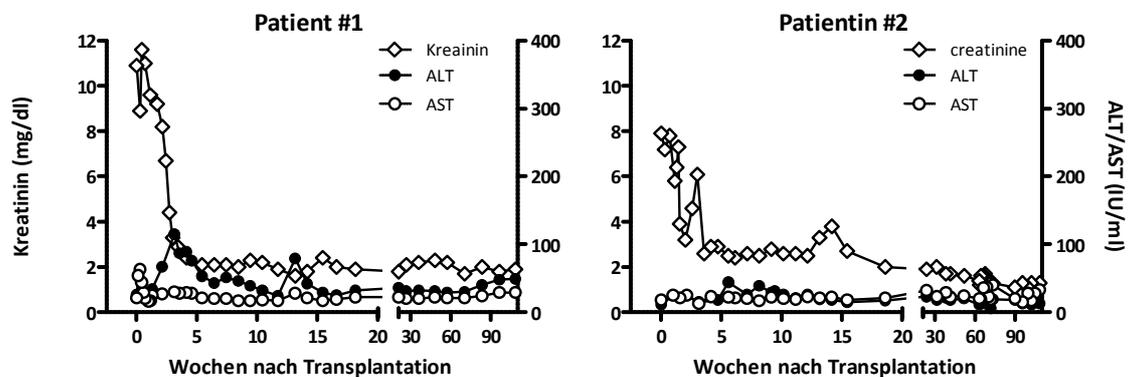


Abbildung 3 Nieren- und Leberfunktion nach Nierentransplantation

Die Nierenfunktion wurde anhand des Serumkreatinins und die Leberfunktion bzw. -schädigung anhand der Freisetzung der Lebertransaminasen (ALT und AST) abgeschätzt. Bei beiden Patienten kam es wie erwartet im initialen postoperativen Verlauf zum Anstieg des Serumkreatinins und der Leberenzyme. Patientin #2 litt zwei Wochen nach Transplantation unter einer Steroid-sensitiven Abstoßungsreaktion, die zu einem Anstieg des Serumkreatinins führte. Während der restlichen Nachbeobachtungszeit blieben die Lebertransaminasen in den jeweiligen Referenzbereichen und das Serumkreatinin unterlag den natürlichen Schwankungen im Verlauf nach Transplantation.

4.1.2 Immunologisches Monitoring

Um eine potenzielle Dynamik in der zellulären Immunität gegen HBV im Zusammenhang mit Anstiegen in der viralen Replikation beurteilen zu können, wurden zunächst als interne Kontrolle CMV-spezifische T Zellen in Relation zur CMV-Last quantifiziert. Da beide Patienten CMV-IgG positiv waren, waren CMV-spezifische CD4 T Zellen sowohl bei Patient #1 (11,5%) als auch bei Patientin #2 (2,1% aller CD4 T Zellen) bereits vor der Transplantation messbar (Abbildung 4 A). Im Blut von Patient #1 war zu keinem Zeitpunkt CMV-DNA nachweisbar und der Anteil CMV-spezifischer T Zellen war über den Beobachtungszeitraum von 31 Monaten mit mittleren Frequenzen von $7,7\% \pm 1,7\%$ stabil (Abbildung 4 B).

Im Gegensatz dazu kam es bei Patientin #2 am ehesten im Rahmen der Abstoßungsbehandlung mit Hochdosis Glucokorticoiden 6 Wochen nach der Transplantation zu einer CMV-Reaktivierung mit einer maximalen Viruslast von 2590 Kopien/ml. Im Zuge der gestörten immunologischen Infektkontrolle zeigten die Frequenzen CMV-spezifischer T Zellen schnelle und dynamische Veränderungen (Abfall von 3,4% auf 1,2%; Abbildung 4 B). Unter präemptiver Therapie mit Valganciclovir schwankte zunächst die Viruslast und sank letztlich unterhalb der Nachweisgrenze und die CMV-spezifischen CD4 T Zellen stiegen wieder auf die Ausgangswerte vor Transplantation an. Im gesamten Verlauf wurden keine weiteren viralen Komplikationen wie beispielsweise durch BK-Virus oder HSV1/2 beobachtet.

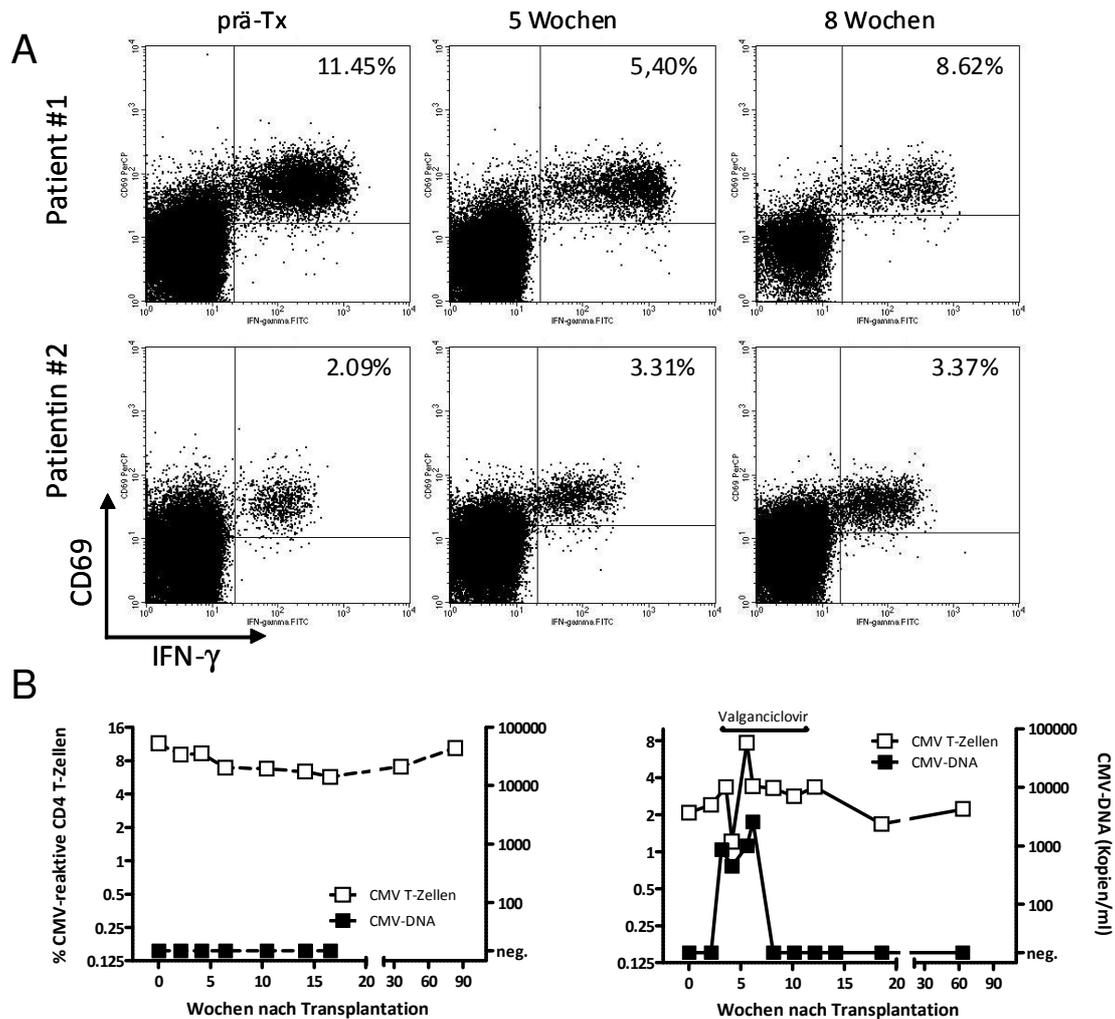


Abbildung 4 CMV-spezifisches Immunmonitoring als präemptives Therapiekonzept

A Repräsentative Dotplots zur durchflusszytometrischen Detektion CMV-spezifischer T Zellen zu den Zeitpunkten unmittelbar vor Nierentransplantation, sowie 5 und 8 Wochen danach. CMV-reaktive CD4 T Zellen wurden anhand der Coexpression von Interferon γ (IFN- γ) und CD69 identifiziert und als prozentualer Anteil aller CD4 T Zellen angegeben. **B** Ergebnisse der Bestimmungen von CMV-Last und CMV-spezifischen T Zellen für Patient #1 und Patientin #2 im Verlauf nach Transplantation. Solange CMV nicht replizierte waren die Frequenzen CMV-spezifischer T Zellen stabil, wohingegen im Zusammenhang mit der CMV-Virämie von Patientin #2 Frequenzschwankungen der spezifischen T Zellen dokumentiert werden konnten.

Im Folgenden wurde die HBV-spezifische Immunantwort untersucht und ihr Nutzen für präemptive Therapiestrategien evaluiert. Dabei waren sowohl die humorale, als auch die zelluläre spezifische Immunantwort von Interesse.

Beide Patienten hatten vor Transplantation schützend wirksame Titer HBV-spezifischer Antikörper (Patient #1: anti-HBs 336 IU/l, anti-HBc 11,6 s/co; Patientin #2 anti-HBs >1000 IU/l, anti-HBc 10,5 s/co), die im Verlauf über den schützenden Titer von 100 IU/l anti-HBs blieben. Die einzige Ausnahme bildete der anti-HBs Titer von Patient #1, der 31 Monate nach

Transplantation auf 92 IU/l abfiel (Daten nicht gezeigt). Dahingegen blieb der anti-HBc Titer mit 11,3 s/co stabil. Patientin #2 zeigte nach 16 Monaten nach wie vor anti-HBs Titer von >1000 IU/l und anti-HBc Titer von 9,7 s/co. Abbildung 5 zeigt den Verlauf der anti-HBs und anti HBc Titer für beide Patienten nach Transplantation.

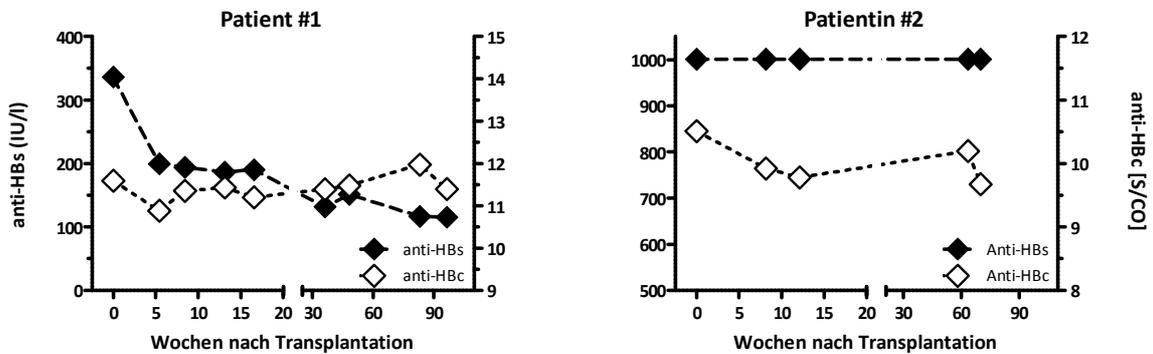


Abbildung 5 HBV-spezifische Antikörpertiter beider Organempfänger

Anti-HBs [IU/l] und anti-HBc [sample/cut-off] Antikörper waren in beiden Patienten jederzeit vorhanden, wobei die anti-HBs-Titer stets >100 IU/l betragen.

Analog zur humoralen Immunantwort besaßen beide Patienten bereits vor Transplantation nachweisbare Frequenzen HBc-spezifischer CD4 T Zellen (0,5% bei Patient #1 und 0,08% bei Patientin #2), die im Verlauf stabil blieben. Die mittleren gemessenen Frequenzen nach 31 bzw. 16 Monaten Nachbeobachtungszeit betragen $0,46\% \pm 0,10\%$ bei Patient #1 und $0,07\% \pm 0,02\%$ bei Patientin #2. Representative Dotplots HBc-spezifischer T Zellen von beiden Patienten vor und nach Transplantation sind in Abbildung 6A dargestellt. HBs-spezifische T Zellen konnten während der gesamten Beobachtungszeit nicht nachgewiesen werden (Daten nicht gezeigt).

Bei stabiler humoraler und zellulärer HBV-spezifischer Immunantwort war HBV-DNA während der gesamten Nachbeobachtung nicht nachweisbar. Abbildung 6B zeigt den zeitlichen Verlauf von HBc-spezifischen CD4 T Zellfrequenzen und HBV-Last für beide Patienten.

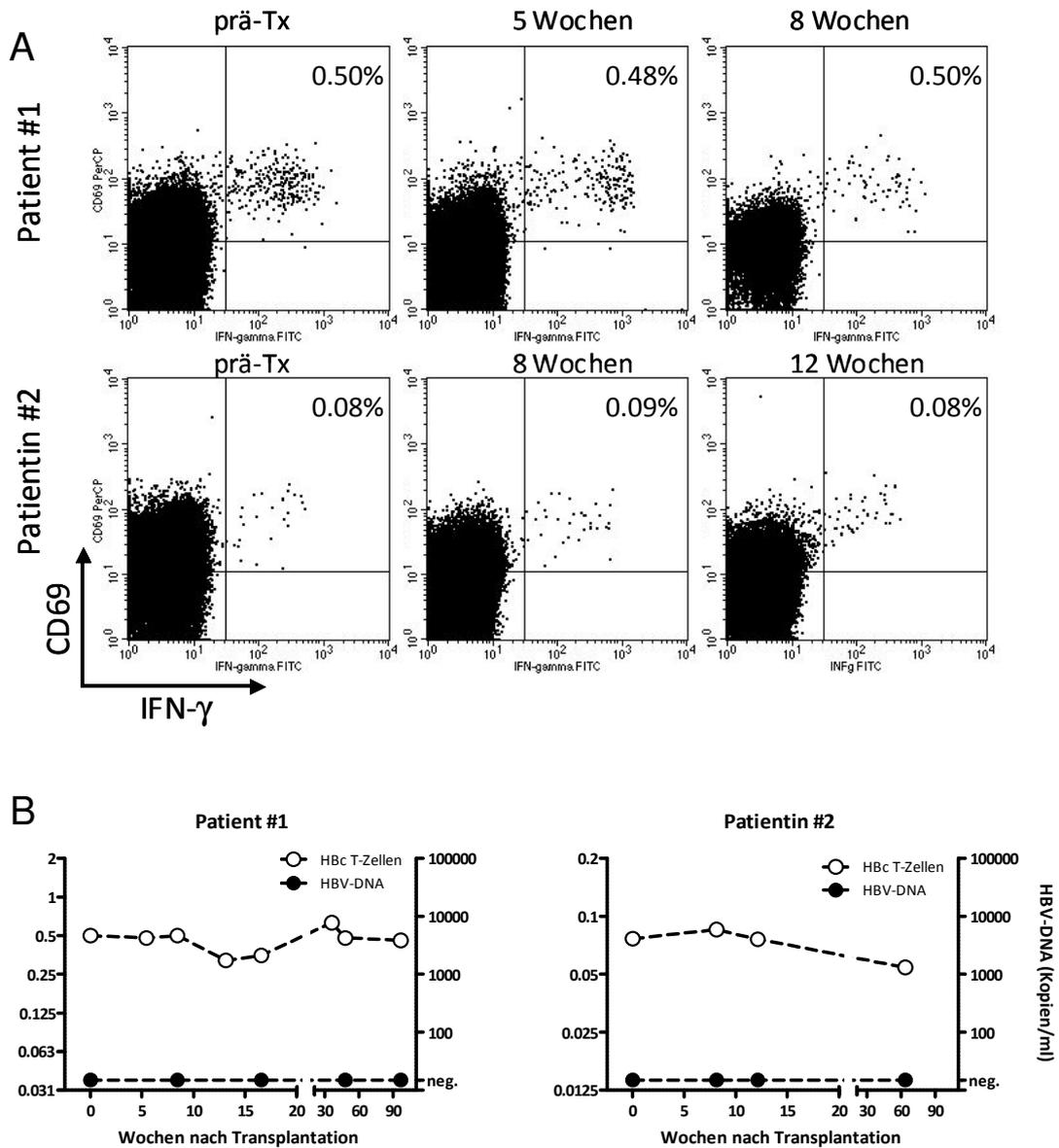


Abbildung 6 HBV-spezifisches Immunmonitoring

A Dargestellt sind repräsentative Dotplots beider Patienten zur Frequenzbestimmung HBV-spezifischer T Zellen vor, 5 und 8 Wochen nach Nierentransplantation, die nach Stimulation mit Hbc-haltigen virus-like particles anhand ihrer Expression von CD69 und IFN γ identifiziert wurden. Angegeben ist der prozentuale Hbc-reaktiver CD4 T Zellen (CD69⁺ und IFN γ ⁺) an allen CD4 T Zellen. Als Negativkontrolle dienten Kontrollpartikel, die keine viralen Proteine enthielten. Mit diesen ließ sich keine Zytokinproduktion induzieren (Daten nicht gezeigt). **B** Während der Nachbeobachtungszeit blieb bei beiden Patienten die HBV-DNA stets unterhalb der Nachweisgrenze und über ein Jahr nach Transplantation ließen sich sowohl bei Patient #1, als auch bei Patientin #2 Hbc-spezifische CD4 T Zellen auf stabilem Niveau nachweisen.

4.2 Treg bei Patienten mit terminaler Niereninsuffizienz

4.2.1 Marker zur Identifizierung von Treg

Im folgenden Teil der Arbeit wurde eine Charakterisierung der regulatorischen T Zellen (Treg) bei Patienten mit chronischer Niereninsuffizienz vorgenommen. In Anbetracht der Fülle der zur Verfügung stehenden Treg-Marker war es bei der Planung der Experimente entscheidend, Treg mit einer möglichst einfachen Kombination verschiedener Marker sicher identifizieren zu können. Die initial gebräuchliche Identifizierung über die Coexpression von CD4 und CD25 hat den Nachteil, dass CD25 auch von nicht-regulatorischen, kürzlich aktivierten CD4 T Zellen exprimiert wird. Wie bereits bei Immungesunden etabliert, wurde daher eine Kombination der Oberflächenmoleküle CD25 und CD127 mit dem intrazellulären Transkriptionsfaktor Foxp3 als Marker zur Identifizierung von Treg herangezogen (PETERSON, 2012). Diese Kombination wurde mit der Aussagekraft bei reiner CD25-Färbung verglichen. Dies war relevant, um abzuschätzen, inwieweit die Identifizierung von Treg über CD25 alleine zur zuverlässigen Depletion von Treg in funktionellen Assays geeignet ist. Zudem sollte überprüft werden, ob auch bei Patienten mit terminaler Niereninsuffizienz mit Hilfe dieser Marker regulatorische T Zellen identifiziert werden können. Hierzu wurde EDTA-Vollblut von jeweils 15 gesunden Kontrollpersonen, 15 Hämodialysepatienten (HD-Patienten) und 15 Nierentransplantierten (NTx, mindestens ein Jahr nach Transplantation, Immunsuppression ohne Rapamycin) mit Antikörpern gegen CD4, CD25, CD127 und Foxp3 gefärbt und durchflusszytometrisch analysiert. Nach Gaten der Lymphozyten und anschließender Markierung der CD4⁺-Population wurden diese anhand ihrer CD25-, CD127- und Foxp3-Expression differenziert. Treg zeichnen sich dadurch aus, dass sie CD4⁺CD25⁺CD127⁻Foxp3⁺ T Zellen sind.

Abbildung 7 zeigt exemplarisch Dotplots zur Frequenzbestimmung CD25⁺ (A), CD25⁺CD127⁻ (B), bzw. CD25⁺Foxp3⁺ (C) regulatorischer T Zellen aus allen 3 Probandenkollektiven. Dabei wird prozentual Bezug auf die gesamte CD4⁺-Zellpopulation genommen.

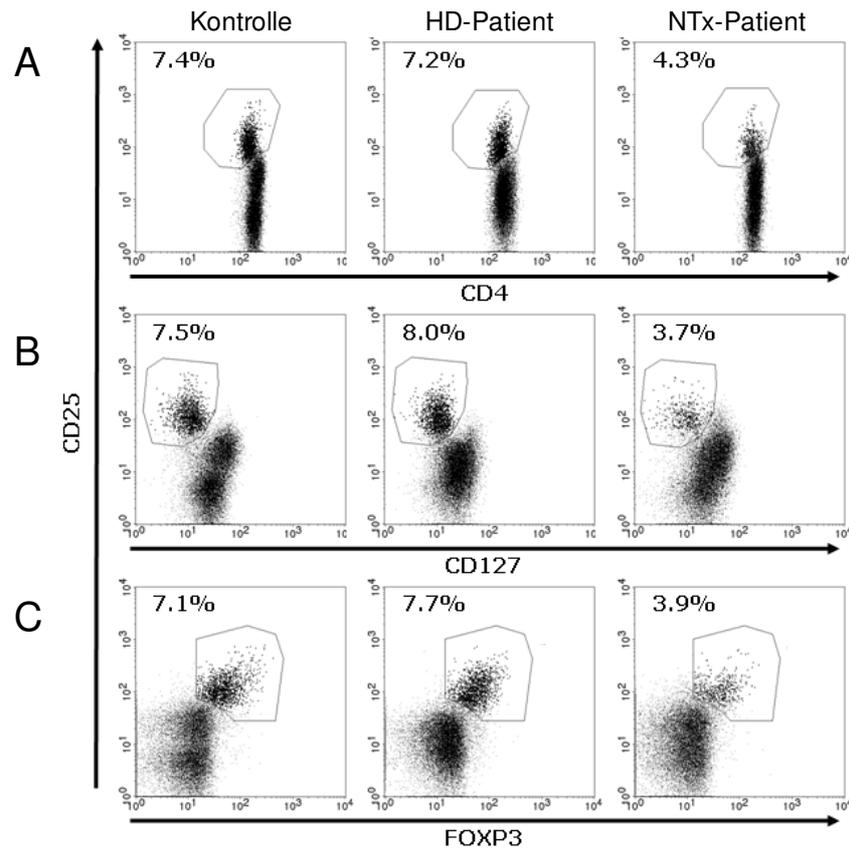


Abbildung 7 Durchflusszytometrische Detektion von Treg anhand von CD25, CD127 und Foxp3

Dargestellt sind exemplarische Dotplots von einer gesunden Kontrollperson, einem Hämodialyse- (HD-) Patienten und einem nierentransplantierten (NTx-) Patienten zur Frequenzbestimmung regulatorischer CD4 T Zellen. Die Treg-Frequenzen werden jeweils angegeben als prozentualer Anteil der einfach CD25⁺ Zellen (A), der CD25⁺CD127⁻ Zellen (B) oder der CD25⁺Foxp3⁺ Zellen (C) an allen CD4⁺ Zellen.

Da die einzelnen Treg-Marker in einer einzigen Färbung kombiniert wurden, konnte deren Expression untereinander und in unterschiedlichen Kombinationen verglichen und auch korreliert werden. Abbildung 8 zeigt die Korrelation der Frequenzen CD4⁺CD25⁺ und CD4⁺CD25⁺CD127⁻Foxp3⁺ regulatorischer T Zellen für gesunde Kontrollen, HD-Patienten und NTx-Patienten. Die Ergebnisse der Treg-Frequenzbestimmung beider Markerkombinationen korrelieren linear und hoch signifikant miteinander (gepoolte Analyse aller drei Gruppen: $r^2=0,95$; $p<0,0001$). Dies gilt auch bei Analyse der einzelnen Subgruppen für Gesunde, HD-Patienten und nierentransplantierte Patienten (Daten nicht gezeigt).

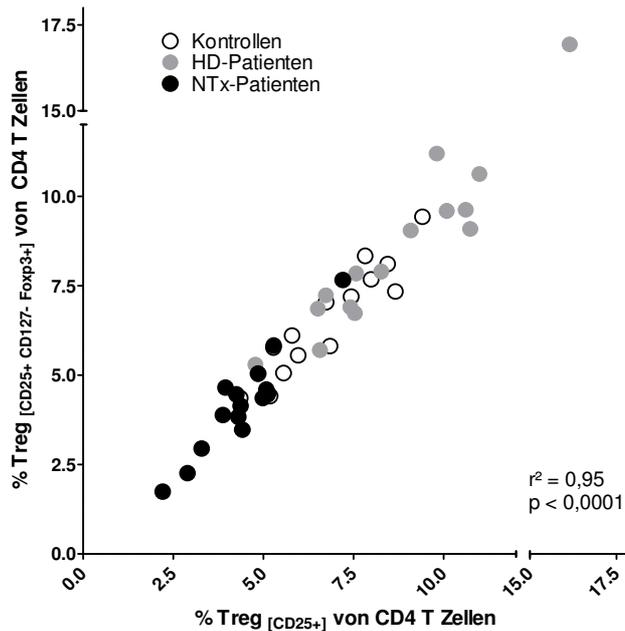


Abbildung 8 Korrelation der Frequenzen von CD4⁺CD25⁺ mit CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺CD127⁻ Treg

Bei jeweils 15 Kontrollpersonen (Kontrollen), Nierentransplantierten (NTx-Patienten) und Hämodialysepatienten (HD-Patienten) erfolgte die Frequenzbestimmung der Treg (angegeben als prozentualer Anteil an allen CD4 T Zellen) anhand der Marker CD4 und CD25 bzw. der der Markerkombination aus CD4, CD25, CD127 und Foxp3. In der kombinierten Korrelationsanalyse der unterschiedlichen Methoden zur Frequenzbestimmungen zeigte sich eine statistisch signifikante Korrelation der Messergebnisse ($r^2=0,95$, $p<0,0001$).

Betrachtet man die durchschnittlichen Frequenzen der über CD4⁺CD25⁺CD127⁻Foxp3⁺ identifizierten regulatorischen T Zellen in den einzelnen Probandenkollektiven, so unterscheiden sich diese signifikant voneinander (s. Abbildung 9). HD-Patienten besitzen mit 8,70%±2,86% Treg eine signifikant höheren Frequenz an Treg als gesunde Kontrollpersonen (6,44%±1,57%, $p<0,05$). Umgekehrt verhält es sich bei den nierentransplantierten Patienten, die signifikant weniger Treg aufwiesen als gesunde Kontrollpersonen (4,22%±1,41%, $p<0,001$).

Die Treg-Frequenzen unterschieden sich ebenfalls signifikant voneinander, wenn deren Identifizierung auf einer weniger umfangreichen Kombination von Markern basierte (Daten nicht gezeigt).

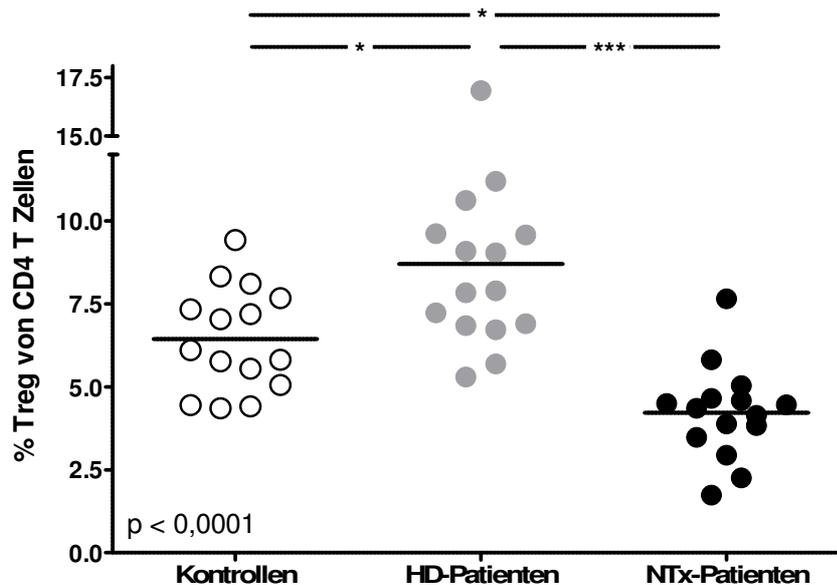


Abbildung 9 Treg-Frequenzen im Vollblut

Frequenzbestimmung der $CD4^+CD25^+CD127^+Foxp3^+$ Treg an der gesamten $CD4$ T-Zellpopulation im Vollblut bei 15 gesunden Kontrollpersonen (Kontrollen), 15 Hämodialysepatienten (HD-Patienten) und 15 Nierentransplantierten (NTx-Patienten) mindestens ein Jahr nach Transplantation. Gesunde besaßen im Mittel mit $6,44\% \pm 1,57\%$ signifikant weniger Treg als HD-Patienten ($8,70\% \pm 2,86\%$) bzw. signifikant mehr Treg als Nierentransplantierte ($4,22\% \pm 1,41\%$), $p^* < 0,05$, $p^{***} < 0,001$. Angegeben sind die Mittelwerte mit zugehörigen Standardabweichungen.

Da die Detektion des Transkriptionsfaktors Foxp3 eine vergleichsweise aufwändige, intrazelluläre Färbung erforderte, wurde analysiert, inwieweit die Bestimmung der Treg-Frequenzen, welche über $CD4^+CD25^+CD127^-$ identifiziert wurden mit der kombinierten Messung von $CD4^+CD25^+CD127^-Foxp3^+$ korrelierte. Hierbei zeigte sich eine noch größere Korrelation ($r^2=0.9713$, $p < 0,0001$) als beim Vergleich mit $CD4^+CD25^+$ Treg (Abbildung 8), Daher wurde bei den folgenden Analysen (4.2.2 und folgende) auf die aufwändige, intrazelluläre Färbung von Foxp3 verzichtet und zur Identifizierung der Treg eine methodisch einfachere Oberflächenfärbung durchgeführt.

4.2.2 Treg-Oberflächencharakteristika

Da sich die Treg-Frequenzen in den einzelnen Probandenkollektiven deutlich unterscheiden, stellt sich die Frage, ob sich die Treg auch in weiteren phänotypischen Charakteristika und in ihrer Funktionalität unterscheiden. Aufgrund des bekannten urämischen Immundefektes mit gestörter Monozytenfunktion (BETJES, 2013) und Verschiebungen im Th1-Th2-Gleichgewicht (SESTER et al., 2000) vermuteten wir auch bei den Treg eine veränderte

Zusammensetzung. Von besonderem Interesse waren dabei die erhöhten Treg-Frequenzen von Hämodialysepatienten.

Zur detaillierteren, phänotypischen Charakterisierung des Treg-Pools wurden Treg von jeweils 10 gesunden Kontrollpersonen, 16 HD-Patienten und 18 NTx-Patienten (mindestens 3 Monate nach Transplantation bei Einnahme einer Erhaltungssimmunsuppression) genauer untersucht. Aus EDTA-Vollblut erfolgte zunächst eine Phänotypisierung der Treg hinsichtlich der Oberflächen-Expression von Reifungsmarkern (CD45RO), Homingmarkern (CD62L) und Costimulationsfaktoren (CD28). Anhand der CD39-Expression wurde zusätzlich eine funktionell hochsuppressive Treg-Subpopulation (BORSELLINO et al., 2007) analysiert. Diese Parameter wurden dazu in einer einzigen 8fach-Färbung kombiniert (CD4, CD8, CD25, CD39, CD127, CD45RO, CD62L und CD28).

In dem hier analysierten Probandenkollektiv bestätigten sich die bereits oben gezeigten quantitativen Verteilungen der CD4⁺CD25⁺CD127⁻ Treg-Frequenzen bei Gesunden und HD-Patienten (Daten nicht gezeigt).

Der prozentuale Anteil der hochsuppressiven CD39⁺ Treg unterschied sich in den drei untersuchten Kollektiven nicht, denn im Mittel besaßen Gesunde 31,48%±16,72% CD39⁺ Treg, HD-Patienten 33,76%±17,76% und NTx-Patienten 37,21%±17,04% (p=0,68; Abbildung 10).

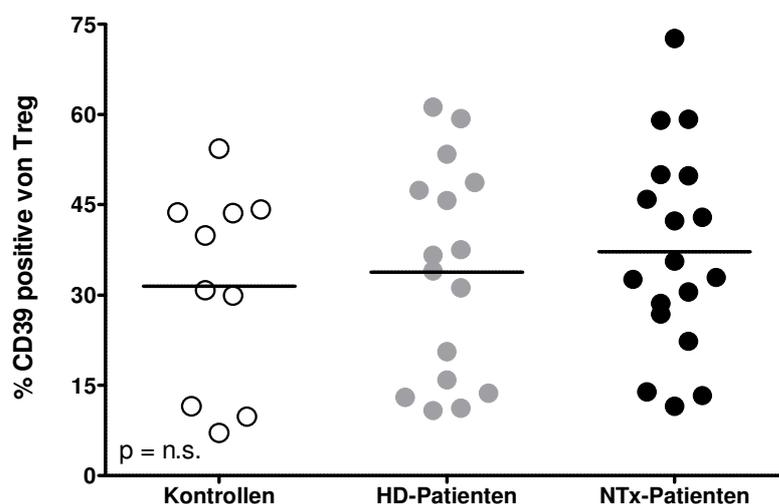


Abbildung 10 Anteil CD39⁺ Treg

Nach Identifizierung der Treg über die Expression von CD4, CD25 und CD127 bei 10 gesunden Kontrollpersonen, 16 Hämodialysepatienten (HD-Patienten) und 18 Nierentransplantierten (NTx-Patienten) erfolgte die Charakterisierung der CD39-Expression. 31,48%±16,72% der Treg von Gesunden waren CD39⁺, 33,76%±17,76% bei HD-Patienten und 37,21%±17,04% bei NTx-Patienten (p=0,68). Angegeben sind die Mittelwerte mit den zugehörigen Standardabweichungen.

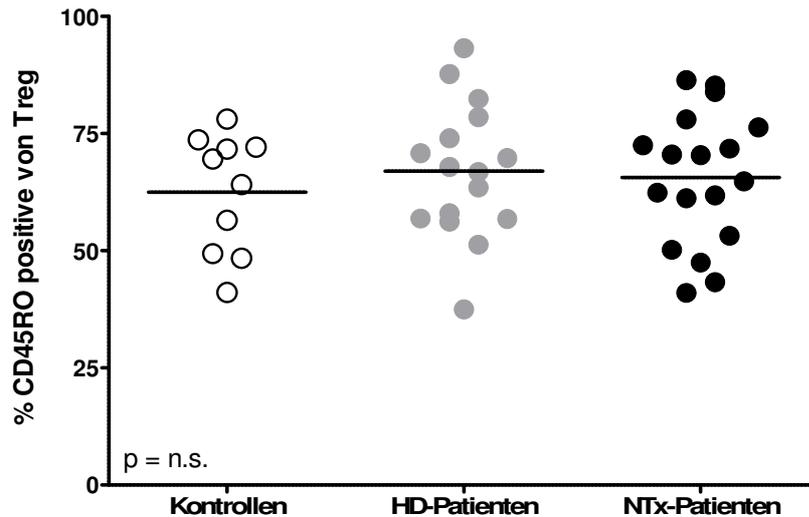


Abbildung 12 CD45RO-Expression regulatorischer T Zellen

Die CD4⁺CD25⁺CD127⁻ Treg der 10 Kontrollpersonen, 16 HD-Patienten und 18 NTx-Patienten wurden hinsichtlich ihrer CD45RO-Expression untersucht. Bei 62,47%±12,75%, 66,96%±14,35% bzw. 66,58%±14,19% CD45RO⁺ Treg konnten keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen festgestellt werden (p=0,57). Angegeben sind die Mittelwerte mit den zugehörigen Standardabweichungen.

Der Costimulationsfaktor CD28 wird auf nahezu allen Treg von Gesunden exprimiert (99,25% [98,50-99,45%]). HD-Patienten und nierentransplantierte Patienten weisen dahingegen geringfügig, aber signifikant geringere Frequenzen CD28⁺ Treg auf. Dabei besteht allerdings eine beträchtliche interindividuelle Streuung (94,10% [89,38-97,60%] bzw. 97,20% [95,28-98,20%], p<0,001 bzw. p<0,01; Abbildung 13).

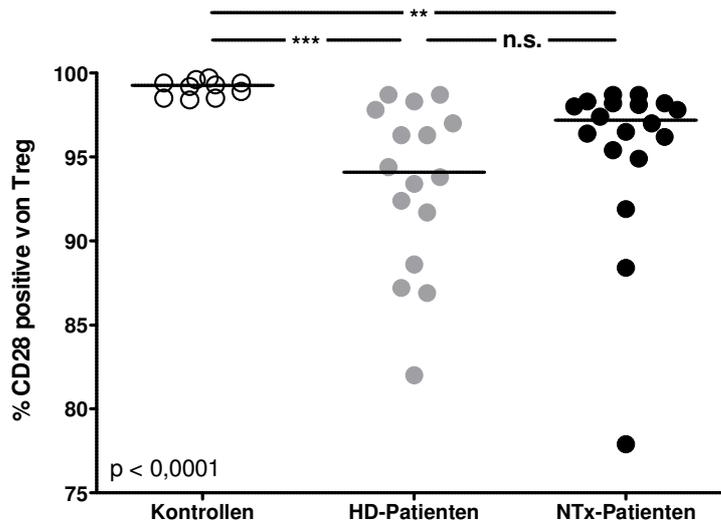


Abbildung 13 CD28-Expression auf Treg

Die Expression von CD28 unterscheidet sich in den untersuchten Kollektiven signifikant voneinander ($p < 0,0001$). 99,25% [98,50-99,45%] der Treg ($CD4^+CD25^+CD127^-$) gesunder Kontrollpersonen ($n=10$) exprimieren CD28. Der Anteil $CD28^+$ Treg ist mit 94,10% [89,38-97,60%] bzw. 97,20% [95,28-98,20%] bei HD-Patienten ($n=16$) und NTx-Patienten ($n=18$) signifikant niedriger als bei Gesunden (** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$). Angegeben sind die Mediane mit zugehörigem Interquartilsabstand der 25% und 75% Quartile.

Zusammenfassend zeigte sich, dass sich der Anteil der Treg an den $CD4$ T Zellen signifikant zwischen HD-Patienten, gesunden Kontrollen und Nierentransplantierten unterscheidet. Demgegenüber waren keine wesentlichen phänotypischen Unterschiede festzustellen. Eine Ausnahme davon bildete lediglich CD28, das sowohl bei Hämodialyse-Patienten als auch bei Nierentransplantierten geringfügig schwächer exprimiert war als bei Gesunden.

4.2.3 Funktionelle Charakterisierung der Treg bei HD-Patienten

Im Folgenden sollte überprüft werden, inwieweit die schwächere Expression von CD28 mit einer Beeinträchtigung der Funktionalität einhergeht. Zur Überprüfung dieser Hypothese wurde eine funktionelle Untersuchung der Treg von Hämodialysepatienten durchgeführt.

Dazu wurde ein in unserem Labor etabliertes Protokoll zur funktionellen Charakterisierung von Treg genutzt (PRESSER et al., 2009). Zielzellen der Treg sind in diesem Versuchsaufbau T Zellen. Durch vergleichende Messung von Treg-depletierten und nicht-depletierten (mock) Proben wird die Treg-vermittelte Inhibition der T-zellulären Zytokinproduktion als Reaktion auf eine Antigenstimulation erfasst. Besonderheit dieses Protokolls ist, dass es auf Vollblut basiert, CD25 als Zielmolekül der Depletion verwendet und die Durchführung funktioneller Analysen im Vollblutmilieu ermöglicht. Die Experimente zur Untersuchung der Effekte einer Treg-Depletion bei Nierentransplantierten mit diesem Assay wurden von Daniela Presser

durchgeführt und sind mit den Ergebnissen der gesunden Kontrollpersonen bereits publiziert worden (PRESSER et al., 2009).

Zur Untersuchung der Treg-Funktionalität bei Hämodialysepatienten wurden Proben von 8 hämodialysepflichtigen Patienten untersucht. Zum direkten Vergleich sind die Daten der 9 gesunden Kontrollpersonen und 9 nierentransplantierten Patienten dargestellt (Abbildung 14). Zunächst wurde die Effizienz der Treg Depletion durchflusszytometrisch nach Färbung von CD3, CD4, CD8 und CD25 überprüft (Abbildung 14 A). Bei den Hämodialysepatienten konnte bei einer mittleren Treg-Frequenz von $7,50 \pm 0,88\%$ eine mediane Depletionseffizienz von $89,1\%$ erreicht werden, diese betrug bei Gesunden mit einer Ausgangsfrequenz von $7,96 \pm 0,57\%$ Treg $91,0\%$ und bei nierentransplantierten Patienten $91,4\%$ bei $4,19 \pm 0,60\%$ Treg in den mock-Proben. Im Anschluss wurde sowohl in depletierten, als auch mock-depletierten Proben eine spezifische Stimulation der Effektor T Zellen mittels SEB durchgeführt. Die Effektorfunktion wurde anhand der Expression des Aktivierungsmarkers CD69 und der Zytokine $IFN\gamma$ (Abbildung 14 B) und IL2 (Abbildung 14 C) quantifiziert. Erwartungsgemäß zeigte sich bei Gesunden für beide Zytokine ein signifikanter Anstieg der T-Zellreaktivität nach Wegfall des inhibitorischen Effektes der Treg in den depletierten Proben. So konnte die Frequenz $IFN\gamma$ -produzierender CD4 T Zellen um das $2,1 \pm 1,8$ -fache und im Fall von IL2 um das $1,6 \pm 0,9$ -fache und damit signifikant gesteigert werden ($p=0,005$ bzw. $p=0,03$). Bei den nierentransplantierten Patienten war dieser Effekt bei niedrigeren Treg-Frequenzen erwartungsgemäß geringer ausgeprägt. Die Zahl $IFN\gamma$ -produzierender Zellen konnte um den Faktor $1,5 \pm 0,5$ verstärkt werden ($p=0,007$). Im Gegensatz dazu konnte für IL2 nur eine Steigerung um den Faktor $1,2 \pm 0,2$ festgestellt werden, die keine statistische Signifikanz erreichte ($p=0,11$). Demgegenüber resultierte die Depletion der Treg von Hämodialysepatienten in keinem signifikanten Anstieg der Zytokininduktion in CD4 T Zellen nach Antigenstimulation. Die Frequenz $IFN\gamma$ -produzierender Zellen stieg nur auf das $1,2 \pm 0,3$ -fache und im Fall von IL2 blieb die Frequenz bei einem Faktor von $1,1 \pm 0,2$ nahezu unverändert ($p=0,65$, bzw. $p=0,56$). Zusammenfassend zeigten sich folglich Unterschiede in der Treg-Funktionalität bei Gesunden und Hämodialysepatienten.

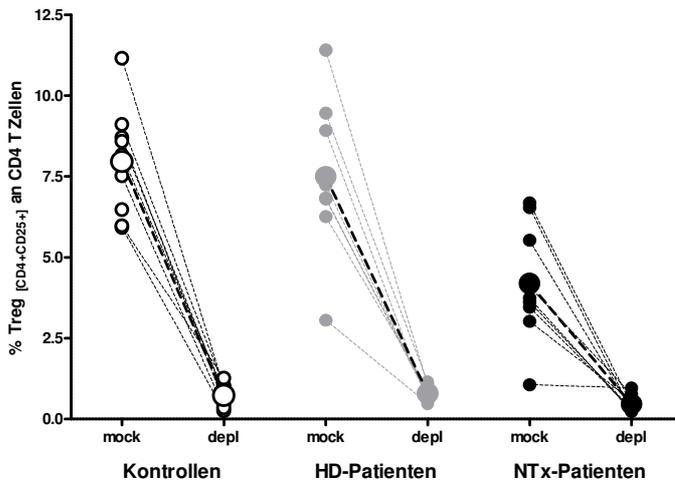
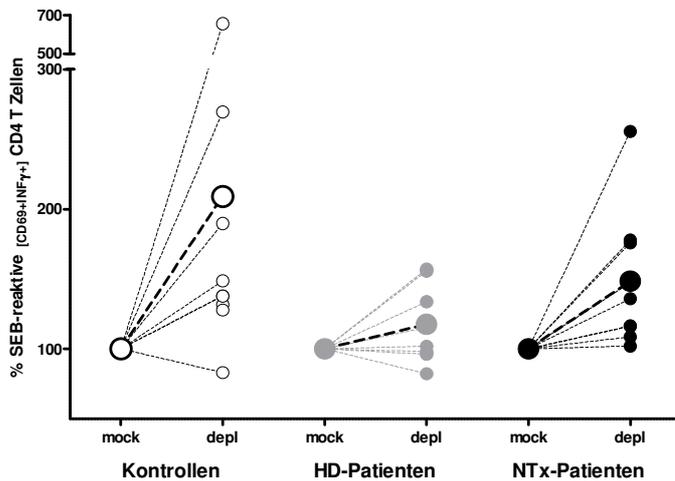
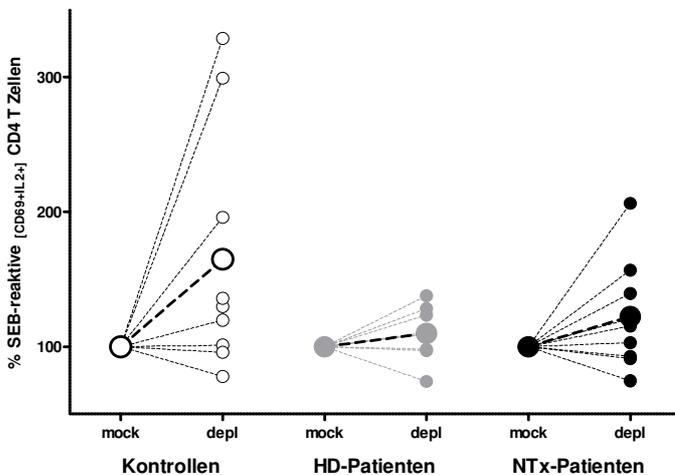
A**B****C**

Abbildung 14 Funktionelle Charakterisierung von Treg

A Die mediane Depletionseffizienz wurde mittels einer Kontrollfärbung der Marker CD3, CD4, CD8 und CD25 nach durchflusszytometrischer Messung bestimmt. Diese erreichte bei Gesunden 91,0%, bei Hämodialysepatienten (HD) 89,15% und bei Transplantierten (NTx) 91,4%. Die mittleren Treg-Frequenzen der mock- bzw. depletierten Proben betragen $7,96 \pm 0,57\%$ bzw. $0,73 \pm 0,12\%$ bei Gesunden, $7,50 \pm 0,88\%$ bzw. $0,79 \pm 0,09\%$ bei HD-Patienten und $4,19 \pm 0,60\%$ bzw. $0,46 \pm 0,09\%$ bei NTx-Patienten. Angegeben sind hier die Mittelwerte mit den zugehörigen Standardfehlern.

B Nach Depletion der Treg und somit Wegfall ihrer inhibitorischen Effekte kann nach Stimulation mit SEB bei Gesunden und nierentransplantierten Patienten eine signifikante Steigerung der CD4 T-Zellereaktivität, gemessen anhand der Frequenz IFN γ -produzierender Zellen, festgestellt werden (Faktor 2.1 ± 1.8 bzw. $1,6 \pm 0,9$; $p=0,005$ bzw. $p=0,007$). Bei Hämodialysepatienten blieb dahingegen die Frequenz reaktiver T Zellen nahezu unverändert (Faktor $1,2 \pm 0,3$, $p=0,65$).

C Tendenziell ähnliche Beobachtungen konnten gemacht werden, wenn die IL2-Produktion als Messgröße gewählt wurde. Bei Gesunden stieg die Frequenz reaktiver Zellen um das $1,6 \pm 0,9$ -fache ($p=0,03$) an. Bei Transplantierten erreichte ein Anstieg um den Faktor $1,2 \pm 0,2$ keine statistische Signifikanz ($p=0,11$) und bei Hämodialysepatienten änderte sich die Frequenz nur unwesentlich (Faktor $1,1 \pm 0,2$; $p=0,56$).

4.3 Optimierung des funktionellen Zytokin-Assays

Mit dem oben genutzten Protokoll konnte von Daniela Presser bei Patienten mit einer Caliceurininhibitor-basierten Kombinationstherapie gezeigt werden, dass die Treg funktionell sind (PRESSER et al., 2009), wenngleich der Effekt der Depletion auf die Effektorfunktion der T Zellen weniger stark ausgeprägt war. Ob diese Beobachtung ausschließlich auf die geringeren Frequenzen der Treg unter einer Calcineurininhibitor-basierten Therapie zurückzuführen ist, oder ob die eingenommenen Immunsuppressiva zusätzlichen Einfluss auf die Treg-Funktionalität nehmen, sollte im Folgenden analysiert werden. Hierzu wurde analysiert, inwieweit einzelne immunsuppressive Wirkstoffe die Funktionalität von Treg bei gesunden Kontrollpersonen ohne immunsuppressive Therapie in beeinträchtigen.

4.3.1 Optimierung der Vollblutdepletion

Um die aufgeworfene Fragestellung nach der Wirkung von Immunsuppressiva auf Treg unter optimalen Bedingungen untersuchen zu können, fand in der vorliegenden Arbeit zunächst eine Optimierung des von Daniela Presser etablierten Protokolls (PRESSER et al., 2009) zur Depletion von Treg aus dem Vollblut statt.

4.3.1.1 Optimierung des Antikoagulanz

Die bislang etablierte Waschprozedur bei Verwendung von Lithiumheparin zeigte, dass der Überstand nach Zentrifugieren noch trüb war und Thrombozytenschleier enthielt, was ein Absaugen des Überstandes ohne Beeinträchtigung der Leukozytenschicht erschwerte. Daher wurden alternative Antikoagulanzen getestet.

Das Blut zweier gesunder Probanden wurde dazu unter Zusatz dreier verschiedener Antikoagulantien (Lithiumheparin-Monovette, Natriumheparin im Überschuss und EDTA-Monovette) gewaschen und die Funktionalität der T Zellen durch SEB-induzierte Zytokinexpression überprüft. Da hier primär ein potentiell negativer Einfluss der Waschprozeduren auf die allgemeine T-Zellreaktivität untersucht und minimiert werden sollte, wurden diese Etablierungsschritte noch ohne Treg-Depletion durchgeführt.

Makroskopisch waren nach dem ersten Waschschrift die Überstände der Proben unabhängig vom gerinnungshemmenden Zusatz noch trüb, wobei die Proben mit Natriumheparin als Antikoagulanz am klarsten waren. Nach einem zweiten Waschschrift war der Unterschied nicht mehr so stark ausgeprägt (Daten nicht gezeigt).

Nach zwei Waschschritten wurden die korpuskulären Bestandteile aus 2 ml Vollblut Ausgangsmaterial mit RPMI-0,5% HSA rekonstituiert und auf insgesamt 4 ml aufgefüllt, so dass das Blut 1:1 mit Medium verdünnt vorlag. Im Anschluss wurde eine Färbung regulatorischer T Zellen mit Antikörpern gegen CD3, CD4, CD8 und CD25 durchgeführt und durchflusszytometrisch gemessen. Der Vergleich erfolgte mit einer gefärbten, unbehandelten EDTA-Vollblutprobe des jeweiligen Probanden. Dabei fanden sich vergleichbare Treg-Frequenzen in allen Proben, so dass die Waschschritte selbst keinen negativen Einfluss auf die Detektierbarkeit von regulatorischen T Zellen ausübten (Abbildung 15 A bzw. Daten nicht gezeigt). Die Abbildung 15 A zeigt die Dotplots zur Frequenzbestimmung der Treg eines Probanden.

Um zu überprüfen, ob eine effiziente Zytokinproduktion in den vorbehandelten Zellen noch induzierbar ist, wurde unmittelbar im Anschluss an die Waschprozedur eine T-Zellstimulation mit 2,5 µg/ml SEB über 18 Stunden unter Supplementierung von FCS, Glutamin, Penicillin und Streptomycin durchgeführt. In der anschließenden FACS-Färbung wurden Antikörper gegen CD4 und IFN γ verwendet, um den Anteil reaktiver CD4 T Zellen zu quantifizieren. Zum Vergleich wurde eine ungewaschene natriumheparinisierte Vollblutprobe 1:1 mit RPMI-0,5% HSA versetzt und für jeden Probanden ebenfalls unter Supplementierung mit FCS, Glutamin, Penicillin und Streptomycin mitstimuliert.

Im Vergleich zu den unbehandelten Vollblutproben zeigten sich bei einem der Probanden tendenziell geringere Frequenzen reaktiver CD4 T Zellen (Abbildung 15 B). Beim Vergleich der drei Antikoagulanzen fand sich jedoch bei beiden eine vergleichbare Zytokinproduktion als Reaktion auf die SEB-Stimulation (Abbildung 15 B bzw. Daten nicht gezeigt), sodass zukünftig aufgrund des makroskopisch besten Eindrucks Natrium-Heparin als Antikoagulanz favorisiert wurde.

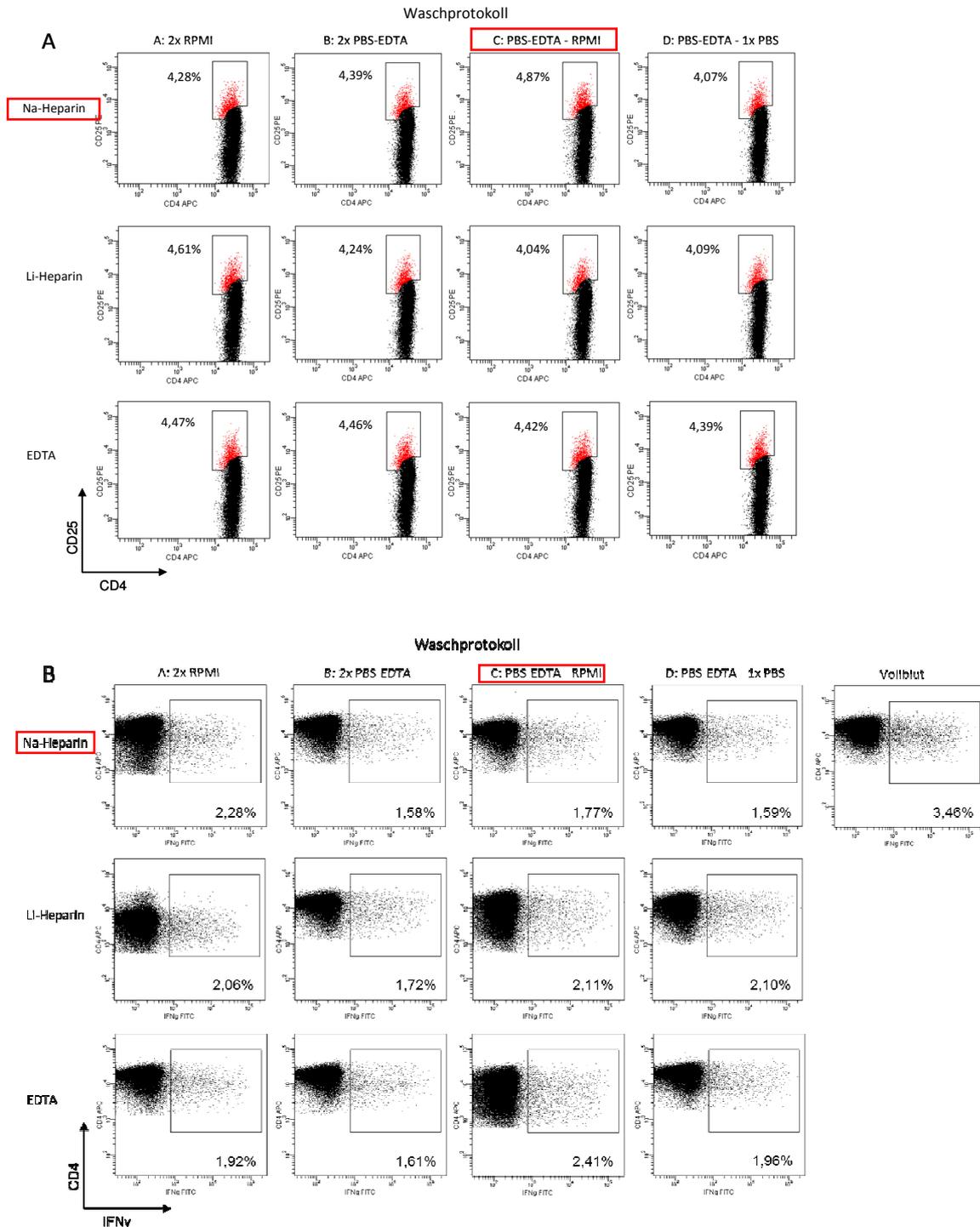


Abbildung 15 Treg-Frequenzen und SEB-Reaktivität in Abhängigkeit von den verwendeten Antikoagulantien

Blutproben von zwei Probanden waren mit Lithium-Heparin, Natriumheparin (im Überschuss) und EDTA antikoaguliert worden. Nach zwei Waschschritten mit RPMI wurde mit dem Superantigen SEB über den Zeitraum von 18 Stunden stimuliert. **A** Eine Frequenzbestimmung der CD4⁺CD25⁺ Treg in den gewaschenen Proben erfolgte durchflusszytometrisch nach Färbung von CD3, CD4, CD8 und CD25. Dargestellt sind für einen Probanden die Messdiagramme zur Identifizierung der Treg unter den CD4 T Zellen. Die angegebenen Treg-Frequenzen beziehen sich prozentual auf die gesamte CD4 T-Zellpopulation. **B** Die Detektion SEB-reaktiver CD4 T Zellen erfolgte nach Färbung von CD4 und IFN γ ebenfalls durchflusszytometrisch. Gezeigt sind die Dotplots eines Probanden mit CD4 T Zellen, die anhand ihrer CD4 und IFN-Expression zur Identifizierung der reaktiven CD4 T Zellen aufgetrennt sind. Der Anteil SEB-reaktiver Zellen wird prozentual an allen CD4 T Zellen angegeben. Ungewaschenes, verdünntes Vollblut wurde zum Vergleich mitgeführt.

4.3.1.2 Optimierung des Waschprotokolls

Im Folgenden sollte in einem zweiten Schritt das Waschprotokoll optimiert werden. Hierbei sollte überprüft werden, ob sich mögliche Gerinnungs- und Komplementeffekte durch die Zugaben von EDTA minimieren lassen ohne dass die Funktionalität der T Zellen beeinträchtigt wird. Dazu wurde Natrium-Heparin Blut von zwei Probanden vier verschiedenen Waschprozeduren unterzogen (Tabelle 16). Dabei entsprach das Waschprotokoll A dem bisherigen Standardprotokoll, in dem RPMI für beide Waschschrte verwendet wurde. In den drei weiteren Protokollen (B-D) wurde im ersten Waschschrte jeweils PBS-0,02% EDTA eingesetzt, während im zweiten Waschschrte entweder PBS-0,02% EDTA, RPMI oder PBS verwendet wurde.

Tabelle 16 Getestete Waschprozeduren vor Depletion der Treg

Waschprotokoll	Erster Waschpuffer	Zweiter Waschpuffer
A	RPMI	RPMI
B	PBS-0,02% EDTA	PBS-0,02% EDTA
C	PBS-0,02% EDTA	RPMI
D	PBS-0,02% EDTA	PBS

Nach dem ersten Waschschrte waren die Überstände in Waschprotokoll B und D am klarsten und konnten folglich am besten ohne Beeinträchtigung der Leukozytenschicht abgenommen werden. Danach folgten die Proben, die nach Waschprotokoll C bearbeitet worden waren. Die Proben, die mit dem ursprünglichen Protokoll verarbeitet wurden (Waschprotokoll A, RPMI-RPMI), schnitten makroskopisch am schlechtesten ab (Daten nicht gezeigt).

Anschließend wurde, wie bereits oben beschrieben, eine Treg-Färbung durchgeführt. Bei beiden Probanden war dabei der Treg-Anteil nach dem Waschen gemäß Protokoll C (EDTA-RPMI) am höchsten (Daten nicht gezeigt). Im Anschluss wurde wiederum eine polyklonale T-Zellstimulation mit SEB durchgeführt. Als Vergleich diente eine ungewaschene 1:1 Verdünnung aus natriumheparinisierten Vollblut und RPMI-0,5% HSA. In der anschließenden FACS-Färbung zeigte wiederum das Waschprotokoll C (EDTA-RPMI) die höchsten Reaktivitäten (Daten nicht gezeigt).

Unter Berücksichtigung dieser Optimierungsschritte fiel die Wahl beim Antikoagulant auf Natriumheparin und basierend auf Waschprotokoll C wurde fortan im ersten Schrit mit PBS-

0,02% EDTA und im zweiten Schritt mit RPMI gewaschen. Damit konnte stets eine effektive Depletion von mehr als 90% der in einer Probe befindlichen Treg erzielt werden, ohne dass es zu wesentlichen Veränderungen in den anderen T Zell-Subpopulationen kam (Daten nicht gezeigt).

4.3.1.3 Monozytenverlust

Nach Durchführung der ersten Depletions-Experimente mit optimierten Waschprotokoll zeigte sich, dass es bei depletierten Proben im Gegensatz zu den zugehörigen Bead-frei behandelten mock-Proben zu Zellverlusten von bis zu 80% in der Monozyten- und Neutrophilenpopulation kommen konnte. Abbildung 16 enthält exemplarische Dotplots mit Darstellung der Leukozytensubpopulationen in einer depletierten und zugehörigen mock-Probe. Da aber vor allem Monozyten als antigenpräsentierende Zellen in Vollblutassays fungieren und der Effekt regulatorischer T Zellen zumindest teilweise über die Beeinflussung der antigenpräsentierenden Zellen hervorgerufen werden kann (WING et al., 2008), war eine weitere Modifikation des Protokolls notwendig.

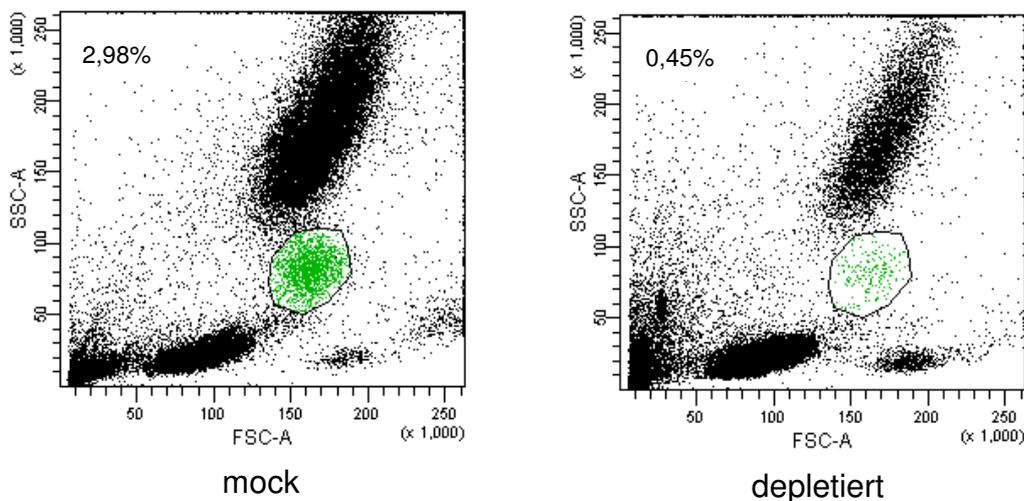


Abbildung 16 Monozytenverlust im Rahmen der Depletion CD25⁺ Zellen

Dargestellt sind exemplarische Dotplots eines Probanden mit Differenzierung der Leukozytensubpopulationen im Forward und Side Scatter und Markierung der Monozytenpopulation. Es zeigt sich ein deutlicher Verlust von Monozyten in der depletierten (depl), mit α -CD25-Beads behandelten Probe verglichen mit der mit PBS-0,1% HSA behandelten mock Probe (0,45% gegenüber 2,98% Monozyten).

Um zu verhindern, dass die eisenhaltigen Beads im Rahmen des Depletionsvorgangs die Monozytenpopulation negativ beeinflussen, wurden zunächst allgemeine Modifikationen bei den Inkubationsbedingungen vorgenommen: Die Inkubationszeit im Rahmen der Depletion

wurde von 45 auf 30 Minuten verkürzt, zudem wurden die Beads fortan direkt vor der Zugabe zu den Blutproben zwei Mal mit je 1,5 ml PBS-0,1% HSA statt wie bisher nur ein Mal gewaschen, damit gelöstes Eisen im Überstand sicher entfernt wird. Alle Lösungen wurden auf 4°C gekühlt und es wurde auf Eis gearbeitet.

Im nächsten Schritt wurde versucht den Eisengehalt in der Probe insgesamt zu verringern, indem eine Titration der Beads durchgeführt wurde. Ziel war es die Beadkonzentration zu identifizieren, die eine suffiziente Depletion CD25⁺ Treg bei gleichzeitig möglichst geringem Monozytenverlust erlaubt. Für dieses Experiment wurde Blut dreier gesunder Probanden verwendet und Beads unverdünnt (bisheriger Standard), in einer 1:2, 1:4 und 1:8 Verdünnung zur Depletion eingesetzt. Nicht depletierte mit PBS-01% HSA behandelte mock-Proben wurden ebenfalls mitgeführt. Abbildung 17 zeigt den Gehalt regulatorischer T Zellen in Abhängigkeit der verwendeten Beadverdünnung.

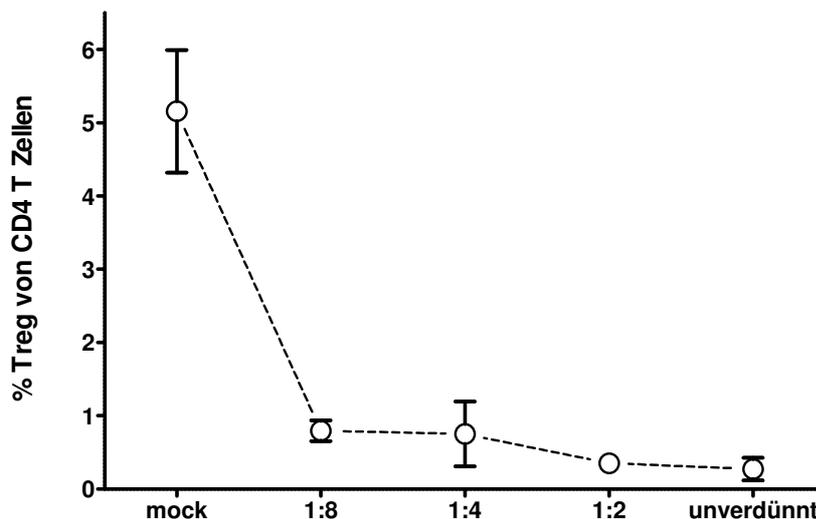


Abbildung 17 Titration der α -CD25-Beads zur Treg-Depletion

Bei 3 gesunden Probanden wurden Treg mittels α -CD25-Beads in absteigender Konzentration depletiert. Eingesetzt wurden sie dazu unverdünnt (dem bisherigen Standard entsprechend), in einer 1:2, 1:4 und 1:8-Verdünnung. Zum Vergleich diente eine mock-behandelte, nicht depletierte Probe. Die Frequenz regulatorischer T Zellen (angegeben als prozentualer Anteil an allen CD4 T Zellen) erfolgte durchflusszytometrisch nach Färbung von CD4 und CD25. Im Mittel besaßen die drei Probanden 5,14±0,84% Treg, die mit absteigender Konzentration der Beads auf Frequenzen von 0,27±0,15%, 0,35±0,04%, 0,75±0,44% bzw. 0,79±0,14% zunehmend schlechter depletiert werden konnten. Angegeben sind Mittelwerte mit den zugehörigen Standardabweichungen.

Es zeigte sich, dass eine effiziente Depletion (>90 % der Treg) auch mit einer 1:2 Verdünnung bzw. für spätere Anwendungen mit der halben Beadmenge möglich war, wobei der Monozytenverlust vergleichbar ausfiel (Daten nicht gezeigt). Ab einer 1:4 Verdünnung und wie sich in einem Folgeexperiment mit 4 weiteren Probanden zeigte, auch mit einer 1:3

Verdünnung (Daten nicht gezeigt) ist keine suffiziente Depletion mehr garantiert und die Streubreite größer (Abbildung 17). Darüber hinaus schien der Monozytenverlust jedoch dosisabhängig mit der Beadkonzentration zu steigen (Daten nicht gezeigt). Deshalb wurde bei den folgenden Experimenten als mock-Kontrolle eine Scheindepletion durchgeführt. Dies geschah durch die Verwendung von gegen murines CD4-gerichteter Beads (mock-Beads), welche nicht an humane Zellen binden. Dadurch wurde sichergestellt, dass die mit mock-Beads behandelten Proben den gleichen CD25-unabhängigen, unspezifischen Bead-Effekten ausgesetzt wurden, wie sie auch in den mit α -CD25-Beads behandelten Proben auftraten.

Um den Effekt von Immunsuppressiva unter physiologischen Bedingungen (Anwesenheit von korpuskulären und plasmatischen Bestandteilen des Blutes) testen zu können, wurden die Proben vor der Stimulation nicht mit FCS supplementiert, sondern mit autologem Plasma rekonstituiert. Zudem wurde als Qualitätskriterium festgelegt, dass Proben mit einem Monozytenverlust von über 50% nicht weiter verarbeitet wurden. Tabelle 17 fasst das optimierte Depletionsprotokoll von Treg im Vergleich mit dem Ausgangsprotokoll zusammen.

Tabelle 17 Optimiertes Depletionsprotokoll für die Testung der Immunsuppressiva

	Ausgangsprotokoll	optimiertes Protokoll
Versuchsbedingungen	Arbeiten bei Raumtemperatur Zentrifugation bei 4°C	Arbeiten auf Eis Zentrifugation bei 4°C
Ausgangsmaterial	2 ml Li-Heparin-Blut	2 ml Na-Heparin-Blut
Waschen der Probe	3 x RPMI	1 x PBS-0,02% EDTA 2 x RPMI
Waschen der Beads	1 x 1ml PBS-0,1% HSA	2 x 1,5ml PBS-0,1% HSA
Depletion	30µl α-CD25 Beads bzw. 30µl PBS-0,1% HSA in 1,2ml einer 1:1 Mischung aus Vollblut und RPMI-0,5% HSA 45 min Inkubation	15µl α-CD25 Beads bzw. 15µl α-mouse CD4 Beads in 1,2ml einer 1:1 Mischung aus Vollblut und RPMI- 0,5% HSA 30 min Inkubation
Stimulation	Zugabe von FCS Stimulation mit SEB	Zentrifugation und Abnahme des Überstandes (ca. 350µl) Zugabe von 150µl autologem Plasma Stimulation mit SEB

4.3.2 Funktionelle Charakterisierung von Treg bei Gesunden

Nach der Methodenumstellung wurde im ersten Schritt überprüft, ob sich trotz der vorgenommenen Modifikationen Treg-Effekte im Vollblutmilieu weiterhin nachweisen lassen. Zu dieser funktionellen Charakterisierung der Treg wurde Blut von 9 gesunden Kontrollpersonen verwendet.

Zunächst wurde eine Depletion gemäß des neu etablierten Standardprotokolls durchgeführt (s. 4.3.1). Die Treg-Frequenz konnte durch Depletion dabei im Mittel von $4,14 \pm 0,89\%$ in der

scheindepletierten mock-Probe auf $0,23 \pm 0,10\%$ ($p < 0,0001$) nach Depletion gesenkt werden, was einer medianen Effizienz 94,6% entspricht (Abbildung 18 A).

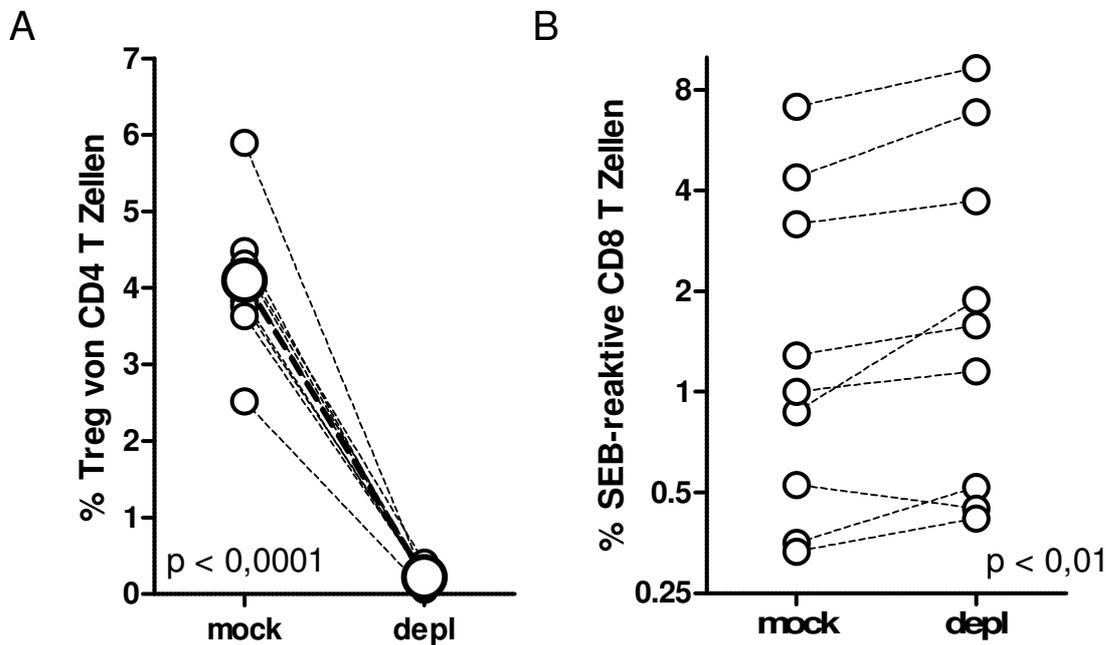


Abbildung 18 Treg-Depletion bei Gesunden nach optimiertem Protokoll

A Zur Erfolgskontrolle der Depletion erfolgte eine Färbung von CD4, CD8 und CD25 und die durchflusszytometrische Detektion der Frequenz $CD25^+$ Treg an allen CD4 T Zellen ($n=9$). Graphisch hervorgehoben sind die mittleren Frequenzen von $4,14 \pm 0,89\%$ Treg in der scheindepletierten mock-Probe und $0,23 \pm 0,10\%$ in den depletierten Proben ($p < 0,0001$). Daraus errechnete sich eine mediane Depletionseffizienz von über 94,6%. **B** Nach erfolgreicher Depletion der Treg wurde bei den 9 Probanden eine 18-stündige Stimulation mit SEB und anschließend die durchflusszytometrische Detektion reaktiver CD8 T Zellen anhand ihrer Expression von CD69 und $IFN\gamma$ durchgeführt. Durch Depletion konnte ein signifikanter Frequenzanstieg von im Mittel $2,12\% \pm 2,33$ auf $2,88\% \pm 3,18\%$ beobachtet werden ($p < 0,01$). Angegeben sind Mittelwerte mit zugehöriger Standardabweichung.

Im Anschluss erfolgte eine 18-stündige T-Zellstimulation mit $2,5 \mu\text{g/ml}$ SEB unter unmittelbarer Supplementation mit autologem Plasma, Penicillin, Streptomycin und 0,2% Ethanol, dem Lösungsmittel der Immunsuppressiva, die im folgenden Schritt verwendet werden sollten. So sollte später ausgeschlossen werden, dass die beobachteten Effekte nicht auf der Wirkung des Lösungsmittels beruhen, sondern auf die Immunsuppressiva zurückzuführen sind.

Nach FACS-Färbung mit Antikörpern gegen CD4, CD69, $IFN\gamma$ und IL2 (s. 3.6) erfolgte die durchflusszytometrische Messung. Unter den CD8 T Zellen (gemessen als CD4-negative Lymphozyten) zeigte sich in den depletierten Proben, unter Wegfall der inhibitorischen Effekte der Treg, ein signifikanter Anstieg in der Frequenz SEB-reaktiver T Zellen im Vergleich zu den scheindepletierten Proben. Im Mittel stieg die Reaktivität von $2,12\% \pm 2,33\%$

auf $2,88\% \pm 3,18\%$ an ($p < 0,01\%$) (Abbildung 18 B). Die Frequenz SEB-reaktiver CD4 T Zellen konnte durch eine Depletion der Treg ebenfalls gesteigert werden, allerdings wurde hier das Niveau der statistischen Signifikanz nicht erreicht (Daten nicht gezeigt). Vor diesem Hintergrund wurden für die folgenden Analysen CD8 T Zellen als Zielzellen zur Untersuchung der Wirkung von Immunsuppressiva auf Treg gewählt.

4.3.3 Beeinflussung der Treg-Funktionalität durch Immunsuppressiva

Der Einfluss der Immunsuppressiva Cyclosporin A, FK506 und Prednisolon auf die Treg-Funktionalität sollte im Folgenden untersucht werden. Dazu wurde in Proben der 9 Probanden unter Einwirkung der einzelnen Immunsuppressiva der Effekt einer Treg-Depletion auf die Zytokinproduktion der CD8 T Zellen (gemessen als CD4-negative Lymphozyten) nach SEB-Stimulation untersucht. (Abbildung 19).

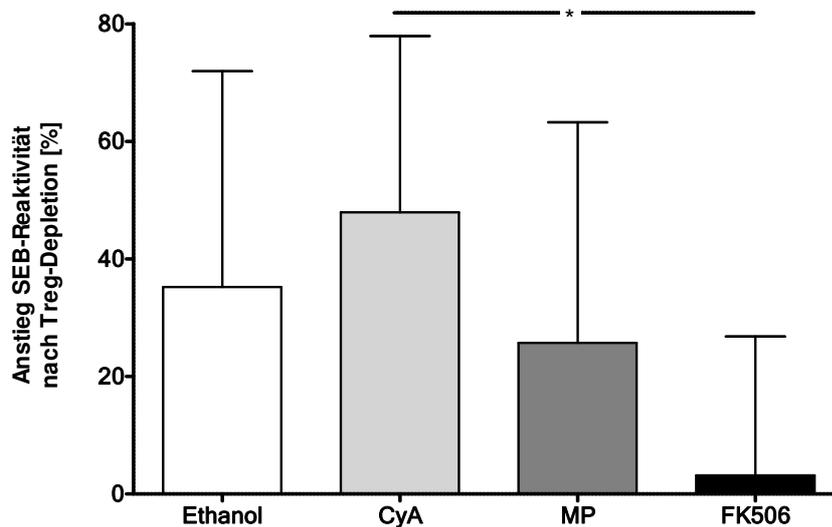


Abbildung 19 Differentielle Beeinflussbarkeit der Treg-Funktionalität durch Immunsuppressiva

Der Frequenzanstieg SEB-reaktiver CD8 T Zellen bei Depletion der Treg wurde durch den Vergleich zu scheindepletierten (mock) Proben bei 9 gesunden Kontrollpersonen anhand der $IFN\gamma$ -Produktion und CD69-Expression durch die nicht-CD4 T Zellen gemessen. Den mock-behandelten bzw. depletierten Kontrollproben war das Lösungsmittel der Immunsuppressiva (Ethanol) zugesetzt worden, den Proben zur Untersuchung des Effektes von Cyclosporin A (CyA) 350 ng/ml Cyclosporin A, den Proben, mit denen Methylprednisolon (MP) untersucht wurde 1 μ g/ml MP und den Proben für Tacrolimus (FK506) 20 ng/ml Immunsuppressivum. Der Anstieg der Frequenzen reaktiver CD8 T Zellen belief sich unter den einzelnen Zusätzen auf $35 \pm 37\%$ ($p < 0,05$); $48 \pm 30\%$ ($p < 0,05$); $26 \pm 35\%$ ($p < 0,05$) bzw. nur $3 \pm 24\%$ ($p = 0,91 = ns$) für Tacrolimus. Dabei zeigten die beiden Calcineurininhibitoren im direkten Vergleich signifikant unterschiedliche Effekte auf die Treg-Funktionalität ($*p < 0,05$). Angegeben sind die Mittelwerte mit den zugehörigen Standardabweichungen.

Die Reaktivität der CD8 Effektor T Zellen wurde durchflusszytometrisch anhand der Zytokininduktion ($IFN\gamma$) und Expression des Aktivierungsmarkers CD69 quantifiziert. Die verwendeten Konzentrationen der Immunsuppressiva entsprachen klinisch gebräuchlichen

Dosierungen und den damit erreichten mittleren Tagesspiegeln (CyA 200ng/ml, FK506 20ng/ml und Methylprednisolon 1µg/ml, entsprechend einer Dosierung von 1mg/kg Körpergewicht). Der bereits oben beschriebene Anstieg der T-Zellreaktivität durch Depletion der Treg in Proben der Lösungsmittelkontrolle (Ethanol) betrug bezogen auf die scheindepletierte Ethanolprobe $35\pm 37\%$ ($p < 0,01$, Abbildung 18; Ethanol in Abbildung 19). Unter Einwirkung der Immunsuppressiva Cyclosporin A und Methylprednisolon in den depletierten und scheindepletierten Proben blieb dieser Effekt der Treg-Depletion erhalten, so dass sich diese Substanzen offensichtlich nicht nachteilig auf die Funktionalität der Treg auswirken (Anstieg der Effektorzell-Reaktivität bei Treg-Depletion um $48\pm 30\%$, $p < 0,05$ bzw. $26\pm 35\%$, $p < 0,05$; Abbildung 19). Die Zugabe von FK506 schien dahingegen eine deutliche Hemmung der Treg-Funktion zu bewirken, denn unter Einwirkung von FK506 in den entsprechenden Proben blieb die Frequenz reaktiver Zellen nahezu unverändert ($3\pm 24\%$, $p = 0,91 = ns$, Abbildung 19). Die beiden Calcineurin-Inhibitoren zeigten im direkten Vergleich signifikant unterschiedliche Effekte. War der Anstieg der Effektorzell-Funktion bei Depletion der Treg unter Cyclosporin A noch messbar, war er unter FK506 nicht mehr nachweisbar ($p < 0,05$).

5 Diskussion

Neben der Untersuchung der Transplantatfunktion stellt das Monitoring infektiöser Komplikationen nach Organtransplantation einen zentralen Bestandteil der Nachsorge dar. Durch die notwendige medikamentöse Immunsuppression sind die Patienten in hohem Maße infektgefährdet. Insbesondere Infektionen mit persistierenden Erregern wie dem Cytomegalievirus (CMV) verursachen häufig Komplikationen und wirken sich nachteilig auf die Transplantatfunktion aus (SAGEDAL et al., 2004). Zur Minimierung von infektiösen Komplikationen nach Organtransplantation können grundsätzlich zwei unterschiedliche therapeutische Ansätze zur Anwendung kommen (KOTTON, 2013). Für die Wahl des geeigneten Vorgehens ist neben dem individuellen Risiko des Patienten jedoch auch die Verfügbarkeit von diagnostischen und therapeutischen Möglichkeiten von entscheidender Bedeutung. Eine generelle medikamentöse Prophylaxe zum einen ist einfach durchzuführen, aber mit eventuellen Nebenwirkungen belastet und unter Umständen profitieren nicht alle Patienten von der Therapie, da sie ohnehin nicht erkrankt wären. Beispiele hierfür sind die Prophylaxen gegen *Pneumocystis jirovecii* oder CMV. Zum anderen besteht alternativ dazu die Möglichkeit erst eine Therapie einzuleiten, wenn es zur Erkrankung kommt. Bedient man sich dabei der Methoden des direkten Erregernachweises (wie dem Nachweis viralen Erbmaterials mittels PCR) und beginnt die Therapie unmittelbar bei positivem Testergebnis und noch asymptomatischen Patienten, geschieht dies im Rahmen eines präemptiven Vorgehens. Voraussetzung hierfür sind allerdings häufige Kontrollen um die Infektionen frühzeitig genug erkennen zu können. Neben der CMV-Infektion kann dieses Vorgehen auch bei der Infektion mit HBV Anwendung finden. Wenngleich bei der Diagnostik zur Steuerung präemptiver Therapien bislang noch die Methoden des direkten Erregernachweises im Vordergrund stehen, weisen diese jedoch einen erheblichen Nachteil auf. So geben diese Verfahren keine direkte Auskunft über die immunologische Kompetenz des Patienten eine Reaktivierung oder Reinfektion mit einem spezifischen Krankheitserreger aus eigener Kraft verhindern oder beherrschen zu können. Eine Möglichkeit dieses Problem zu überwinden, scheint das Monitoring der zellulären Immunantwort zu sein, wie es bereits für CMV-Infektionen gezeigt werden konnte (EGLI et al., 2012; SESTER et al., 2005). Die regelmäßige Kontrolle der CMV-spezifischen T Zellen unter Berücksichtigung phänotypischer und funktioneller Marker bietet eine in unserem Zentrum etablierte Strategie zur Optimierung der antiviralen und immunsuppressiven Therapie bei CMV-assoziierten Komplikationen nach

Organtransplantation. Damit kann die immunologische Kompetenz von Patienten genauer charakterisiert und das Risiko für CMV-Infektionen besser abgeschätzt werden (SESTER et al., 2008). Im Rahmen dieser Arbeit wurde getestet, inwieweit diese Monitoringstrategie auch bei der HBV-Infektion hilfreich ist.

5.1 Monitoring der HBV-spezifischen T-zellulären Immunantwort nach Nierentransplantation

Das Risiko HBV-assoziiierter Komplikation im Verlauf nach solider Organtransplantation hängt entscheidend vom Infektions- und Immunitätsstatus der Spender und Empfänger ab. Deshalb sind umfangreiche Screeninguntersuchungen vor und nach Transplantation unabdingbar, um dieses Risiko abschätzen zu können. Im Jahre 2006, als die Transplantation der Nieren einer HBs-Antigen positiven Spenderin in die hier untersuchten Patienten mit ausgeheilter HBV-Infektion erfolgte, waren die Erfahrungen mit solchen Konstellationen, die ein gewisses Transmissionsrisiko für HBV bergen, limitiert. In geringer Fallzahl waren zwar schon Nieren HBs-Antigen positiver Spender (HBV-DNA und HBe-Antigen negativ) erfolgreich in anti-HBs positive Patienten transplantiert worden (BERBER et al., 2005), jedoch besteht bei der Verwendung der Organe eines HBs-Antigen positiven Spenders ein Übertragungsrisiko für HBV (LUTWICK et al., 1983; WOLF et al., 1979). Im Gegensatz dazu ist das Risiko für eine HBV-Reaktivierung bei Patienten mit Seromarkern einer durchgemachten HBV-Infektion (HBs-Antigen negativ, anti-HBc positiv, anti-HBs positiv), das kleiner als 5% ist, vergleichsweise gering (KNOLL et al., 2005). Besteht das Risiko einer HBV-Transmission durch Transplantation der Organe eines HBs-Antigen positiven Spenders, wurde deshalb eine kombinierte Prophylaxe mit HBV-spezifischen Immunglobulinen und Virustatika, sowie eine engmaschige Kontrolle der Viruslast vorgeschlagen, um frühestmöglich Zeichen HBV-assoziiierter Komplikationen zu identifizieren (CHUNG et al., 2001). Obwohl das individuelle Risiko einer HBV-Transmission vom Immunstatus des Empfängers beeinflusst wird (TSAI et al., 2010), wurde dabei nicht zwischen immunisierten (nach Impfung oder natürlicher Immunisierung) und nicht-immunisierten Organempfängern unterschieden und dieselbe Therapie für alle Empfänger empfohlen (CHUNG et al., 2001).

Abweichend davon verzichteten Berber et. al bei 4 ihrer 7 anti-HBs positiven Empfänger auf die Gaben von Immunglobulinen und Lamivudin, wenn weder HBV-DNA noch HBe-Antigen bei den HBs-Antigen positiven Spendern nachgewiesen werden konnten. In der größten zwischenzeitlich publizierten Studie war das Outcome von 65 anti-HBs-Antikörper positiven Empfängern, die eine Niere eines HBs-Antigen positiven Spenders erhielten vergleichbar mit

dem der 308 anti-HBs positiven Empfänger, die ein HBs-Antigen negatives Organ erhielten (JIANG et al., 2009). Die Patienten in dieser Studie erhielten alle eine Prophylaxe mit HBV-spezifischen Immunglobulinen, während Lamivudin nur gegeben wurde, falls beim Spender zusätzlich HBV-DNA nachweisbar war. Anhand dieser Kohorte ist es also nicht möglich, den Beitrag der körpereigenen Immunabwehr zur Viruskontrolle von der Effektivität der Prophylaxe zu unterscheiden. Insgesamt gibt es somit Hinweise, dass die sichere Verwendung von HBs-Antigen positiven Spendern für Nierentransplantationen möglich ist. Die klinische Erfahrung mit präemptiven Therapiestrategien bei HBV-immunisierten Empfängern von Organen HBs-Antigen positiver Spender ist dennoch deutlich eingeschränkt.

Im ersten Teil dieser Arbeit wurde der Erfolg einer Transplantation der Nieren einer HBs-Antigen positiven Spenderin in zwei Empfänger mit Seromarkern für eine durchgemachte HBV-Infektion (HBs-Antigen negativ, anti-HBs positiv und anti-HBc positiv) detailliert unter klinischen, virologischen und immunologischen Gesichtspunkten untersucht. Zum Zeitpunkt der Transplantation waren leider keine Angaben zur Viruslast der Spenderin verfügbar. Da beide Empfänger schützende Titer von anti-HBs Antikörpern (HBs-AK > 100 IU/l) aufwiesen, sowie HBV-spezifische CD4 T Zellen nachweisbar waren, wurde von einer ausreichenden Immunkompetenz der beiden Organempfänger gegenüber HBV ausgegangen. So dass angesichts dieser Immunität auf die Gabe HBV-spezifischer Immunglobuline verzichtet wurde und um mögliche Nebenwirkungen oder Medikamenteninteraktionen durch eine prophylaktische, antivirale Medikation zu vermeiden, letztendlich bei beiden Patienten die Entscheidung für ein präemptives Therapiekonzept und gegen eine Prophylaxe mit Lamivudin fiel. Obwohl die Spenderin im Nachhinein positiv auf HBV-DNA getestet worden war, wurde das therapeutische Vorgehen nicht geändert. Eine Interferontherapie schied aufgrund ihrer proinflammatorischen und abstoßungsinduzierenden Wirkung gänzlich aus (KRAMER et al., 1984).

Interessanterweise war eine spezifische HBV-Therapie im gesamten Verlauf nicht notwendig, da beide Patienten weder klinische noch laborchemische Anzeichen einer aktiven HBV-Infektion zeigten. Auch während der kritischen ersten Monate mit initial hoher Immunsuppression waren bei beiden Patienten sowohl die gegen HBV gerichteten Antikörpertiter als auch die Frequenzen HBV-spezifischer CD4 T Zellen stabil. Des Weiteren bewegten sich die Serumkreatininspiegel beider Patienten stets im Zielbereich für eine erfolgreiche Transplantation, mit der einzigen Ausnahme einer akuten Steroid-sensitiven Abstoßungsreaktion in der Frühphase nach Transplantation bei Patientin #2. Die passagere Erhöhung der Immunsuppression blieb wiederum ohne negativen Einfluss auf die Kontrolle

der HBV-Infektion. Sowohl während, als auch nach palliativer Chemotherapie eines Ovarialcarcinoms, an dem Patientin #2 14 Monate nach Transplantation erkrankt war, kam es zu keiner messbaren HBV-Replikation und die Transplantatfunktion blieb bis zu ihrem Tod stabil.

Wie bereits in früheren Studien angenommen wurde, scheint das Vorhandensein schützender Titer von anti-HBs und anti-HBc Antikörpern eine suffiziente spezifische humorale Immunantwort, die die HBV-Replikation kontrolliert, anzuzeigen (GRADY, 1978). Da keine HBV-spezifischen Immunglobuline verabreicht worden waren, waren die gemessenen Antikörpertiter ausschließlich Patienten-eigenen Ursprungs und nicht durch passive Immunisierung verfälscht (SCHMIDT et al., 2012). Die Frequenzstabilität der HBV-spezifischen T Zellen bei fehlender viraler Replikation im Verlauf erinnert an andere persistierende Viren wie CMV, für das ebenfalls stabile Frequenzen spezifischer T Zellen mit einer erfolgreichen Viruskontrolle korrelieren und demgegenüber eine nachweisbare Virusreplikation mit dynamischen Veränderungen der erregerspezifischen T-Zellantwort einhergeht (SESTER et al., 2001; SESTER et al., 2005; SESTER et al., 2008). Entsprechende Veränderungen waren auch bei Patientin #2 während einer Episode messbarer CMV-Replikation zu beobachten.

Wenngleich keine HBV-Reaktivierung beobachtet werden konnte, nehmen wir in Analogie zum CMV-Monitoring an, dass die HBV-spezifischen T-Zellfrequenzen ähnliche Veränderungen bei Zunahme der HBV-Last gezeigt hätten, denn in Abhängigkeit von der immunologischen Kontrolle über die Virusreplikation lassen sich sowohl während der akuten, als auch einer chronischen HBV-Infektion messbare Unterschiede der HBV-spezifischen CD4 T-Zellantwort detektieren. In der longitudinalen Beobachtung eines Patienten mit akuter HBV-Infektion beispielsweise sank die Anzahl zirkulierender HBc-spezifischer CD4 T Zellen vor Erreichen der maximalen HBV-Replikation ab (WEBSTER et al., 2000). Im Gegensatz dazu kann als Ausdruck einer kontrollierten Virusreplikation bzw. erfolgreichen Viruselimination in der akuten Infektionsphase im Rahmen der HBe- und HBs-Serokonversion auch eine Zunahme der HBc-spezifischen CD4 T-Zellfrequenzen detektiert werden (JUNG et al., 1995). Generell kann bei Patienten, deren akute HBV-Infektion ausheilt, eine starke HBV-spezifische CD4 T-Zellantwort nachgewiesen werden (BAUER et al., 2011; FERRARI et al., 1990). Im Gegensatz dazu ist diese bei chronisch erkrankten Patienten, wenn überhaupt nachweisbar, nur schwach ausgeprägt (FERRARI et al., 1990; JUNG et al., 1995). Da die immundominanten Epitope der T-Zellantwort vorrangig im HBc-Antigen lokalisiert sind, ist die Reaktivität gegen HBc-Antigen größer als gegen HBs-Antigen (BAUER et al.,

2011; FERRARI et al., 1990; JUNG et al., 1991). Das T-zelluläre Reaktionsmuster der von uns untersuchten Patienten mit ausgeheilten, länger zurückliegender HBV-Infektion, mit Nachweis von HBe-spezifischen T Zellen in Abwesenheit HBs-spezifischer T Zellen kann vor diesem Hintergrund als Korrelat einer erfolgreichen HBV-Kontrolle nach natürlicher Infektion interpretiert werden.

Die Bedeutung HBV-spezifischer CD4 T Zellen als zentraler Regulator der adaptiven Immunantwort gegen HBV konnte bereits in einem HBV-Infektionsmodell der Maus belegt werden, wonach die Induktion einer HBV-spezifischen CD8 T-Zellantwort, die maßgeblich an der Viruselimination beteiligt zu sein scheint (THIMME et al., 2003), von dem Vorkommen spezifischer CD4 T Zellen abhängt (YANG et al., 2010). Zudem scheint auch die Produktion der Antikörper anti-HBe und anti-HBs strikt T-zellabhängig zu sein (MILICH et al., 1987).

Am Beispiel der hier untersuchten Patienten zeigt sich, dass die HBV-spezifische humorale und zelluläre Immunität trotz immunsuppressiver Therapie nach Nierentransplantation gemessen werden kann. Die gezeigte Stabilität der HBV-spezifischen Immunantwort vor und insbesondere nach Transplantation im Zusammenspiel mit nicht nachweisbarer HBV-Last und dem Fehlen klinischer Symptome scheint Ausdruck einer protektiven Immunität gegenüber HBV zu sein. Methodisch ist es folglich möglich ein Monitoring der HBV-spezifischen patienteneigenen Immunität in ein präemptives therapeutisches Vorgehen zu integrieren.

Auch wenn es mittlerweile leitlinienkonform ist in bestimmten Fällen mit geringem Risiko für HBV-Komplikationen präemptiv, unter Testung auf virale Antigene und der Viruslast, vorzugehen (CORNBURG et al., 2011), sind für die HBV-Infektion die Erfahrungen zur Anwendbarkeit und dem Nutzen eines präemptiven Therapiekonzeptes noch begrenzt. Obwohl zwischenzeitlich zur Überwindung der Organknappheit erfolgreich Nieren HBs-Antigen positiver Spender transplantiert werden konnten (PILMORE, GANE, 2012), besteht Unsicherheit darüber ob diese Patienten prophylaktisch oder präemptiv zu therapieren sind. Eine Erweiterung des präemptiven Monitorings um die Bestimmung von Immunglobulinen oder spezifischen T Zellen, d.h. Messparametern, die es ermöglichen die Immunkompetenz des Patienten gegenüber HBV zu evaluieren, könnte helfen die Sicherheit eines präemptiven Vorgehens zu verbessern.

Ein großes Problem besteht unabhängig davon wann welches therapeutische Vorgehen angewendet werden soll in der Uneinigkeit über die genaue Konzeption prophylaktischer und präemptiver therapeutischer Ansätze: den zu verwendenden Präparaten und der notwendigen

Therapiedauer (HWANG et al., 2011; TSAI et al., 2010). Um abschließend den Nutzen und die Risiken präemptiver Therapiestrategien beurteilen zu können, ist es notwendig prospektive Studien, die prophylaktische und präemptive Therapien vergleichen, mit ausreichenden Patientenzahlen durchzuführen. Dies würde letztendlich auch erlauben, nicht nur den Wert, sondern auch die Praktikabilität einer präemptiven Therapiestrategie bei Transplantationen mit Risiken für HBV-assoziierte Komplikationen bzw. bei Transplantation von Organen HBV-positiver Spender genauer abzuschätzen.

5.2 Monitoring der endogenen Immunsuppression nach Organtransplantation.

Die Gefährdung von Patienten durch infektiöse Komplikationen nach Organtransplantation ist der Preis der immunsuppressiven Medikation, die zur Verhinderung von Abstoßungsreaktionen gegenüber dem Transplantat eingenommen werden muss. Dieser exogenen Immunsuppression stehen die Treg, die als körpereigene, endogene Immunsuppression verstanden werden können (SAKAGUCHI et al., 2008), gegenüber. Es ist wichtig zu wissen, wie diese exogene Immunsuppression mit den Treg wechselwirkt, um diese theoretisch zur Toleranzinduktion gegenüber Transplantaten nutzen zu können (BATTAGLIA, 2010) und folglich die Gabe von Immunsuppressiva mit all ihren unerwünschten Nebenwirkungen einschränken zu können.

Für Nierentransplantatempfänger ist darüberhinaus eine erhöhte Infektanfälligkeit durch die urämische Immundysfunktion, zumindest in der ersten Zeit nach Transplantation, von Bedeutung (BETJES, 2013). Inwieweit die Treg hier quantitativ und funktionell durch die Urämie verändert sind, sollte ebenfalls untersucht werden.

5.2.1 Phänotypische Identifizierung von Treg

Zur Erfassung der Treg-Frequenzen bei niereninsuffizienten Patienten (vor und nach Nierentransplantation) wurde eine vergleichende Färbung der etablierten Treg-Marker CD25, CD127 und Foxp3 (CORTHAY, 2009) im Vollblut von gesunden Kontrollpersonen, Hämodialysepatienten und Nierentransplantierten (min. 1 Jahr nach Transplantation) durchgeführt. Für Gesunde ist eine positive Korrelation zwischen der Expression von Foxp3 und CD25 in CD4 T Zellen beschrieben (RONCADOR et al., 2005; YAGI et al., 2004), wohingegen eine inverse Korrelation zwischen der Expression von Foxp3 und CD127 besteht (LIU et al., 2006; SEDDIKI et al., 2006). Erklären lässt sich dies vor dem Hintergrund, dass der Transkriptionsfaktor Foxp3, der als Regulator der Genexpression in nTreg und Teilen der iTreg verantwortlich ist (FONTENOT et al., 2005b; GEIGER, TAURO, 2012), die

Expression von CD25 (SCOTTA et al., 2008) und CD127 (LIU et al., 2006) auf Transkriptionsebene durch Bindung an die entsprechenden Promotoren kontrollieren kann. Im Falle von CD25 fungiert Foxp3 als Aktivator und bei CD127 als Repressor der Genexpression (ZHENG et al., 2007), so dass die gesteigerte Expression von CD25 und die Reduktion der CD127-Expression als indirektes Maß für die Expression und Aktivität von Foxp3 angesehen werden kann.

Im vorliegenden Versuch bestätigte sich das bekannte Expressionsmuster der Treg-Marker in Form einer linearen und hochsignifikanten Korrelation der Frequenzen CD4⁺CD25⁺ und CD4⁺CD25⁺CD127⁻Foxp3⁺ regulatorischer T Zellen, die nicht nur für gesunde Kontrollen, sondern auch für HD- und NTx-Patienten besteht. Dies zeigt, dass die bekannte Korrelation in der Expression der Treg-Marker unabhängig von der Nierenfunktion und der damit verbundenen Immundysregulation besteht, so dass diese zur Identifizierung von Treg in den verschiedenen Patientenpopulationen genutzt werden können (PRESSER et al., 2009).

5.2.2 Quantitative Analyse der Treg

Im peripheren Blut gesunder Probanden umfassen Treg (CD4⁺CD25⁺) ca. 5-10% aller CD4 T Zellen (BAECHER-ALLAN et al., 2001; HOLM et al., 2004). Passend hierzu konnten im untersuchten Kollektiv gesunder Probanden Frequenzen von 6,44±1,57% CD4⁺CD25⁺CD127⁻FoxP3⁺ Treg gemessen werden. Bei Vergleich dieser Frequenzen mit Hämodialysepatienten und Transplantierten zeigten sich signifikante Unterschiede. Nierentransplantierte Patienten unter Calcineurininhibitor-basierter bzw. Rapamycin-freier Immunsuppression zeigten signifikant weniger Treg als gesunde Kontrollpersonen, was auch in anderen Arbeiten bei Patienten unter Calcineurininhibitor-Therapie beobachtet wurde (BLOOM et al., 2008; SAN SEGUNDO et al., 2006). Demgegenüber fand sich bei HD-Patienten ein signifikant höherer Anteil an Treg als bei gesunden Kontrollpersonen. Ein erhöhter Anteil CD25⁺ CD4 T Zellen findet sich auch bereits in älteren Arbeiten, die vor der Charakterisierung von CD25 als Treg-Marker durch Sakaguchi et al. (SAKAGUCHI et al., 1995) publiziert wurden. Folglich wurden diese Zellen nicht als Treg, sondern vielmehr als proinflammatorische, präaktivierte T Zellen angesehen (BEAURAIN et al., 1989; STACHOWSKI et al., 1991). Hendrixx et al. (HENDRIKX et al., 2009a) zeigten, im scheinbaren Gegensatz dazu dass die absolute Zellzahl der CD4⁺CD25⁺ Treg bei Dialysepatienten geringer ist als bei gesunden Kontrollen, prozentual war hingegen kein signifikanter Unterschied messbar. Interessanterweise war auch bei den hier erhobenen Daten der Unterschied zwischen gesunden Kontrollen und Hämodialysepatienten nicht signifikant, wenn die absolute Zellzahl der Treg/µl Vollblut

verglichen wurde (Daten nicht gezeigt). Dies ist durch die bekannte Lymphopenie-Neigung von Hämodialysepatienten mit Abfall der absoluten Lymphozytenzahlen zu erklären (BETJES, 2013; YOON et al., 2006). Dies beeinflusst vermutlich auch die Ergebnisse der Analyse aus Vollblut isolierten Foxp3-mRNA-Proben, die eine geringere Expression dieses Treg-Markers bei Dialysepatienten im Vergleich zu Gesunden zeigen (ALVAREZ et al., 2009). Dwyer et al (DWYER et al., 2010) untersuchten in einer neueren Arbeit die Frequenzen CD39⁺CD25⁺ Treg. Hier ergab sich kein signifikanter Unterschied zwischen Dialysepatienten und gesunden Kontrollpersonen. Tendenziell lag aber auch hier der prozentuale Anteil an Treg bei terminal niereninsuffizienten Patienten höher als bei Gesunden.

Diese Ergebnisse zeigen, dass es bei der quantitativen Beurteilung der Treg bei Hämodialysepatienten entscheidend ist, welche Bezugsgröße für die Zellen gewählt wird, denn aufgrund der bei Hämodialysepatienten bekannten Lymphopenie kann die absolute Anzahl regulatorischer T Zellen im Vollblut geringer sein als bei Gesunden, wohingegen der relative Anteil unter den vorhandenen Zellen erhöht ist.

In Folgeexperimenten wurde bei der Identifizierung der Treg auf die Verwendung von Foxp3 verzichtet, da durch die hoch signifikante Korrelation der Frequenzen CD4⁺CD25⁺CD127⁻ und CD4⁺CD25⁺CD127⁺Foxp3⁺ Treg kein zusätzlicher Informationsgewinn aus der Färbung von Foxp3 zu erwarten war und ohne dessen Verwendung ein Messkanal mehr bei der durchflusszytometrischen Analyse zur Verfügung steht. Methodisch ist die aufwändigere Färbung von Foxp3 auch nur nach Fixierung der Zellen möglich. Auch das Problem einer tendenziellen Überschätzung der Treg-Frequenzen wird bei der kombinierten Verwendung von CD25, CD127 und Foxp3 nicht gelöst, denn aktivierte, proinflammatorische CD4 T Zellen, die nach ihrer Aktivierung kurzzeitig ihre CD127-Expression (AERTS et al., 2008) verlieren, können neben CD25 (ALLAN et al., 2007) ebenfalls transient Foxp3 (MORGAN et al., 2005; WALKER et al., 2003; WANG et al., 2007) exprimieren, allerdings mit geringerer Intensität als die Treg (ALLAN et al., 2007). Die Bestimmung der subzellulären Lokalisation von Foxp3 (MAGG et al., 2012) sowie die DNA-Methylierung der Treg-spezifischen demethylierten Region (WIECZOREK et al., 2009) können zur eindeutigeren Identifizierung herangezogen werden. Da die auf diese Weise untersuchten Zellen jedoch avital sind, ist diese Technik nicht für funktionelle Analysen von Treg geeignet und wurde daher im Rahmen von funktionellen Analysen nicht angewendet.

5.2.3 Phänotypische Charakterisierung von Treg

In Anbetracht der hier gezeigten unterschiedlichen relativen Treg-Frequenzen bei Gesunden, Dialysepatienten und Nierentransplantierten stellte sich die Frage, ob zwischen den Treg der drei Probandenkollektive phänotypische Unterschiede als Hinweis auf eine zusätzlich veränderte Funktionalität, bestehen. Passend hierzu konnten mit zunehmender Verschlechterung der Nierenfunktion bereits phänotypische Veränderungen der übrigen Leukozytensubpopulationen beobachtet werden (BETJES, 2013). Beispiele hierfür sind Zellpopulationen wie Monozyten, aber auch CD8 T Zellen (LITJENS et al., 2006; ROGACEV et al., 2011).

Zur Bearbeitung dieser Fragestellung wurde Vollblut von gesunden Kontrollpersonen, HD-Patienten und Nierentransplantierten auf das Vorhandensein von Homingmarkern für lymphatisches Gewebe (CD62L, (GRAILER et al., 2009)), Costimulationsfaktoren (CD28, (ACUTO, MICHEL, 2003)), Reifungsmarkern (CD45RO, (CLEMENT, 1992)) und Funktionsmarkern (CD39, welches den Adenosin-vermittelten Suppressionsmechanismus der Treg repräsentiert (MANDAPATHIL et al., 2010)) quantifiziert. CD25⁺CD127⁻ Treg der gesunden Kontrollpersonen waren fast vollständig CD62L⁺ und CD28⁺, zum Großteil CD45RO⁺ und zu etwa 1/3 CD39⁺. Diese Ergebnisse bestätigen die bereits umfangreich durchgeführte Charakterisierungen humaner Treg von gesunden Probanden (LIM et al., 2006; MANDAPATHIL et al., 2009; PETERSON, 2012). Die Treg von Dialysepatienten und Nierentransplantierten sind hingegen bisher nur unzureichend untersucht worden und wenn, liegen lediglich Daten zur Genexpression von Markern wie CTLA-4 oder CCR7 vor (ALVAREZ et al., 2009) allerdings mit den o.g. Einschränkungen in der Befundinterpretation durch die bestehende Lymphopenie, die auch nach Nierentransplantation fortbesteht (BETJES, 2013). Mit Ausnahme der verminderten Expression von CD28 auf den Treg niereninsuffizienter Patienten fanden sich jedoch in den hier durchgeführten Messungen keine Unterschiede in der Expression von CD45RO, CD62L oder CD39 auf den Treg von Gesunden, Hämodialysepatienten und Nierentransplantierten. Diese Beobachtungen wurden im Fall von CD25⁺CD39⁺ Treg ebenfalls durch Dwyer et al (DWYER et al., 2010) bestätigt.

CD62L ermöglicht es T Zellen über hochendotheliale Venolen in sekundär lymphatisches Gewebe zu migrieren (BUTCHER, PICKER, 1996). Damit Treg ihre immunmodulatorische Wirkung entfalten können, ist nachgewiesenermaßen sowohl die Migration der Treg in drainierende Lymphknoten, als auch in den Inflammationsfokus von entscheidender Bedeutung (DING et al., 2012; RUDENSKY, CAMPBELL, 2006). Die Rolle von CD62L für

die Treg-Funktionalität wird dadurch unterstrichen, dass letale akute Graft-versus-Host-Reaktionen nach Stammzelltransplantation im Mausmodell nur durch Cotransfer $CD4^+CD25^+CD62L^+$ Treg unterdrückt werden konnten, nicht aber durch $CD62L^-$ Treg (ERMANN et al., 2005). Folglich sollten Treg von Hämodialysepatienten und Nierentransplantatempfängern gleichermaßen in der Lage in sekundäres lymphatisches Gewebe einzuwandern wie die von Gesunden.

Das Oberflächenmolekül CD45 mit seinen Splicevarianten RA, RB und RO dient als Reifungsmarker für T Zellen, wobei $CD45RO^+$ Zellen den Memorypopulationen angehören (CLEMENT, 1992). Vereinbar mit den hier erhaltenen Messergebnissen berichten Booth et al., dass ca. 80% der Treg bei Gesunden $CD45RO^+$ sind und altersabhängig die Frequenz $CD45RO^+$ Treg zunimmt (BOOTH et al., 2010). Dies betont den Memorycharakter der Treg in allen untersuchten 3 Probandenkollektiven.

CD39 ist eine membranständige Ectonucleotidase, die zusammen mit CD73 am Abbau von extrazellulärem proinflammatorisch wirksamen ATP zu immunsuppressiv wirksamen Adenosin beteiligt ist (BORSELLINO et al., 2007; DEAGLIO et al., 2007; MANDAPATHIL et al., 2010). Humane Treg-Subpopulationen, die aufgrund ihrer CD39-Expression isoliert wurden, zeigten eine stärkere immunsuppressive Wirksamkeit als die konventionell isolierten $CD4^+CD25^+$ Treg (MANDAPATHIL et al., 2009). Die Frequenzen der hochsuppressiven $CD39^+$ Treg-Subpopulation unterschieden sich jedoch bei Gesunden, Hämodialysepatienten und Nierentransplantierten nicht, sodass dieser Mechanismus der Immunregulation potenziell auch den Treg niereninsuffizienter Patienten zur Verfügung steht.

CD28 gilt als Costimulationsfaktor für die T-Zellaktivierung (ACUTO, MICHEL, 2003; HUNIG et al., 2010), scheint aber auch bei fehlender Aktivierung des T-Zellrezeptors mechanistisch an der peripheren Toleranzinduktion (SCOTTA et al., 2008) und darüber hinaus an der Treg-Differenzierung beteiligt zu sein (SALOMON et al., 2000). Eine Reduktion der CD28-Expression auf CD4 und CD8 T Zellen ist im Rahmen der Immunseneszenz in Assoziation mit einer CMV-Infektion zu beobachten (DERHOVANESSIAN et al., 2009; DIRKS et al., 2013). Bei CMV-seropositiven Dialysepatienten scheint der Anteil $CD28^-$ CD4 T Zellen zudem 5-fach höher zu sein als bei gesunden CMV-seropositiven Kontrollpersonen (BETJES et al., 2008). In den vorliegenden Untersuchungen wurde der CMV-Status der einzelnen Probanden nicht erhoben. Worauf die hier festgestellte verminderte CD28-Expression auf den Treg der niereninsuffizienten Patienten beruht, kann nicht differenziert werden. Sie könnte lediglich den Effekt einer

höheren CMV-Prävalenz in diesen beiden Patientengruppen widerspiegeln oder ein Korrelat einer beeinträchtigten Treg-Funktionalität und- Differenzierung darstellen.

Zusammenfassend zeigen die Treg von niereninsuffizienten Patienten (Dialysepatienten und Nierentransplantatempfänger) mit Ausnahme der veränderten Expression von CD28 demnach eine vergleichbare phänotypische Zusammensetzung wie die von gesunden Kontrollen. Im Gegensatz dazu ist die Expression der untersuchten Marker auf den nicht-regulatorischen T-Zellpopulationen im Vergleich zu Gesunden deutlich heterogener ((LITJENS et al., 2006) bzw. Daten nicht gezeigt).

5.2.4 Funktionelle Charakterisierung von Treg

Um letztlich überprüfen zu können, ob die Treg niereninsuffizienter Patienten unter der Einwirkung der Urämietoxine in ihrer immunregulatorischen Wirksamkeit beeinträchtigt sind, wurde eine funktionelle Charakterisierung der Treg durchgeführt.

Dazu wurde bei Hämodialysepatienten die Zytokinproduktion von Responder T Zellen nach Superantigenstimulation in An- und Abwesenheit der Treg im Vollblutmilieu untersucht. Hier zeigte sich im Vergleich zu Gesunden, dass die Depletion von Treg und somit ihrer inhibitorischen Wirkung auf die T Zellen von Hämodialysepatienten nicht zu einer gesteigerten Zytokinproduktion der T Zellen führte, was auf eine eingeschränkte Funktionalität der in höheren Frequenzen vorkommenden Treg schließen lässt. Die beeinträchtigte Funktionalität der Treg scheint dabei aber nicht nur die Treg-vermittelte Inhibition der T-zellulären Zytokinproduktion zu betreffen, sondern auch die Proliferationshemmung von Responder Zellen durch die Treg scheint kompromittiert zu sein. (HENDRIKX et al., 2009a; MEIER et al., 2009).

Die funktionelle Charakterisierung regulatorischer T Zellen nierentransplantierte Patienten war bereits von der Arbeitsgruppe durchgeführt worden. Durch die Depletion der Treg kann bei diesen Patienten ein Anstieg der Effektor T-Zellreaktivität beobachtet werden. Dieser Frequenzanstieg fiel im Vergleich zu gesunden Kontrollpersonen jedoch geringer aus. Ob diese Beobachtung lediglich auf den niedrigeren Treg-Frequenzen der Nierentransplantatempfänger unter einer Calcineurininhibitor-basierten Immunsuppression beruht, oder ob die wenigen Treg ebenfalls in ihrer Funktionalität beeinträchtigt sind, kann nicht differenziert werden (PRESSER et al., 2009). Festgestellt werden kann allerdings, dass die gestörte Treg-Funktionalität terminal niereninsuffizienter dialysepflichtiger Patienten nach Nierentransplantation und konsekutiver Verbesserung der Nierenfunktion zumindest partiell

reversibel ist. Ähnliche Beobachtungen über die Reversibilität urämiebedingter Immundysregulationen konnten bereits bei der Funktionalität von neutrophilen Granulozyten und dendritischen Zellen gemacht werden (BETJES, 2013).

Was nun ursächlich für die gestörte Treg-Funktionalität von Hämodialysepatienten ist, bedarf weiterer Untersuchungen. Die Ergebnisse der phänotypischen Charakterisierung weisen jedoch darauf hin, dass sie nicht auf einer veränderten Expression von CD62L, CD45RO oder CD39 beruht. Die Bedeutung der verminderten CD28-Expression der Treg, die Ursache oder Folge der urämischen Immundysregulation terminal niereninsuffizienter Patienten sein könnte konnte im zeitlichen Rahmen dieser Arbeit nicht weiter verfolgt werden und soll Thema eines Folgeprojektes sein.

5.2.5 Einfluss von Immunsuppressiva auf die Treg nach Nierentransplantation

Unterschiedliche Regime einer immunsuppressiven Therapie nach Nierentransplantation beeinflussen die Frequenzen peripher zirkulierender Treg in unterschiedlichem Maße: Calcineurininhibitoren führen, wie auch hier gezeigt werden konnte, zu einer Frequenzreduktion (PRESSER et al., 2009; SAN SEGUNDO et al., 2006; SEGUNDO et al., 2006), wohingegen der mTOR-Inhibitor Rapamycin eine Expansion der Treg-Population erlaubt (HENDRIKX et al., 2009b). Es stellt sich jedoch die Frage, ob die eingesetzten Immunsuppressiva nicht nur quantitative Veränderungen in der Treg-Population induzieren, sondern auch eine unterschiedliche Beeinflussung der Funktionalität beobachtet werden kann. Die von Presser et al (PRESSER et al., 2009) beobachtete verminderte Effektivität einer Treg-Depletion bei nierentransplantierten Patienten unter einer Calcineurininhibitor-basierten Kombinationstherapie könnte nicht nur auf den geringeren Treg-Frequenzen beruhen, vielmehr könnte auch eine Inhibition der Treg durch den Calcineurininhibitor zu einer funktionellen Treg-Hemmung führen, sodass nach mechanischer Depletion der dysfunktionellen Zellen nur eine geringe Veränderung der Effektor T-Zellfunktion detektiert werden kann.

Um die Wirkung der einzelnen immunsuppressiven Wirkstoffe auf die Treg ohne Einfluss der Effekte einer urämischen Immundysregulation untersuchen zu können, wurden in vitro Experimente mit Zellen gesunder Probanden durchgeführt. Unter den üblicherweise durchgeführten experimentellen Bedingungen mit isolierten Blutzellen und Kulturmedien ist es jedoch schwierig physiologische Konzentrationen der Medikamente nachzuempfinden, da deren physiologische Bindungspartner (Albumin und Erythrozyten) des Vollblutes fehlen. Daher wurde in dieser Arbeit ein Vollblutsystem etabliert, in dem die Wirkung der Treg unter

möglichst physiologischen Bedingungen unter Zugabe der Immunsuppressiva in klinisch relevanten Wirkspiegeln untersucht werden kann.

Bisherige Assays zur Messung von Treg-Effekten nutzen die Suppression der Proliferation von Responder T Zellen durch Treg als Messparameter und weisen gewisse Nachteile auf (MCMURCHY, LEVINGS, 2012). So ist (i) die Isolierung von PBMC zur Anlage von Zellkulturen und (ii) oftmals die überproportionale Zugabe von Treg zu den Effektor T Zellen erforderlich, um valide Ergebnisse messen zu können. Die gemessenen Effekte unter diesen eher unphysiologischen Treg:T Responderzell-Verhältnissen sind dann eventuell in vivo aber gar nicht von Bedeutung. Zudem sind (iii) diese Systeme anfällig für Fehlinterpretationen da sich bei langen Inkubationszeiten Effekte der Suppression mit Effekten von Apoptose überlagern können. Auch spielt (iiii) die Messmethode zur Detektion der Proliferation (^3H -Thymidin, CFSE) eine Rolle und ist methodisch wiederum anfällig für Fehlinterpretationen, was sowohl zur Über- als auch Unterschätzung der inhibitorischen Wirkung der Treg führen kann. Daher bestand das Ziel dieser Arbeit darin, einen Assay zu etablieren, der auf die Zugabe von Treg in supraphysiologischen Konzentrationen verzichtet und sich von der Proliferationshemmung als Messparameter lösen kann. Letzteres war auch wichtig, um die Wirkung der Treg auf die frühe Phase der T-Zellaktivierung untersuchen zu können.

5.2.6 Etablierungsarbeiten zur Treg-Depletion aus Vollblut

Um Treg einfach und möglichst umfangreich erfassen zu können, wurde CD25 als Zielmolekül für die Depletion gewählt, auch wenn aktivierte proinflammatorische T Zellen ebenfalls depletiert würden. Etablierte Protokolle, die säulenbasierte Systeme zur Positivselektion von Treg verwenden, erfordern die Isolation von PBMC aus relativ großen Blutvolumina (DIECKMANN et al., 2001), so dass diese Systeme für eine Depletion und funktionelle Untersuchung im Vollblutmilieu gänzlich ausschieden. Die Wahl fiel deshalb auf eine säulenunabhängige magnetbasierte Depletionsmethode. Dazu wurde das in der Arbeitsgruppe etablierte und bereits zur funktionellen Charakterisierung der Treg bei nierentransplantierten und Dialysepatienten eingesetzte Protokoll genutzt und optimiert (PRESSER et al., 2009). Frühere Versuche hatten bereits gezeigt, dass lösliche IL2-Rezeptoren (BIEN, BALCERSKA, 2008), welche CD25 (α -Kette des Rezeptors) enthalten, zuvor aus dem Plasma entfernt werden müssen, damit diese nicht die Bindungsstellen der Beads absättigen, bevor sie mit den Treg interagieren können. In der vorliegenden Arbeit wurden diese Wasch- und Depletionsschritte optimiert.

Im Rahmen dessen empfiehlt sich Natriumheparin im Überschuss als Antikoagulanzen. Die Waschmedien für den ersten Waschschrift können zusätzlich in niedriger Konzentration Calciumkomplexbildner (EDTA) enthalten, solange diese in den Folgeschritten wieder ausgewaschen werden. Unverändert wurde um die Viskosität der Proben zu senken und eine bessere Durchmischbarkeit mit den Beads zu ermöglichen anschließend eine 1:1 Verdünnung mit RPMI-0,5% HSA hergestellt. Aus diesem Ausgangsmaterial lassen sich stabil fast 95% der regulatorischen T Zellen depletieren, ohne andere T-Zellpopulationen wesentlich zu beeinflussen. Treg-Isolate, die mittels säulenabhängiger magnetbasierter Methoden gewonnen werden, haben meist eine Reinheit von etwa 95% und weisen somit vergleichbare Effizienz auf. Um diese Reinheiten allerdings zu erreichen sind regelhaft zwei Säulentrennschritte erforderlich (DIECKMANN et al., 2001; OBERG et al., 2006). Zudem bergen diese Depletionsansätze die Gefahr, dass es durch die Matrix der Säulen zu unspezifischen Aktivierungen der enthaltenen Zellpopulationen kommen kann, weshalb bei Verwendung dieser Prozeduren eine anschließende Ruhephase für die Zellen empfohlen wird (MCMURCHY, LEVINGS, 2012). Im dem hier optimierten Protokoll zur Treg-Depletion aus Vollblut ist allein die Kontaktzeit zu den Beads maßgeblich für unspezifische Wirkungen. Der Kontakt zu den Oberflächen der Säulenmatrix entfällt, da durch Verwendung von extern an das Röhrchen angebrachter Magnete komplett auf Säulen verzichtet werden kann.

Als kritisch stellte sich im Vollblutprotokoll aber ein möglicher Verlust antigenpräsentierender Monozyten im Rahmen der Depletion dar. In vielen in vitro Assays dienen Monozyten oder daraus differenzierte dendritische Zellen als potente antigenpräsentierende Zellen (SALLUSTO, LANZAVECCHIA, 1994; SATPATHY et al., 2012). Der starke Verlust von Monozyten und neutrophilen Granulozyten wirkte sich nachteilig auf die Stimulierbarkeit der Effektor T Zellen aus. Um eine unspezifische Monozytenaktivierung zu verhindern erwiesen sich zunächst einfache Maßnahmen wie Lagern und Arbeiten mit den Proben auf Eis als hilfreich. Als problematisch stellten sich aber der hohe Eisengehalt der Beads und die lange Kontaktzeit mit den Beads dar. In der durchgeführten Beadtitation zeigte sich, dass der Monozytenverlust dosisabhängig ist und somit Beads möglichst niedrig dosiert werden sollten. Freigesetztes Eisen, das von den Monozyten phagozytiert wird, könnte zu unspezifischer Zellaktivierung, Komplementaktivierung und Monozytenverbrauch führen (SONNWEBER et al., 2011; WARD et al., 2011).

Um weitere unspezifische Effekte der Beads in den Kontrollproben nachzuempfinden, wurden diese durch Zugabe von Beads, die mit Antikörpern gegen murines CD4 beladen sind

scheindepletiert. Diese mock-Beads können aufgrund des fehlenden Antigens im humanen Proben keine Zellen depletieren. Die Relevanz der Scheindepletion zeigte sich daran, dass diese mock-Beads im Vergleich zu lediglich mit Lösungsmittelbehandelten Proben ebenfalls zu einem Monozytenverlust führten, welcher tendenziell etwas geringer war als bei α -CD25 Beads (Daten nicht gezeigt). Diese Ergebnisse zeigen, dass in Experimenten, bei denen der Treg-Effekt indirekt durch den Vergleich von depletierten zu nicht depletierten Proben nachgewiesen wird, auch die Kontrollproben einer Scheinbehandlung unterzogen werden müssen. Da bei den Herstellern von α -CD25-Beads keine entsprechenden Isotyp-Kontroll-Beads angeboten werden, könnten publizierte Arbeiten zu Treg diese Schwäche aufweisen. Dies sollte bei der Interpretation von Daten zur Wirkung von Treg berücksichtigt werden. Die Auswahl einer suffizienten Kontrollprobe betonen auch McMurchy et al. (MCMURCHY, LEVINGS, 2012) ausdrücklich, um valide Ergebnisse zu produzieren.

Aufgrund des methodisch bedingten weiterhin noch bestehenden Monozytenverlustes wurde in allen folgenden Experimenten der Monozytengehalt nach Depletion und Scheindepletion gemessen und es wurden alle Proben ausgeschlossen, die einen Monozytenverlust von über 50% im Vergleich zur Vergleichskonzentration aufwiesen, denn auch durch Mangel an antigenpräsentierenden Zellen kann die T-Zellreaktivität eingeschränkt sein, so dass der Effekt der Treg-Depletion in dem sich daran anschließenden Assay unterschätzt würde.

5.2.7 Funktionelle Charakterisierung von Treg bei Gesunden

Basierend auf Protokollen der Arbeitsgruppe zur Vollblutstimulation diente als Messsystem zur funktionellen Analyse der Treg die Zytokinproduktion von Effektor T Zellen nach Superantigenstimulation in An- und Abwesenheit von Treg (SCHMIDT, SESTER, 2013). Die Etablierung des Protokolls erfolgte bei gesunden Kontrollpersonen. Auf die Zugabe costimulatorischer Antikörper wurde verzichtet, um den Effekt der Treg durch eine unphysiologische Costimulation nicht zu überlagern. Aufgrund der vorgeschalteten Waschschriffe hatte sich schon in Vorarbeiten gezeigt, dass die Stimulationszeit zur Reequilibrierung der Zellen von 6 auf 18 Stunden verlängert werden sollte (Daten nicht gezeigt). Das nach dem letzten Waschschriffe zugegebene autologe Plasma diente zum einen als Nährmedium, zum anderen wurden den Zellen dadurch die physiologischen, humanen Plasmaproteine zur Verfügung gestellt und kein xenogenes Fremdmaterial in die Proben eingebracht. Durch Vergleich einer scheindepletierten Probe, die auf T-Zellebene physiologisch zusammengesetzt ist, mit einer Treg-depletierten Probe, in der der inhibitorische Effekt der Treg fehlt, konnte der inhibitorische Einfluss der Treg auf die

Zytokinproduktion der Effektorzellen in der frühen Phase der T-Zellaktivierung gemessen werden. Mit diesem Protokoll war in Vollblutproben nach einer Stimulationsdauer von nur 18 Stunden ein Treg-Effekt detektierbar, der sich in den depletierten Proben in Form eines Anstiegs der SEB-Reaktivität der CD8 T Zellen gemessen anhand ihrer IFN γ -Produktion zeigte. Dieser im Gegensatz zur publizierten Literatur eher schwach ausgeprägte Effekt ist nicht direkt mit bisherigen publizierten Ergebnissen mit isolierten PBMC zu vergleichen (MCMURCHY, LEVINGS, 2012; OBERLE et al., 2007), da zuvor neben dem in der Arbeitsgruppe etablierten Protokoll (PRESSER et al., 2009) alternativ kein Vollblut-Assay zur Verfügung stand und klassische Assays zur Detektion der Treg-vermittelten Immunsuppression auf T Zellen als Messparameter nur die Inhibition der Proliferation maßen (THORNTON, SHEVACH, 1998) und nur selten die Treg-vermittelte Inhibition der Zytokinproduktion untersucht wurde (ALLAN et al., 2007; CANAVAN et al., 2012). Dass im Rahmen der Depletion aktivierte proinflammatorische CD25⁺ T Zellen (ALLAN et al., 2007), die zu den Effektor-Zellen gehören, ebenfalls entfernt werden und in umgekehrten Versuchsaufbauten so zu Verunreinigungen in Treg-Isolaten führen (BAECHER-ALLAN et al., 2001), könnte eine Erklärung dafür liefern, warum bei einer geringen Probandenzahl (n=9) zwar ein Treg-Effekt auf die CD8 T Zellen gemessen werden konnte, aber auf Ebene der CD4 T Zellen kein statistisch signifikanter Anstieg der Reaktivität durch die Treg-Depletion festgestellt werden konnte. Hervorzuheben ist zudem, dass auf die Zugabe supraphysiologischer Treg-Konzentrationen verzichtet wurde. Der Anteil der Treg an den CD4 T Zellen lag im Mittel bei 4,14% in den scheindepletierten Proben, was einer Treg:CD4 T-Responderzell-Ratio von ca. 1:25 entspricht, dies entspricht auch den Empfehlungen von McMurchy et al., die sich für eine Ratio \leq 1:16 im Proliferationsassay aussprechen, um in vivo relevante Effekte messen zu können (MCMURCHY, LEVINGS, 2012). Dass trotz der gleichen Probandenzahl wie bei Presser et al. (PRESSER et al., 2009) kein signifikanter Frequenzanstieg SEB-reaktiver CD4 T Zellen durch die Treg-Depletion beobachtet werden konnte, kann Zufall sein oder durch die Protokollmodifikationen oder die Einwirkung von Ethanol mitbedingt sein. Dies weist klar darauf hin, dass Methoden zur Untersuchung von Treg-Effekten auf Responderzellen schwierig durchzuführen und fehleranfällig sind. Mit dem modifizierten Protokoll ist es jedoch gelungen ein Milieu zu schaffen, das durch Zugabe der autologen Plasmabestandteile dem Vollblutmilieu, noch physiologischer nachempfunden ist und die Dosierung der Immunsuppressiva in physiologisch relevanten Konzentrationen erleichtert. Damit wurde eine Grundlage geschaffen, um die Wirkung einzelner

Immunsuppressiva auf Treg in physiologisch relevanten Konzentrationen untersuchen zu können.

5.2.8 Wirkung von Immunsuppressiva auf die Funktionalität von Treg

Tierexperimentelle Studien zum Einsatz von Treg als Toleranzinduktoren sind vielversprechend und beschäftigten sich initial im Mausmodell mit der Bedeutung der Treg bei Graft-versus-Host-Erkrankungen oder der Toleranzinduktion gegenüber Hauttransplantaten (BATTAGLIA, 2010). Im weiteren Verlauf folgten Untersuchungen in humanisierten Mausmodellen. So konnte nach Transplantation humaner Arterien in Mäuse durch die Behandlung mit humanen Treg das Auftreten einer Transplant-Arteriosklerose, die in allen soliden Organtransplantaten auftreten kann und zur chronischen Organdysfunktion beiträgt, verhindert werden (NADIG et al., 2010). Um eine gezielte Toleranzinduktion gegenüber dem Transplantat zu ermöglichen wurde in der Folge ein Protokoll zur Anreicherung alloantigen-spezifischer humaner Treg etabliert und im Mausmodell mit humanen Hauttransplantaten erfolgreich getestet (SAGOO et al., 2011). Zwischenzeitlich gab es auch erste Studien zum Treg-Transfer bei Stammzell-transplantierten Patienten (BATTAGLIA, 2010). So konnten Treg zur Verhinderung von Graft-versus-Host-Erkrankungen bei haploidentischen Stammzelltransplantationen beitragen (DI IANNI et al., 2011). Ein indirekter Hinweis auf die Relevanz der Treg nach solider Organtransplantation ist die Tatsache, dass Nierentransplantierte ohne Abstoßungsreaktionen höhere Frequenzen peripher zirkulierender Treg besitzen als Patienten, die unter Abstoßungsreaktionen leiden (KREIJVELD et al., 2008).

Da es aktuell nicht vorstellbar ist solide Organtransplantationen ohne immunsuppressive Therapie durchzuführen, ist es entscheidend die Wirkung dieser Medikation auf die Treg zu kennen, um Treg als therapeutisches Mittel zur Toleranzinduktion gegenüber den Organtransplantaten oder zur Therapie von akuten oder chronischen Abstoßungsreaktionen einzusetzen zu können (BATTAGLIA, 2010; SCHLIESSER et al., 2012). Eine Treg-antagonisierende Medikation würde den therapeutischen Nutzen einer Treg-Therapie nachteilig beeinflussen.

Generell stehen bislang nur begrenzt Daten zur Verfügung, die die Wirkung von Immunsuppressiva auf humane Treg charakterisieren (DE SERRES et al., 2009; DEMIRKIRAN et al., 2008; WEKERLE, 2008). Zumeist stammen diese aus Zellkulturexperimenten, in denen die Treg-Wirkung als Hemmung der Responderzellproliferation (z.B. Alloreaktivität bei gemischter Lymphozytenreaktion) erfasst

wird (KARAGIANNIDIS et al., 2004; MIROUX et al., 2009; MIROUX et al., 2012a; MIROUX et al., 2012b; PRADO et al., 2011; SEISSLER et al., 2012). Tierexperimentelle Daten wurden häufig im Mausmodell erhoben und umfassen auch in vivo Untersuchungen (DEMIRKIRAN et al., 2008; KAWAI et al., 2005; LIM et al., 2007; WANG et al., 2006; ZEISER et al., 2006), sind aber nur in bedingtem Maße auf den Menschen übertragbar.

Im hier etablierten Vollblutassay ergaben sich hinsichtlich der inhibitorischen Treg-Wirkung auf die frühe Phase der T-Zellaktivierung folgende Ergebnisse: Unter Therapie mit Prednisolon und Cyclosporin bleibt die Treg-Funktionalität erhalten, wohingegen sie unter Supplementierung von Tacrolimus verloren geht. Interessanterweise haben die beiden Calcineurininhibitoren unterschiedliche Auswirkungen auf die Treg-Funktionalität, obwohl beide Wirkstoffe nach solider Organtransplantation mit einem Abfall der Treg-Frequenzen assoziiert sind (BLOOM et al., 2008; PRESSER et al., 2009; SAN SEGUNDO et al., 2006).

Passend zu den hier gezeigten Daten konnte für Glucokorticoide gezeigt werden, dass murine und humane Treg in ihrer Funktionalität durch diese Wirkstoffgruppe nicht inhibiert werden (DEMIRKIRAN et al., 2008; LIM et al., 2007; MIROUX et al., 2012b). So wurde sogar eine stärkere Inhibition der Responder T-Zellproliferation durch die Treg von Hochdosis-Glucokorticoide behandelten Patienten beobachtet (XU et al., 2009). Unter Steroidbehandlung kann zudem eine Induktion der Expression von Foxp3 in CD4 T Zellen beobachtet werden. Dies ist sowohl in vitro als auch in vivo bei Asthmatikern unter inhalativer oder systemischer Steroidtherapie (KARAGIANNIDIS et al., 2004) wie auch bei Patienten mit Multipler Sklerose nach Hochdosis-Steroidtherapie zu beobachten (XU et al., 2009). So können Glucokorticoide theoretisch sogar zur Induktion von iTreg beitragen (KARAGIANNIDIS et al., 2004). Dies äußert sich bei nierentransplantierten Patienten, die eine niedrigdosierte Methylprednisolon-Stoßtherapie zur Behandlung akuter Abstoßungsreaktionen erhalten, in einem passageren Frequenzanstieg HLA-DR⁺ Treg (SEISSLER et al., 2012), einer Treg-Subpopulation für die zuvor gezeigt worden war, dass sie über eine hohe immunsuppressive Wirkung verfügt (SCHAIER et al., 2012). Jedoch scheint die Dexamthason-vermittelte Induktion einer Foxp3-Expression nicht zwingend mit einer Zunahme der immunsuppressiven Wirkung der Treg vergesellschaftet zu sein (PRADO et al., 2011).

Für Calcineurininhibitoren wird generell angenommen, dass sie die Treg in ihrer immunmodulatorischen Wirksamkeit nachteilig beeinflussen, denn die Bildung von Interleukin 2, das die Treg für ihre Induktion und Homöostase benötigen (D'CRUZ, KLEIN, 2005; FONTENOT et al., 2005a; ZEISER et al., 2006), wird durch Calcineurininhibitoren

gehemmt (HAMAWY, 2003; NISHIYAMA et al., 2005). Insgesamt ist die Datenlage, die die Wirkung von Calcineurininhibitoren auf Treg untersucht, jedoch nicht sehr umfangreich (DEMIRKIRAN et al., 2008) und weist zusätzliche methodische Einschränkungen auf, die die Interpretation und Vergleichbarkeit der Daten erschweren. Die Induktion einer Foxp3-Expression in Treg wird durch CyA und Tacrolimus in vitro gehemmt (BAAN et al., 2005; ZEISER et al., 2006), so dass die Differenzierung von iTreg nicht begünstigt zu werden scheint. Dies könnte im Langzeitverlauf nach Transplantation zu den geringeren Treg-Frequenzen unter einer Calcineurininhibitor-basierten Therapie (PRESSER et al., 2009; SEGUNDO et al., 2006) beitragen. Im Herztransplantationsmodell der Ratte scheint Cyclosporin A interessanterweise dosisabhängig eine differentielle Wirkung auf die Induktion Donor-spezifischer Treg zu haben. So erlaubt eine geringe Dosierung von Cyclosporin A nach Herztransplantation die Treg-Induktion wohingegen eine hohe Dosierung diese nicht ermöglicht (KAWAI et al., 2005). Die Proliferation humaner Treg wird in vitro durch Cyclosporin A und Tacrolimus gehemmt (LIM et al., 2007; MIROUX et al., 2012a). Die Daten zur Funktionalitätsanalyse der regulatorischen T Zellen unter Zusatz von Cyclosporin A sind hingegen widersprüchlich. Es wird sowohl über eine erhaltene Funktionalität muriner Treg berichtet (LIM et al., 2007) als auch über eine eingeschränkte Treg-Funktionalität unter Cyclosporin A (WANG et al., 2006; ZEISER et al., 2006). Bei der Betrachtung der Funktionalität humaner Zellen in einer gemischten Leukozytenreaktion zeigte sich unter niedrig dosierter Cyclosporin A-Supplementierung (40 ng/ml) eine Beeinträchtigung der Treg-Funktion, wohingegen bei höheren Dosen (400 ng/ml) ein suppressiver Effekt der Treg nachweisbar war (MIROUX et al., 2009; MIROUX et al., 2012a). Der dafür verantwortliche Signalweg scheint aber nicht Calcineurin abhängig zu sein (MIROUX et al., 2012a). Im hier untersuchten Vollblutmilieu war die Treg-Funktionalität unter einer CyA-Konzentration von 350 ng/ml ebenfalls erhalten. Unter Einwirkung von Tacrolimus im Vollblutmilieu war es dahingegen nicht möglich einen Effekt der Treg-Depletion auf die Zytokinproduktion der Effektor T Zellen zu detektieren. Durch die hohe Wirkpotenz von Tacrolimus könnte entweder die medikamentöse Inhibition der Responder T-Zellaktivität so hoch sein, dass trotz Depletion funktionaler Treg keine messbaren Unterschiede entstehen. Alternativ könnten die Treg und Effektor T Zellen gleichermaßen durch den Wirkstoff gehemmt werden, so dass eine Depletion dysfunktionaler Treg keine Auswirkungen auf die Reaktivität der Responderzellen hat. Die untersuchte Konzentration entsprach mit 20 ng/ml der mittleren Konzentration im Tagesverlauf. Vergleichbare Daten zur Untersuchung der Beeinflussbarkeit der Treg-Funktionalität durch Tacrolimus gibt es kaum. Miroux et al. konnten in einer

gemischten Leukozytenreaktion unter Supplementierung mit Tacrolimus im Gegensatz dazu keine Hemmung der humanen Treg-Aktivität auf die Responderzellproliferation beobachten (MIROUX et al., 2012a).

Um Treg als Therapietarget oder Therapeutikum für nierentransplantierte Patienten nutzen zu können (BATTAGLIA, 2010), müssen neben den üblichen Überlegungen zu Therapiesicherheit und Wechselwirkungen mit Immunsuppressiva auch die durch Einwirkung der Urämietoxine bei terminal niereninsuffizienten Patienten entstehende erworbene urämische Immundysfunktion, die nach Transplantation und konsekutiver Verbesserung der Nierenfunktion nur partiell reversibel ist (BETJES, 2013), berücksichtigt werden. Diese Immunschwäche scheint auch Auswirkungen auf die Treg zu haben. Zwar können die etablierten Marker zur Identifizierung von Treg CD25, CD127 und Foxp3 angewendet werden, jedoch ist der relative Anteil der Treg an den CD4 T Zellen bei den lymphopenen Dialysepatienten erhöht und sinkt nach Transplantation dauerhaft unter einer Calcineurininhibitor-basierten Therapie ab. Wesentliche phänotypische Unterschiede mit Ausnahme einer verminderten CD28-Expression als Hinweis auf eine veränderte Treg-Funktionalität ließen sich zwar nicht detektieren, jedoch ist die Funktionalität der Treg terminal niereninsuffizienter Patienten kompromittiert. Eine eingeschränkte Treg-Funktionalität nach Nierentransplantation kann also nicht nur Folge der immunsuppressiven Medikation sein, sondern kann auch Folge irreversibler Urämie-bedingter Dysregulationen der Treg-Funktionalität. So ist es nicht nur wichtig den Effekt von Immunsuppressiva auf Treg gesunder Probanden zu kennen, sondern Untersuchungen sollten auch auf die Treg terminal niereninsuffizienter Patienten ausgeweitet werden, um diese Patienten durch die Wahl geeigneter Immunsuppressiva letztlich optimal therapieren zu können. Auch ist es wichtig die Wirkung von Kombinationstherapien auf die Treg-Population zu kennen, da sie den aktuellen Therapiestandard darstellen. Im Gegensatz zu Medikamenten mit einer bekannten Halbwertszeit und absehbarer Wirkstoffelimination, ist eine Einschätzung des Langzeiteffektes einer therapeutischen Manipulation von Treg derzeit noch nicht möglich. Folglich sind noch weitere Untersuchungen insbesondere in vivo Studien in tierexperimentellen Modellen notwendig, um Treg zukünftig erfolgreich als Therapietarget oder Therapeutikum zur Toleranzinduktion gegenüber soliden Organtransplantaten nutzen zu können.

6 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1 Natürliche Verläufe einer HBV-Infektion.....	12
Abbildung 2 Auswertstrategie durchflusszytometrischer Messungen am Beispiel der Identifizierung regulatorischer T Zellen	39
Abbildung 3 Nieren- und Leberfunktion nach Nierentransplantation.....	46
Abbildung 4 CMV-spezifisches Immunmonitoring als präemptives Therapiekonzept	48
Abbildung 5 HBV-spezifische Antikörpertiter beider Organempfänger.....	49
Abbildung 6 HBV-spezifisches Immunmonitoring.....	50
Abbildung 7 Durchflusszytometrische Detektion von Treg anhand von CD25, CD127 und Foxp3	52
Abbildung 8 Korrelation der Frequenzen von CD4 ⁺ CD25 ⁺ mit CD4 ⁺ CD25 ⁺ Foxp3 ⁺ CD127 ⁻ Treg.....	53
Abbildung 9 Treg-Frequenzen im Vollblut.....	54
Abbildung 10 Anteil CD39 ⁺ Treg	55
Abbildung 11 CD62L-Expression auf Treg	56
Abbildung 12 CD45RO-Expression regulatorischer T Zellen	57
Abbildung 13 CD28-Expression auf Treg.....	58
Abbildung 14 Funktionelle Charakterisierung von Treg.....	60
Abbildung 15 Treg-Frequenzen und SEB-Reaktivität in Abhängigkeit von den verwendeten Antikoagulantien	63
Abbildung 16 Monozytenverlust im Rahmen der Depletion CD25 ⁺ Zellen	65
Abbildung 17 Titration der α -CD25-Beads zur Treg-Depletion	66
Abbildung 18 Treg-Depletion bei Gesunden nach optimiertem Protokoll.....	69
Abbildung 19 Differentielle Beeinflussbarkeit der Treg-Funktionalität durch Immunsuppressiva	70

7 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1 Ergebnisse der HBV-Diagnostik im Krankheitsverlauf	13
Tabelle 2 Verwendete Materialien und Geräte.....	23
Tabelle 3 Benötigte Reagenzien.....	24
Tabelle 4 Getestete Immunsuppressiva.....	25
Tabelle 5 Beads für die Depletionsexperimente.....	26

Tabelle 6 Fluorochrom-gekoppelte monoklonale Antikörper für durchflusszytometrische Färbungen.....	26
Tabelle 7 Zur T-Zellstimulation eingesetzte Antigene und Costimulantien	27
Tabelle 8 Benötigte Lösungen	28
Tabelle 9 Charakterisierung der Organspenderin und den beiden Empfängern der Nierentransplantate.....	30
Tabelle 10 Charakteristika der gesunden Kontrollpersonen, Dialyse- und nierentransplantierten Patienten.....	31
Tabelle 11 Vergleich von Hersteller- und Ausgangsprotokoll zur Depletion CD25 ⁺ T Zellen.....	34
Tabelle 12 Antikörpermischung zur phänotypischen Charakterisierung von Treg im Vollblut.....	40
Tabelle 13 Färbemischung der Depletionskontrolle.....	41
Tabelle 14 Antikörpermischung zur Färbung der Treg-Oberflächenmarker.....	42
Tabelle 15 Zusammensetzung der Antikörperfärbemischung nach Antigenstimulation.....	43
Tabelle 16 Getestete Waschprozeduren vor Depletion der Treg.....	64
Tabelle 17 Optimiertes Depletionsprotokoll für die Testung der Immunsuppressiva.....	68

8 Abkürzungsverzeichnis

µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
µM	mikromolar
AK	Antikörper
ALT	Alanin-Aminotransferase
APC	antigenpräsentierende Zellen
	Allophycocyanin
AST	Aspartat-Aminotransferase
BD	Becton Dickinson
BFA	Brefeldin A
BSA	bovines Serumalbumin
bzw.	beziehungsweise
C	Celsius
CD	cluster of differentiation
CFSE	carboxyfluorescein diacetate succinimidyl ester fluorescence
CMV	Cytomegalievirus
CTLA-4	Cytotoxic T-Lymphocyte Antigen 4
CyA	Cyclosporin A
DPBS bzw. PBS	Dulbecco's phosphate buffered saline

DNA	deoxyribonucleic acid, Desoxyribonukleinsäure
DSO	Deutsche Stiftung Organtransplantation
EDTA	ethylen diamin tetraacetic acid, Ethylendiamintetraessigsäure
FACS	fluorescence-activated cell sorter, Durchflussscytometer
FCS	fötales Kälberserum
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
FK506	Tacrolimus
FoxP3	Forkhead box protein 3
FSC	forward scatter
g	Gramm Erdbeschleunigung [9,81m/s ²]
GITR	glucocorticoid-induced TNFReceptor-related protein
h	Stunde (lat. hora)
HBV	Hepatitis B Virus
HD	Hämodialyse
HLA	human leukocyte antigen
HSA	Humanes Serumalbumin
IE	internationale Einheit(en)
HSV	Herpes simplex virus
IFN γ	Interferon gamma
IL	Interleukin
IPEX-Syndrom	Immunodysregulation polyendocrinopathy enteropathy X-linked syndrome
IQR	Interquartil range, Interquartilsabstand
IU	International units
L	Liter
LAG3	Lymphozyte-activation gene
LFA-1	Leukozyten Funktions-Antigen
M	molar
MACS	Magnetic cell separation
MFI	mittlere Fluoreszenzintensität
mg	Milligramm
MHC	major histocompatibility complex
min	Minute
ml	Milliliter
mM	millimolar

MP	Methylprednisolon
mTOR	mammilian Target of Rapamycin
n	Anzahl der Probanden
ng	Nanogramm
NK Zellen	Natürliche Killerzellen
NTx	Nierentransplantation
PCR	Polymerase-Ketten-Reaktion
P/S	Penicillin/Streptomycin
PBMC	peripheral blood mononuclear cells
PE	Phycoerythrin
PerCP	Peridiniumchlorophyll-Protein
PFA	Paraformaldehyd
pH	pondus hydrogenii, Maß für Wasserstoffionenkonzentration
RKI	Robert Koch Institut
RPMI	Roswell Park Memorial Institute
s	Sekunde
s/co	Sample/cut-off
SEB	Staphylococcus aureus Enterotoxin B
SSC	side scatter
STIKO	Ständige Impfkommision
TCR	T cell receptor, T-Zellrezeptor
TGF β	Transforming growth factor β
TNF α	Tumornekrosefaktor α
TOR	target of rapamycin
Treg	Regulatorische T Zelle(n)
U	unit
u.a.	und andere
UL	Quadrant oben links (upper left)
UR	Quadrant oben rechts (upper right)
VLE	Very low endotoxin
VLP	Virus like particle
WHO	Weltgesundheitsorganisation
z.B.	zum Beispiel

9 Literaturverzeichnis

1. Acuto O, Michel F (2003) CD28-mediated co-stimulation: a quantitative support for TCR signalling. *Nat Rev Immunol* 3:939-951
2. Aerts NE, Dombrecht EJ, Ebo DG, Bridts CH, Stevens WJ, De Clerck LS (2008) Activated T cells complicate the identification of regulatory T cells in rheumatoid arthritis. *Cell Immunol* 251:109-115
3. Allan SE, Crome SQ, Crellin NK, Passerini L, Steiner TS, Bacchetta R, Roncarolo MG, Levings MK (2007) Activation-induced FOXP3 in human T effector cells does not suppress proliferation or cytokine production. *Int Immunol* 19:345-354
4. Alvarez CM, Opelz G, Garcia LF, Susal C (2009) Expression of regulatory T-cell-related molecule genes and clinical outcome in kidney transplant recipients. *Transplantation* 87:857-863
5. Baan CC, van der Mast BJ, Klepper M, Mol WM, Peeters AM, Korevaar SS, Balk AH, Weimar W (2005) Differential effect of calcineurin inhibitors, anti-CD25 antibodies and rapamycin on the induction of FOXP3 in human T cells. *Transplantation* 80:110-117
6. Baecher-Allan C, Brown JA, Freeman GJ, Hafler DA (2001) CD4+CD25high regulatory cells in human peripheral blood. *J Immunol* 167:1245-1253
7. Battaglia M (2010) Potential T regulatory cell therapy in transplantation: how far have we come and how far can we go? *Transpl Int* 23:761-770
8. Bauer T, Sprinzl M, Protzer U (2011) Immune control of hepatitis B virus. *Dig Dis* 29:423-433
9. Baumgartner CK, Malherbe LP (2011) Antigen-driven T-cell repertoire selection during adaptive immune responses. *Immunol Cell Biol* 89:54-59
10. Beaurain G, Naret C, Marcon L, Grateau G, Druke T, Urena P, Nelson DL, Bach JF, Chatenoud L (1989) In vivo T cell preactivation in chronic uremic hemodialyzed and non-hemodialyzed patients. *Kidney Int* 36:636-644
11. Berber I, Aydin C, Yigit B, Turkmen F, Titiz IM, Altaca G (2005) The effect of HBsAg-positivity of kidney donors on long-term patient and graft outcome. *Transplant Proc* 37:4173-4175
12. Betjes MG (2013) Immune cell dysfunction and inflammation in end-stage renal disease. *Nat Rev Nephrol* 9:255-265
13. Betjes MG, Huisman M, Weimar W, Litjens NH (2008) Expansion of cytolytic CD4+CD28- T cells in end-stage renal disease. *Kidney Int* 74:760-767
14. Bien E, Balcerska A (2008) Serum soluble interleukin 2 receptor alpha in human cancer of adults and children: a review. *Biomarkers* 13:1-26
15. Bloom DD, Chang Z, Fechner JH, Dar W, Polster SP, Pascual J, Turka LA, Knechtle SJ (2008) CD4+ CD25+ FOXP3+ regulatory T cells increase de novo in kidney transplant patients after immunodepletion with Campath-1H. *Am J Transplant* 8:793-802
16. Booth NJ, McQuaid AJ, Sobande T, Kissane S, Agius E, Jackson SE, Salmon M, Falciani F, Yong K, Rustin MH, Akbar AN, Vukmanovic-Stejic M (2010) Different

- proliferative potential and migratory characteristics of human CD4+ regulatory T cells that express either CD45RA or CD45RO. *J Immunol* 184:4317-4326
17. Borsellino G, Kleinewietfeld M, Di Mitri D, Sternjak A, Diamantini A, Giometto R, Hopner S, Centonze D, Bernardi G, Dell'Acqua ML, Rossini PM, Battistini L, Rotzschke O, Falk K (2007) Expression of ectonucleotidase CD39 by Foxp3+ Treg cells: hydrolysis of extracellular ATP and immune suppression. *Blood* 110:1225-1232
 18. Braitch M, Harikrishnan S, Robins RA, Nichols C, Fahey AJ, Showe L, Constantinescu CS (2009) Glucocorticoids increase CD4CD25 cell percentage and Foxp3 expression in patients with multiple sclerosis. *Acta Neurol Scand* 119:239-245
 19. Brown K, Wong W (2008) Diagnostic value of regulatory T cells: a new facet of a much studied cell population. *Transplantation* 86:1485-1491
 20. Bundesärztekammer (2013). Richtlinien für die Wartelistenführung und die Organvermittlung gem. § 16 Abs. 1 S. 1 Nrn. 2 u. 5 TPG
 21. Butcher EC, Picker LJ (1996) Lymphocyte homing and homeostasis. *Science* 272:60-66
 22. Canavan JB, Afzali B, Scotta C, Fazekasova H, Edozie FC, Macdonald TT, Hernandez-Fuentes MP, Lombardi G, Lord GM (2012) A rapid diagnostic test for human regulatory T-cell function to enable regulatory T-cell therapy. *Blood* 119:e57-66
 23. Cao X, Cai SF, Fehniger TA, Song J, Collins LI, Piwnica-Worms DR, Ley TJ (2007) Granzyme B and perforin are important for regulatory T cell-mediated suppression of tumor clearance. *Immunity* 27:635-646
 24. Chung RT, Feng S, Delmonico FL (2001) Approach to the management of allograft recipients following the detection of hepatitis B virus in the prospective organ donor. *Am J Transplant* 1:185-191
 25. Clement LT (1992) Isoforms of the CD45 common leukocyte antigen family: markers for human T-cell differentiation. *J Clin Immunol* 12:1-10
 26. Collison LW, Workman CJ, Kuo TT, Boyd K, Wang Y, Vignali KM, Cross R, Sehy D, Blumberg RS, Vignali DA (2007) The inhibitory cytokine IL-35 contributes to regulatory T-cell function. *Nature* 450:566-569
 27. Cornberg M, Protzer U, Petersen J, Wedemeyer H, Berg T, Jilg W, Erhardt A, Wirth S, Sarrazin C, Dollinger MM, Schirmacher P, Dathe K, Kopp IB, Zeuzem S, Gerlich WH, Manns MP (2011) [Prophylaxis, diagnosis and therapy of hepatitis B virus infection - the German guideline]. *Z Gastroenterol* 49:871-930
 28. Corthay A (2009) How do regulatory T cells work? *Scand J Immunol* 70:326-336
 29. Curotto de Lafaille MA, Lafaille JJ (2009) Natural and adaptive foxp3+ regulatory T cells: more of the same or a division of labor? *Immunity* 30:626-635
 30. D'Cruz LM, Klein L (2005) Development and function of agonist-induced CD25+Foxp3+ regulatory T cells in the absence of interleukin 2 signaling. *Nat Immunol* 6:1152-1159
 31. De Feo TM, Poli F, Mozzi F, Moretti MP, Scalamogna M (2005) Risk of transmission of hepatitis B virus from anti-HBC positive cadaveric organ donors: a collaborative study. *Transplant Proc* 37:1238-1239

32. de la Rosa M, Rutz S, Dorninger H, Scheffold A (2004) Interleukin-2 is essential for CD4+CD25+ regulatory T cell function. *Eur J Immunol* 34:2480-2488
33. De Serres SA, Sayegh MH, Najafian N (2009) Immunosuppressive drugs and Tregs: a critical evaluation! *Clin J Am Soc Nephrol* 4:1661-1669
34. Deaglio S, Dwyer KM, Gao W, Friedman D, Usheva A, Erat A, Chen JF, Enyoloji K, Linden J, Oukka M, Kuchroo VK, Strom TB, Robson SC (2007) Adenosine generation catalyzed by CD39 and CD73 expressed on regulatory T cells mediates immune suppression. *J Exp Med* 204:1257-1265
35. Demirkiran A, Hendrikx TK, Baan CC, van der Laan LJ (2008) Impact of immunosuppressive drugs on CD4+CD25+FOXP3+ regulatory T cells: does in vitro evidence translate to the clinical setting? *Transplantation* 85:783-789
36. Derhovanessian E, Larbi A, Pawelec G (2009) Biomarkers of human immunosenescence: impact of Cytomegalovirus infection. *Curr Opin Immunol* 21:440-445
37. Descamps-Latscha B, Chatenoud L (1996) T cells and B cells in chronic renal failure. *Semin Nephrol* 16:183-191
38. Di Ianni M, Falzetti F, Carotti A, Terenzi A, Castellino F, Bonifacio E, Del Papa B, Zei T, Ostini RI, Cecchini D, Aloisi T, Perruccio K, Ruggeri L, Balucani C, Pierini A, Sportoletti P, Aristei C, Falini B, Reisner Y, Velardi A, Aversa F, Martelli MF (2011) Tregs prevent GVHD and promote immune reconstitution in HLA-haploidentical transplantation. *Blood* 117:3921-3928
39. Dieckmann D, Plottner H, Berchtold S, Berger T, Schuler G (2001) Ex vivo isolation and characterization of CD4(+)CD25(+) T cells with regulatory properties from human blood. *J Exp Med* 193:1303-1310
40. Dienstag JL (2008) Hepatitis B virus infection. *N Engl J Med* 359:1486-1500
41. Ding Y, Xu J, Bromberg JS (2012) Regulatory T cell migration during an immune response. *Trends Immunol* 33:174-180
42. Dirks J, Tas H, Schmidt T, Kirsch S, Gartner BC, Sester U, Sester M (2013) PD-1 Analysis on CD28 CD27 CD4 T Cells Allows Stimulation-Independent Assessment of CMV Viremic Episodes in Transplant Recipients. *Am J Transplant*
43. DSO (2012). Deutschland Entwicklung der Organspenden pro Region (Deutsche-Stiftung-Organtransplantation)
44. Dwyer KM, Deaglio S, Gao W, Friedman D, Strom TB, Robson SC (2007) CD39 and control of cellular immune responses. *Purinergic Signal* 3:171-180
45. Dwyer KM, Hanidziar D, Putheti P, Hill PA, Pommey S, McRae JL, Winterhalter A, Doherty G, Deaglio S, Koulmanda M, Gao W, Robson SC, Strom TB (2010) Expression of CD39 by human peripheral blood CD4+ CD25+ T cells denotes a regulatory memory phenotype. *Am J Transplant* 10:2410-2420
46. Egli A, Humar A, Kumar D (2012) State-of-the-art monitoring of cytomegalovirus-specific cell-mediated immunity after organ transplant: a primer for the clinician. *Clin Infect Dis* 55:1678-1689
47. Ermann J, Hoffmann P, Edinger M, Dutt S, Blankenberg FG, Higgins JP, Negrin RS, Fathman CG, Strober S (2005) Only the CD62L+ subpopulation of CD4+CD25+ regulatory T cells protects from lethal acute GVHD. *Blood* 105:2220-2226

48. Feau S, Schoenberger SP (2009) Immunology. Ex uno plura. *Science* 323:466-467
49. Feger U, Tolosa E, Huang YH, Waschbisch A, Biedermann T, Melms A, Wiendl H (2007) HLA-G expression defines a novel regulatory T-cell subset present in human peripheral blood and sites of inflammation. *Blood* 110:568-577
50. Ferrari C, Penna A, Bertoletti A, Valli A, Antoni AD, Giuberti T, Cavalli A, Petit MA, Fiaccadori F (1990) Cellular immune response to hepatitis B virus-encoded antigens in acute and chronic hepatitis B virus infection. *J Immunol* 145:3442-3449
51. Fontenot JD, Gavin MA, Rudensky AY (2003) Foxp3 programs the development and function of CD4+CD25+ regulatory T cells. *Nat Immunol* 4:330-336
52. Fontenot JD, Rasmussen JP, Gavin MA, Rudensky AY (2005a) A function for interleukin 2 in Foxp3-expressing regulatory T cells. *Nat Immunol* 6:1142-1151
53. Fontenot JD, Rasmussen JP, Williams LM, Dooley JL, Farr AG, Rudensky AY (2005b) Regulatory T cell lineage specification by the forkhead transcription factor foxp3. *Immunity* 22:329-341
54. Geiger TL, Tauro S (2012) Nature and nurture in Foxp3(+) regulatory T cell development, stability, and function. *Hum Immunol* 73:232-239
55. Girndt M, Kohler H (2002) Hepatitis B virus infection in hemodialysis patients. *Semin Nephrol* 22:340-350
56. Girndt M, Ulrich C, Kaul H, Sester U, Sester M, Kohler H (2003) Uremia-associated immune defect: the IL-10-CRP axis. *Kidney Int Suppl*:S76-79
57. Golovina TN, Mikheeva T, Suhoski MM, Aquí NA, Tai VC, Shan X, Liu R, Balcarcel RR, Fisher N, Levine BL, Carroll RG, Warner N, Blazar BR, June CH, Riley JL (2008) CD28 costimulation is essential for human T regulatory expansion and function. *J Immunol* 181:2855-2868
58. Grady GF (1978) Transfusions and hepatitis: update in 1978. *N Engl J Med* 298:1413-1415
59. Grailer JJ, Kodera M, Steeber DA (2009) L-selectin: role in regulating homeostasis and cutaneous inflammation. *J Dermatol Sci* 56:141-147
60. Hamawy MM (2003) Molecular actions of calcineurin inhibitors. *Drug News Perspect* 16:277-282
61. Hendriks TK, van Gurp EA, Mol WM, Schoordijk W, Sewgobind VD, Ijzermans JN, Weimar W, Baan CC (2009a) End-stage renal failure and regulatory activities of CD4+CD25bright+FoxP3+ T-cells. *Nephrol Dial Transplant* 24:1969-1978
62. Hendriks TK, Velthuis JH, Klepper M, van Gurp E, Geel A, Schoordijk W, Baan CC, Weimar W (2009b) Monotherapy rapamycin allows an increase of CD4 CD25 FoxP3 T cells in renal recipients. *Transpl Int* 22:884-891
63. Holm TL, Nielsen J, Claesson MH (2004) CD4+CD25+ regulatory T cells: I. Phenotype and physiology. *APMIS* 112:629-641
64. Hori S, Nomura T, Sakaguchi S (2003) Control of regulatory T cell development by the transcription factor Foxp3. *Science* 299:1057-1061
65. Huang CT, Workman CJ, Flies D, Pan X, Marson AL, Zhou G, Hipkiss EL, Ravi S, Kowalski J, Levitsky HI, Powell JD, Pardoll DM, Drake CG, Vignali DA (2004) Role of LAG-3 in regulatory T cells. *Immunity* 21:503-513

66. Hunig T, Luhder F, Elflein K, Gogishvili T, Frohlich M, Guler R, Cutler A, Brombacher F (2010) CD28 and IL-4: two heavyweights controlling the balance between immunity and inflammation. *Med Microbiol Immunol* 199:239-246
67. Hwang S, Ahn CS, Song GW, Kim KH, Moon DB, Oh HB, Lim YS, Lee HC, Ha TY, Jung DH, Chung YH, Lee SG (2011) Posttransplantation prophylaxis with primary high-dose hepatitis B immunoglobulin monotherapy and complementary preemptive antiviral add-on. *Liver Transpl* 17:456-465
68. Ivetic A (2013) Signals regulating L-selectin-dependent leucocyte adhesion and transmigration. *Int J Biochem Cell Biol* 45:550-555
69. Jiang H, Wu J, Zhang X, Wu D, Huang H, He Q, Wang R, Wang Y, Zhang J, Chen J (2009) Kidney transplantation from hepatitis B surface antigen positive donors into hepatitis B surface antibody positive recipients: a prospective nonrandomized controlled study from a single center. *Am J Transplant* 9:1853-1858
70. Joetham A, Takeda K, Taube C, Miyahara N, Matsubara S, Koya T, Rha YH, Dakhama A, Gelfand EW (2007) Naturally occurring lung CD4(+)CD25(+) T cell regulation of airway allergic responses depends on IL-10 induction of TGF-beta. *J Immunol* 178:1433-1442
71. Jung MC, Diepolder HM, Spengler U, Wierenga EA, Zachoval R, Hoffmann RM, Eichenlaub D, Frosner G, Will H, Pape GR (1995) Activation of a heterogeneous hepatitis B (HB) core and e antigen-specific CD4+ T-cell population during seroconversion to anti-HBe and anti-HBs in hepatitis B virus infection. *J Virol* 69:3358-3368
72. Jung MC, Spengler U, Schraut W, Hoffmann R, Zachoval R, Eisenburg J, Eichenlaub D, Riethmuller G, Paumgartner G, Ziegler-Heitbrock HW, et al. (1991) Hepatitis B virus antigen-specific T-cell activation in patients with acute and chronic hepatitis B. *J Hepatol* 13:310-317
73. Karagiannidis C, Akdis M, Holopainen P, Woolley NJ, Hense G, Ruckert B, Mantel PY, Menz G, Akdis CA, Blaser K, Schmidt-Weber CB (2004) Glucocorticoids upregulate FOXP3 expression and regulatory T cells in asthma. *J Allergy Clin Immunol* 114:1425-1433
74. Kawai M, Kitade H, Mathieu C, Waer M, Pirenne J (2005) Inhibitory and stimulatory effects of cyclosporine A on the development of regulatory T cells in vivo. *Transplantation* 79:1073-1077
75. KDIGO (2009) KDIGO clinical practice guideline for the care of kidney transplant recipients. *Am J Transplant* 9 Suppl 3:S1-155
76. Kleinewietfeld M, Starke M, Di Mitri D, Borsellino G, Battistini L, Rotzschke O, Falk K (2009) CD49d provides access to "untouched" human Foxp3+ Treg free of contaminating effector cells. *Blood* 113:827-836
77. Knoll A, Pietrzyk M, Loss M, Goetz WA, Jilg W (2005) Solid-organ transplantation in HBsAg-negative patients with antibodies to HBV core antigen: low risk of HBV reactivation. *Transplantation* 79:1631-1633
78. Kotton CN (2013) CMV: Prevention, Diagnosis and Therapy. *Am J Transplant* 13 Suppl 3:24-40; quiz 40

79. Kramer P, ten Kate FW, Bijnen AB, Jeekel J, Weimar W (1984) Recombinant leucocyte interferon A induces steroid-resistant acute vascular rejection episodes in renal transplant recipients. *Lancet* 1:989-990
80. Kreijveld E, Koenen HJ, van Cranenbroek B, van Rijssen E, Joosten I, Hilbrands LB (2008) Immunological monitoring of renal transplant recipients to predict acute allograft rejection following the discontinuation of tacrolimus. *PLoS One* 3:e2711
81. Levitsky J, Doucette K (2009) Viral hepatitis in solid organ transplant recipients. *Am J Transplant* 9 Suppl 4:S116-130
82. Liang TJ (2009) Hepatitis B: the virus and disease. *Hepatology* 49:S13-21
83. Lim DG, Joe IY, Park YH, Chang SH, Wee YM, Han DJ, Kim SC (2007) Effect of immunosuppressants on the expansion and function of naturally occurring regulatory T cells. *Transpl Immunol* 18:94-100
84. Lim HW, Broxmeyer HE, Kim CH (2006) Regulation of trafficking receptor expression in human forkhead box P3+ regulatory T cells. *J Immunol* 177:840-851
85. Litjens NH, van Druningen CJ, Betjes MG (2006) Progressive loss of renal function is associated with activation and depletion of naive T lymphocytes. *Clin Immunol* 118:83-91
86. Liu W, Putnam AL, Xu-Yu Z, Szot GL, Lee MR, Zhu S, Gottlieb PA, Kapranov P, Gingeras TR, Fazekas de St Groth B, Clayberger C, Soper DM, Ziegler SF, Bluestone JA (2006) CD127 expression inversely correlates with FoxP3 and suppressive function of human CD4+ T reg cells. *J Exp Med* 203:1701-1711
87. Lutwick LI, Sywassink JM, Corry RJ, Shorey JW (1983) The transmission of hepatitis B by renal transplantation. *Clin Nephrol* 19:317-319
88. Magg T, Mannert J, Ellwart JW, Schmid I, Albert MH (2012) Subcellular localization of FOXP3 in human regulatory and nonregulatory T cells. *Eur J Immunol* 42:1627-1638
89. Mandapathil M, Hildorfer B, Szczepanski MJ, Czystowska M, Szajnik M, Ren J, Lang S, Jackson EK, Gorelik E, Whiteside TL (2010) Generation and accumulation of immunosuppressive adenosine by human CD4+CD25highFOXP3+ regulatory T cells. *J Biol Chem* 285:7176-7186
90. Mandapathil M, Lang S, Gorelik E, Whiteside TL (2009) Isolation of functional human regulatory T cells (Treg) from the peripheral blood based on the CD39 expression. *J Immunol Methods* 346:55-63
91. McHugh RS, Whitters MJ, Piccirillo CA, Young DA, Shevach EM, Collins M, Byrne MC (2002) CD4(+)CD25(+) immunoregulatory T cells: gene expression analysis reveals a functional role for the glucocorticoid-induced TNF receptor. *Immunity* 16:311-323
92. McMurchy AN, Levings MK (2012) Suppression assays with human T regulatory cells: a technical guide. *Eur J Immunol* 42:27-34
93. Meier P, Golshayan D, Blanc E, Pascual M, Burnier M (2009) Oxidized LDL modulates apoptosis of regulatory T cells in patients with ESRD. *J Am Soc Nephrol* 20:1368-1384

94. Milich DR, McLachlan A, Thornton GB, Hughes JL (1987) Antibody production to the nucleocapsid and envelope of the hepatitis B virus primed by a single synthetic T cell site. *Nature* 329:547-549
95. Miroux C, Morales O, Carpentier A, Dharancy S, Conti F, Boleslawski E, Podevin P, Auriault C, Pancre V, Delhem N (2009) Inhibitory effects of cyclosporine on human regulatory T cells in vitro. *Transplant Proc* 41:3371-3374
96. Miroux C, Morales O, Ghazal K, Othman SB, de Launoit Y, Pancre V, Conti F, Delhem N (2012a) In vitro effects of cyclosporine A and tacrolimus on regulatory T-cell proliferation and function. *Transplantation* 94:123-131
97. Miroux C, Morales O, Ouaguia L, Aoudjehane L, Boleslawski E, Pancre V, de Launoit Y, Calmus Y, Conti F, Delhem N (2012b) Corticosteroids do not reverse the inhibitory effect of cyclosporine on regulatory T-cell activity in contrast to mycophenolate mofetil. *Transplant Proc* 44:2834-2839
98. Morgan ME, van Bilsen JH, Bakker AM, Heemskerk B, Schilham MW, Hartgers FC, Elferink BG, van der Zanden L, de Vries RR, Huizinga TW, Ottenhoff TH, Toes RE (2005) Expression of FOXP3 mRNA is not confined to CD4+CD25+ T regulatory cells in humans. *Hum Immunol* 66:13-20
99. Nadig SN, Wieckiewicz J, Wu DC, Warnecke G, Zhang W, Luo S, Schiopu A, Taggart DP, Wood KJ (2010) In vivo prevention of transplant arteriosclerosis by ex vivo-expanded human regulatory T cells. *Nat Med* 16:809-813
100. Nakamura K, Kitani A, Strober W (2001) Cell contact-dependent immunosuppression by CD4(+)CD25(+) regulatory T cells is mediated by cell surface-bound transforming growth factor beta. *J Exp Med* 194:629-644
101. Nishiyama S, Manabe N, Kubota Y, Ohnishi H, Kitanaka A, Tokuda M, Taminato T, Ishida T, Takahara J, Tanaka T (2005) Cyclosporin A inhibits the early phase of NF-kappaB/RelA activation induced by CD28 costimulatory signaling to reduce the IL-2 expression in human peripheral T cells. *Int Immunopharmacol* 5:699-710
102. Oberg HH, Wesch D, Lenke J, Kabelitz D (2006) An optimized method for the functional analysis of human regulatory T cells. *Scand J Immunol* 64:353-360
103. Oberle N, Eberhardt N, Falk CS, Krammer PH, Suri-Payer E (2007) Rapid suppression of cytokine transcription in human CD4+CD25 T cells by CD4+Foxp3+ regulatory T cells: independence of IL-2 consumption, TGF-beta, and various inhibitors of TCR signaling. *J Immunol* 179:3578-3587
104. Ochs HD, Gambineri E, Torgerson TR (2007) IPEX, FOXP3 and regulatory T-cells: a model for autoimmunity. *Immunol Res* 38:112-121
105. Onishi Y, Fehervari Z, Yamaguchi T, Sakaguchi S (2008) Foxp3+ natural regulatory T cells preferentially form aggregates on dendritic cells in vitro and actively inhibit their maturation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105:10113-10118
106. Pandiyan P, Zheng L, Ishihara S, Reed J, Lenardo MJ (2007) CD4+CD25+Foxp3+ regulatory T cells induce cytokine deprivation-mediated apoptosis of effector CD4+ T cells. *Nat Immunol* 8:1353-1362
107. Peterson RA (2012) Regulatory T-cells: diverse phenotypes integral to immune homeostasis and suppression. *Toxicol Pathol* 40:186-204
108. Pilmore HL, Gane EJ (2012) Hepatitis B-positive donors in renal transplantation: increasing the deceased donor pool. *Transplantation* 94:205-210

109. Poethko-Muller C, Zimmermann R, Hamouda O, Faber M, Stark K, Ross RS, Thamm M (2013) [Epidemiology of hepatitis A, B, and C among adults in Germany: results of the German Health Interview and Examination Survey for Adults (DEGS1)]. *Bundesgesundheitsblatt Gesundheitsforschung Gesundheitsschutz* 56:707-715
110. Prado C, Gomez J, Lopez P, de Paz B, Gutierrez C, Suarez A (2011) Dexamethasone upregulates FOXP3 expression without increasing regulatory activity. *Immunobiology* 216:386-392
111. Presser D, Sester U, Mohrbach J, Janssen M, Kohler H, Sester M (2009) Differential kinetics of effector and regulatory T cells in patients on calcineurin inhibitor-based drug regimens. *Kidney Int* 76:557-566
112. Robert-Koch-Institut (2011) Hepatitis B RKI-Ratgeber für Ärzte.
113. Robert-Koch-Institut (2012). Virushepatitis B, C und D im Jahr 2011. In *Epidemiologisches Bulletin*
114. Robert-Koch-Institut (2013). Empfehlungen der Ständigen Impfkommission (STIKO) am Robert Koch-Institut / Stand: August 2013. In *Epidemiologisches Bulletin*
115. Rogacev KS, Seiler S, Zawada AM, Reichart B, Herath E, Roth D, Ulrich C, Fliser D, Heine GH (2011) CD14⁺⁺CD16⁺ monocytes and cardiovascular outcome in patients with chronic kidney disease. *Eur Heart J* 32:84-92
116. Roncador G, Brown PJ, Maestre L, Hue S, Martinez-Torrecuadrada JL, Ling KL, Pratap S, Toms C, Fox BC, Cerundolo V, Powrie F, Banham AH (2005) Analysis of FOXP3 protein expression in human CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells at the single-cell level. *Eur J Immunol* 35:1681-1691
117. Rudensky AY, Campbell DJ (2006) In vivo sites and cellular mechanisms of T reg cell-mediated suppression. *J Exp Med* 203:489-492
118. Sagedal S, Hartmann A, Nordal KP, Osnes K, Leivestad T, Foss A, Degre M, Fauchald P, Rollag H (2004) Impact of early cytomegalovirus infection and disease on long-term recipient and kidney graft survival. *Kidney Int* 66:329-337
119. Sagoo P, Ali N, Garg G, Nestle FO, Lechler RI, Lombardi G (2011) Human regulatory T cells with alloantigen specificity are more potent inhibitors of alloimmune skin graft damage than polyclonal regulatory T cells. *Sci Transl Med* 3:83ra42
120. Sakaguchi S, Sakaguchi N, Asano M, Itoh M, Toda M (1995) Immunologic self-tolerance maintained by activated T cells expressing IL-2 receptor alpha-chains (CD25). Breakdown of a single mechanism of self-tolerance causes various autoimmune diseases. *J Immunol* 155:1151-1164
121. Sakaguchi S, Wing K, Onishi Y, Prieto-Martin P, Yamaguchi T (2009) Regulatory T cells: how do they suppress immune responses? *Int Immunol* 21:1105-1111
122. Sakaguchi S, Yamaguchi T, Nomura T, Ono M (2008) Regulatory T cells and immune tolerance. *Cell* 133:775-787
123. Sallusto F, Lanzavecchia A (1994) Efficient presentation of soluble antigen by cultured human dendritic cells is maintained by granulocyte/macrophage colony-stimulating factor plus interleukin 4 and downregulated by tumor necrosis factor alpha. *J Exp Med* 179:1109-1118

124. Salomon B, Lenschow DJ, Rhee L, Ashourian N, Singh B, Sharpe A, Bluestone JA (2000) B7/CD28 costimulation is essential for the homeostasis of the CD4+CD25+ immunoregulatory T cells that control autoimmune diabetes. *Immunity* 12:431-440
125. San Segundo D, Ruiz JC, Fernandez-Fresnedo G, Izquierdo M, Gomez-Alamillo C, Cacho E, Benito MJ, Rodrigo E, Palomar R, Lopez-Hoyos M, Arias M (2006) Calcineurin inhibitors affect circulating regulatory T cells in stable renal transplant recipients. *Transplant Proc* 38:2391-2393
126. Satpathy AT, Wu X, Albring JC, Murphy KM (2012) Re(de)fining the dendritic cell lineage. *Nat Immunol* 13:1145-1154
127. Schaier M, Seissler N, Schmitt E, Meuer S, Hug F, Zeier M, Steinborn A (2012) DR(high+)CD45RA(-)-Tregs potentially affect the suppressive activity of the total Treg pool in renal transplant patients. *PLoS One* 7:e34208
128. Schliesser U, Streitz M, Sawitzki B (2012) Tregs: application for solid-organ transplantation. *Curr Opin Organ Transplant* 17:34-41
129. Schmidt T, Ritter M, Dirks J, Gartner BC, Sester U, Sester M (2012) Cytomegalovirus-specific T-cell immunity to assign the infection status in individuals with passive immunity: a proof of principle. *J Clin Virol* 54:272-275
130. Schmidt T, Sester M (2013) Detection of antigen-specific T cells based on intracellular cytokine staining using flow-cytometry. *Methods Mol Biol* 1064:267-274
131. Scotta C, Soligo M, Camperio C, Piccolella E (2008) FOXP3 induced by CD28/B7 interaction regulates CD25 and anergic phenotype in human CD4+CD25- T lymphocytes. *J Immunol* 181:1025-1033
132. Seddiki N, Santner-Nanan B, Martinson J, Zaunders J, Sasson S, Landay A, Solomon M, Selby W, Alexander SI, Nanan R, Kelleher A, Fazekas de St Groth B (2006) Expression of interleukin (IL)-2 and IL-7 receptors discriminates between human regulatory and activated T cells. *J Exp Med* 203:1693-1700
133. Segundo DS, Ruiz JC, Izquierdo M, Fernandez-Fresnedo G, Gomez-Alamillo C, Merino R, Benito MJ, Cacho E, Rodrigo E, Palomar R, Lopez-Hoyos M, Arias M (2006) Calcineurin inhibitors, but not rapamycin, reduce percentages of CD4+CD25+FOXP3+ regulatory T cells in renal transplant recipients. *Transplantation* 82:550-557
134. Seissler N, Schmitt E, Hug F, Sommerer C, Zeier M, Schaier M, Steinborn A (2012) Methylprednisolone treatment increases the proportion of the highly suppressive HLA-DR(+)-Treg-cells in transplanted patients. *Transpl Immunol* 27:157-161
135. Sester M, Sester U, Gartner B, Heine G, Girndt M, Mueller-Lantzsch N, Meyerhans A, Kohler H (2001) Levels of virus-specific CD4 T cells correlate with cytomegalovirus control and predict virus-induced disease after renal transplantation. *Transplantation* 71:1287-1294
136. Sester U, Gartner BC, Wilkens H, Schwaab B, Wossner R, Kindermann I, Girndt M, Meyerhans A, Mueller-Lantzsch N, Schafers HJ, Sybrecht GW, Kohler H, Sester M (2005) Differences in CMV-specific T-cell levels and long-term susceptibility to CMV infection after kidney, heart and lung transplantation. *Am J Transplant* 5:1483-1489

137. Sester U, Presser D, Dirks J, Gartner BC, Kohler H, Sester M (2008) PD-1 expression and IL-2 loss of cytomegalovirus- specific T cells correlates with viremia and reversible functional anergy. *Am J Transplant* 8:1486-1497
138. Sester U, Sester M, Hauk M, Kaul H, Kohler H, Girndt M (2000) T-cell activation follows Th1 rather than Th2 pattern in haemodialysis patients. *Nephrol Dial Transplant* 15:1217-1223
139. Shevach EM (2009) Mechanisms of foxp3+ T regulatory cell-mediated suppression. *Immunity* 30:636-645
140. Sonnweber T, Theurl I, Seifert M, Schroll A, Eder S, Mayer G, Weiss G (2011) Impact of iron treatment on immune effector function and cellular iron status of circulating monocytes in dialysis patients. *Nephrol Dial Transplant* 26:977-987
141. Stachowski J, Pollok M, Burcher H, Baldamus CA (1991) Immunodeficiency in ESRD-patients is linked to altered IL-2 receptor density on T cell subsets. *J Clin Lab Immunol* 34:171-177
142. Stenvinkel P, Ketteler M, Johnson RJ, Lindholm B, Pecoits-Filho R, Riella M, Heimbürger O, Cederholm T, Girndt M (2005) IL-10, IL-6, and TNF-alpha: central factors in the altered cytokine network of uremia--the good, the bad, and the ugly. *Kidney Int* 67:1216-1233
143. Takahashi T, Tagami T, Yamazaki S, Uede T, Shimizu J, Sakaguchi N, Mak TW, Sakaguchi S (2000) Immunologic self-tolerance maintained by CD25(+)CD4(+) regulatory T cells constitutively expressing cytotoxic T lymphocyte-associated antigen 4. *J Exp Med* 192:303-310
144. Thimme R, Wieland S, Steiger C, Ghayeb J, Reimann KA, Purcell RH, Chisari FV (2003) CD8(+) T cells mediate viral clearance and disease pathogenesis during acute hepatitis B virus infection. *J Virol* 77:68-76
145. Thornton AM, Shevach EM (1998) CD4+CD25+ immunoregulatory T cells suppress polyclonal T cell activation in vitro by inhibiting interleukin 2 production. *J Exp Med* 188:287-296
146. Tsai MC, Chen YT, Chien YS, Chen TC, Hu TH (2010) Hepatitis B virus infection and renal transplantation. *World J Gastroenterol* 16:3878-3887
147. Walker MR, Kaspirowicz DJ, Gersuk VH, Benard A, Van Landeghen M, Buckner JH, Ziegler SF (2003) Induction of FoxP3 and acquisition of T regulatory activity by stimulated human CD4+CD25- T cells. *J Clin Invest* 112:1437-1443
148. Wang H, Zhao L, Sun Z, Sun L, Zhang B, Zhao Y (2006) A potential side effect of cyclosporin A: inhibition of CD4(+)CD25(+) regulatory T cells in mice. *Transplantation* 82:1484-1492
149. Wang J, Ioan-Facsinay A, van der Voort EI, Huizinga TW, Toes RE (2007) Transient expression of FOXP3 in human activated nonregulatory CD4+ T cells. *Eur J Immunol* 37:129-138
150. Ward RJ, Crichton RR, Taylor DL, Della Corte L, Srari SK, Dexter DT (2011) Iron and the immune system. *J Neural Transm* 118:315-328
151. Webster GJ, Reignat S, Maini MK, Whalley SA, Ogg GS, King A, Brown D, Amlot PL, Williams R, Vergani D, Dusheiko GM, Bertolotti A (2000) Incubation phase of acute hepatitis B in man: dynamic of cellular immune mechanisms. *Hepatology* 32:1117-1124

152. Wekerle T (2008) T-regulatory cells-what relationship with immunosuppressive agents? *Transplant Proc* 40:S13-16
153. WHO (updated July 2013). Hepatitis B Fact Sheet N°204
154. Wieczorek G, Asemissen A, Model F, Turbachova I, Floess S, Liebenberg V, Baron U, Stauch D, Kotsch K, Pratschke J, Hamann A, Loddenkemper C, Stein H, Volk HD, Hoffmuller U, Grutzkau A, Mustea A, Huehn J, Scheibenbogen C, Olek S (2009) Quantitative DNA methylation analysis of FOXP3 as a new method for counting regulatory T cells in peripheral blood and solid tissue. *Cancer Res* 69:599-608
155. Wing K, Onishi Y, Prieto-Martin P, Yamaguchi T, Miyara M, Fehervari Z, Nomura T, Sakaguchi S (2008) CTLA-4 control over Foxp3+ regulatory T cell function. *Science* 322:271-275
156. Wolf JL, Perkins HA, Schreeder MT, Vincenti F (1979) The transplanted kidney as a source of hepatitis B infection. *Ann Intern Med* 91:412-413
157. Xu L, Xu Z, Xu M (2009) Glucocorticoid treatment restores the impaired suppressive function of regulatory T cells in patients with relapsing-remitting multiple sclerosis. *Clin Exp Immunol* 158:26-30
158. Yagi H, Nomura T, Nakamura K, Yamazaki S, Kitawaki T, Hori S, Maeda M, Onodera M, Uchiyama T, Fujii S, Sakaguchi S (2004) Crucial role of FOXP3 in the development and function of human CD25+CD4+ regulatory T cells. *Int Immunol* 16:1643-1656
159. Yang PL, Althage A, Chung J, Maier H, Wieland S, Isogawa M, Chisari FV (2010) Immune effectors required for hepatitis B virus clearance. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107:798-802
160. Yoon JW, Gollapudi S, Pahl MV, Vaziri ND (2006) Naive and central memory T-cell lymphopenia in end-stage renal disease. *Kidney Int* 70:371-376
161. Zeiser R, Nguyen VH, Beilhack A, Buess M, Schulz S, Baker J, Contag CH, Negrin RS (2006) Inhibition of CD4+CD25+ regulatory T-cell function by calcineurin-dependent interleukin-2 production. *Blood* 108:390-399
162. Zheng SG, Gray JD, Ohtsuka K, Yamagiwa S, Horwitz DA (2002) Generation ex vivo of TGF-beta-producing regulatory T cells from CD4+CD25- precursors. *J Immunol* 169:4183-4189
163. Zheng Y, Josefowicz SZ, Kas A, Chu TT, Gavin MA, Rudensky AY (2007) Genome-wide analysis of Foxp3 target genes in developing and mature regulatory T cells. *Nature* 445:936-940
164. Zuckerman JN (2006) Protective efficacy, immunotherapeutic potential, and safety of hepatitis B vaccines. *J Med Virol* 78:169-177

10 Publikationen

10.1 Manuskripte

Teile der vorliegenden Arbeit wurden publiziert unter:

J. Mohrbach, M. W. Janssen, G. H. Heine, B. C. Gärtner, D. Fliser, M. Sester, U. Sester (2010). *Successful outcome of kidney transplantation from a HBV-DNA positive donor into recipients with cleared HBV-infection using a pre-emptive therapy approach*. J Clin Virol, 2010. **49**(1): p. 53-7.

D. Presser; U. Sester, **J. Mohrbach**, M. Janssen, H. Köhler, M. Sester (2009). *Differential kinetics of effector and regulatory T cells in patients on calcineurin inhibitor-based drug regimens*. Kidney Int, 2009. **76**(5): p. 557-66.

10.2 Kongressbeiträge

Folgende Kongressbeiträge gingen aus der vorliegenden Arbeit hervor:

J. Mohrbach, M Janssen, C. Kislat, S. Siemer, D. Fliser, M. Sester, U. Sester (2011) *Regulatorische T Zellen (Treg) als mögliche Ursache des urämischen Immundefektes*, 3. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Nephrologie

J. Mohrbach, M Janssen, S. Siemer, D. Fliser, M. Sester, U. Sester (2009). *Differential effects of immunosuppressive drugs on regulatory T-cell function*, renal week 2009 of the American Society of Nephrology

J. Mohrbach, M Janssen, S. Siemer, D. Fliser, M. Sester, U. Sester (2009). *Wirkung regulatorischer T-Zellen (Treg) als endogene Immunsuppression und differentielle Beeinflussung durch exogene Immunsuppressiva*, 1. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Nephrologie

J. Mohrbach, M Janssen, S. Siemer, M. Stöckle, D. Fliser, M. Sester, U. Sester (2009). *Die säulenunabhängige, magnetbasierte Depletion regulatorischer T-Lymphozyten (Treg) aus Vollblutproben erlaubt die direkte Charakterisierung des Einflusses von Treg auf die zelluläre Immunantwort - eine neue Methode und ihre Anwendung*, 61. Kongress der Deutschen Gesellschaft für Urologie e. V.

M.W.W. Janssen, **J. Mohrbach**, M. Sester, G H. Heine, B C. Gärtner, S. Siemer, M. Stöckle, D Fliser, U. Sester (2009). *Stabile Transplantatfunktion sowie stabile HBV-spezifische zelluläre und humorale Immunantwort nach Transplantation der Nieren eines HBs-antigen*

positiven Spenders in zwei Empfänger mit ausgeheilter HBV-Infektion, 61. Kongress der Deutschen Gesellschaft für Urologie e. V.

10.3 Preise

Folgendes Poster wurde als Poster des Tages der Sitzung Nierentransplantation auf dem 61. Kongress der Deutschen Gesellschaft für Urologie e. V ausgezeichnet:

J. Mohrbach, M Janssen, S. Siemer, M. Stöckle, D. Fliser, M. Sester, U. Sester (2009). *Die säulenunabhängige, magnetbasierte Depletion regulatorischer T-Lymphozyten (Treg) aus Vollblutproben erlaubt die direkte Charakterisierung des Einflusses von Treg auf die zelluläre Immunantwort - eine neue Methode und ihre Anwendung*

10.4 Weitere Publikationen

Folgende Publikationen, die inhaltlich nicht aus der vorliegenden Arbeit hervorgegangen sind, wurden zwischenzeitlich veröffentlicht:

10.4.1 Manuskripte

M. Windheim, J. H. Southcombe, E. Kremmer, L. Chaplin, D. Urlaub, C. S. Falk, M. Claus, **J. Mihm**, M. Braithwaite, K. Dennehy, H. Renz, M. Sester, C. Watzl, H. G.Burgert (2013). *A unique secreted adenovirus E3 protein binds to the leukocyte common antigen CD45 and modulates leukocyte functions*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2013.

J. Mihm, Ö. Uslu, U. Sester (2013). *Dysurische Beschwerden und Flankenschmerz bei dialysepflichtiger Patientin mit Diabetes mellitus*. Der Nephrologe · 8:516–518_· DOI 10.1007/s11560-013-0795-3

10.4.2 Kongressbeiträge

J. Mihm, S. Kirsch, J. Rissland, H. Wilkens, J. Dirks, S. Smola, D. Fliser, M. Sester, U. Sester (2013). *Reduzierte Foscarnet-vermittelte Nephrotoxizität durch immunologisch gesteuerte Optimierung der Therapiedauer bei einer organtransplantierten Patientin mit Ganciclovir-resistenter CMV-Infektion*, 5. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Nephrologie

S. Kirsch, M. Wolf, **J. Mihm**, M. Schäfer, D. Fliser, M. Sester, U. Sester (2013). *Identifikation von Risiko-HLA-Antigenen mit Hilfe von präformierten T Zellen bei einem Patienten nach akuter, steroid-resistenter Nierentransplantation ohne Nachweis von HLA-Antikörpern*, 5.Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Nephrologie

J. Mihm, S. Kirsch, J. Rissland, H. Wilkens, J. Dirks, S. Smola, D. Fliser, M. Sester, U. Sester (2013). *Reduzierte Foscarnet-vermittelte Nephrotoxizität durch immunologisch gesteuerte Optimierung der Therapiedauer bei einer organtransplantierten Patientin mit Ganciclovir-resistenter CMV-Infektion*, 22. Jahrestagung der Deutschen Transplantationsgesellschaft

11 Danksagung

Allen Personen, die mich bei der Durchführung dieser Arbeit unterstützt haben, möchte ich an dieser Stelle meinen herzlichen Dank aussprechen.

Ralf Wagner von der Universität Regensburg möchte ich für die Bereitstellung der Hepatitis B virus-like particles danken.

Allen Mitgliedern der Arbeitsgruppe möchte ich für das wunderbare Arbeitsklima und die konstruktiven Diskussionen danken.

Candida Guckelmuß danke ich für die fachkundige und engagierte Einarbeitung in die Arbeitsabläufe eines wissenschaftlichen Labors. Besonders schätze ich auch heute noch die kompetenten Ratschläge zur Lösung technischer und methodischer Probleme.

Sowohl für die tatkräftige Unterstützung bei der Probandenaquirierung, als auch für die Hilfe zur Einreichung und Vorstellung meiner ersten Kongressbeiträge und Publikationen danke ich Dr. med. Martin Janssen.

Besonderer Dank gilt zudem meinem Doktorvater PD Dr. med. Urban Sester und Prof. Dr. rer. nat. Martina Sester, die mich beide die Grundsätze und Prinzipien wissenschaftlichen Arbeitens lehrten und mir in ihrem Labor die Möglichkeit boten meine wissenschaftlichen Interessen zu verfolgen. Die Hilfe zur Bearbeitung statistischer Fragestellungen und die Vermittlung der Grundlagen zur Verfassung wissenschaftlicher Arbeiten habe ich neben der Bereitschaft zur Diskussion, der konstruktiven Kritik und letztlich der Freiheit zur selbstständigen Bearbeitung eigener Fragestellungen immer sehr geschätzt.

Mein abschließender Dank gilt meiner Familie, die mich stets unterstützt hat, mein Studium ermöglichte und mir neben meiner klinischen Tätigkeit die Freiheit zur eigenen Forschung gibt. Besonders möchte ich hier meinem Mann und meiner kleinen Tochter danken.

12 Lebenslauf

Persönliche Daten

Name: Janine Mihm geb. Mohrbach
Geburtsdatum und -ort: 26.06.1985 in Neunkirchen / Saar

Schulische Ausbildung und Studium

1992-1996 Grundsschule Furpach
1996-2002 Kreisrealschule Neunkirchen-Wellesweiler
Abschluss: Mittlere Reife (1,1)
2002-2005 Gymnasium am Krebsberg, Neunkirchen
Abschluss: Allgemeine Hochschulreife (1,1)
2005-2011 Studium der Humanmedizin, Universität des Saarlandes
09/2007 erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung (2,0)
2010-2011 Praktisches Jahr, Universitätsklinikum des Saarlandes
06/2011 Teilnahme an der 61. Jahrestagung der Nobelpreisträger in Lindau
12/2011 zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung (2,0)

Beruflicher Werdegang

Seit 03/2012 Assistenzärztin an der Klinik für Innere Medizin IV, Universitätsklinikum des Saarlandes
09/2012 Aufnahme in das Exzellenzprogramm für Wissenschaftlerinnen an der Universität des Saarlandes
01-10/2013 Freistellung im Rahmen eines klinischen Forschungsstipendiums der Universität des Saarlandes in Kooperation mit dem Institut für Transplantations- und Infektionsimmunologie (Prof. Dr. rer. nat. Martina Sester)
Forschungsprojekt: Untersuchung der Rolle von CD27 in der Pathogenese der urämischen Immundysfunktion