

Aus dem Institut für Immunologie und Transfusionsmedizin
der Universität zu Lübeck

Direktor: Prof. Dr. med. Kirchner

Charakterisierung der immunsuppressiven Effekte
von Sirolimus im menschlichen Vollblut

Inauguraldissertation
zur
Erlangung der Doktorwürde
der Universität zu Lübeck

Aus der Medizinischen Fakultät

vorgelegt von Kristina Wortmeier
aus Bielefeld

Lübeck 2006

1. Berichterstatter: Priv.-Doz. Dr. med. Michael Müller-Steinhardt

2. Berichterstatter: Prof. Dr. med. Lutz Fricke

Tag der mündlichen Prüfung: 24.11.2006

zum Druck genehmigt. Lübeck, den 24.11.2006

gez. Prof. Dr. med. Werner Solbach

- Dekan der Medizinischen Fakultät -

Inhalt

	Seite
Abkürzungen	III
1 Einführung	1
1.1 Die allogene Transplantatabstoßung	1
1.1.1 Funktion der T-Zellen bei der Transplantatabstoßung	2
1.1.2 Bedeutung der Zytokine für die Transplantatabstoßung	3
1.2 Immunsuppressive Pharmakotherapie	6
1.3 Sirolimus	7
2 Fragestellung	11
3 Material und Methoden	12
3.1 Material	12
3.2 Methoden	17
3.2.1 Vollblutansatz	17
3.2.2 Messung der Zytokin-mRNA-Expression mit RT-PCR	18
3.2.3 Messung der Zytokinsekretion mit ELISA	23
3.2.4 Messung der T-Lymphozytenproliferation mit UVID	24
3.2.5 Statistische Auswertung	26

4	Ergebnisse	27
4.1	Effekte von Sirolimus auf die Lymphozytenfunktion <i>in vitro</i>	27
4.1.1	Effekt von SRL auf die mRNA-Expression von IL-2, IL-4 und IL-6	27
4.1.2	Effekt von SRL auf die Sekretion von Zytokinen	31
4.1.3	Effekt von SRL auf die Lymphozytenproliferation	33
4.2	Kinetik und Dosisabhängigkeit der SRL-Wirkung	34
4.2.1	Effekt von SRL auf die Kinetik der Zytokin-mRNA-Expression	34
4.2.2	Dosisabhängigkeit der SRL-Wirkung	36
4.3	Wirkung der Kombination von CsA und SRL bzw. SRL-Monotherapie auf die Lymphozytenfunktion <i>ex vivo</i>	38
4.3.1	Beeinflussung der mRNA-Expression und Sekretion von IL-2	39
4.3.2	Beeinflussung der mRNA-Expression und Sekretion von IL-4	41
4.3.3	Beeinflussung der T-Zell-Proliferation	43
5	Diskussion	44
6	Zusammenfassung	57
7	Literaturverzeichnis	59
8	Danksagung	66
9	Lebenslauf	67

Abkürzungen

7 AAD	7-Amino-actinomycin D
APC	Antigen-präsentierende Zellen
ATP	Adenosintriphosphat
BrdU	Bromdesoxyuracil
B-Zellen	B-Lymphozyten
CD	Cluster of differentiation, Differenzierungsmarker
Cdk	Cyclinabhängige Kinase
CsA	Ciclosporin A
CTP	Cytosintriphosphat
Ct-Wert	Threshold concentration (Schwellenwert)
DMS	Dimethylsuberimidate
DMSO	Dimethylsulphoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DPBS	Dulbecco's Phosphate Buffered Saline
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
ELISA	Enzyme-linked immunosorbent assay
FACS	Fluorescent absorbent cell sorter
FAM	6-Carboxyfluoreszein
FITC	Fluorescein Isothiocyanat
FK-506	Tacrolimus
FKBP	FK binding protein
GTP	Guanosintriphosphat
HLA	Humane Leukozyten-Antigene
IL	Interleukin
IMDM	Iscoe's Modified Dulbecco's Medium
LPS	Lipopolysaccharid
MTX	Metothrexat
mTOR	Mammalian target of rapamycin

MuLV	Murine leucaemia virus
PBMC	Periphere mononukleäre Blutzellen
PE	Phycoerythrin
RNA	Ribonukleinsäure
RT-PCR	Reverse Transkription und Polymerasekettenreaktion
SRL	Sirolimus, Rapamycin
Taq-Polymerase	Thermophilus aquaticus-Polymerase
TAMRA	6-Carboxy-tetramethyl-rhodamin
TGF	Transforming growth factor
Th1-, Th2-Zellen	T-Helfer-Zellen der Subklassen 1 bzw. 2
TNF	Tumornekrosefaktor
T-Zellen	T-Lymphozyten
U	Umdrehungen
UTP	Uridintriphosphat
UVID	UV induzierte Detektion

1 Einführung

Das menschliche Immunsystem dient der Abwehr körperfremder Strukturen (Antigene). Dazu vermag es zwischen Selbst und Fremd zu unterscheiden und Antigene zu inaktivieren bzw. zu eliminieren. So werden auch von Mensch zu Mensch übertragene Organe (Allotransplantate) als körperfremd erkannt und zerstört. Um diese Abstoßung zu verhindern, werden Medikamente eingesetzt, die das Immunsystem unterdrücken (Immunsuppressiva). Da jedoch trotz immunsuppressiver Therapie bei einigen Patienten noch Abstoßungen auftreten und viele unter erheblichen Nebenwirkungen dieser Therapie leiden, besitzt die Entwicklung neuer Immunsuppressiva große Bedeutung für die Transplantationsmedizin. Ein neuerer Vertreter der Immunsuppressiva ist Sirolimus, dessen Effekte in dieser Arbeit näher charakterisiert werden sollen.

1.1 Die allogene Transplantatabstoßung

Es werden entsprechend ihrem Verlauf drei Typen der Transplantatabstoßung unterschieden. Die *hyperakute* Abstoßung tritt innerhalb von Minuten bis Stunden nach der Transplantation auf. Vor der Transplantation gebildete (präformierte) Antikörper, z.B. gegen Blutgruppenmerkmale des AB0-Systems, binden an Transplantat-Antigene. Die Antigen-Antikörper-Komplexe aktivieren das Komplementsystem und die Blutgerinnung. Es resultieren irreversible ischämisch-hypoxische Schäden am Transplantat. Wegen des rasanten Verlaufs führen *hyperakute* Abstoßungen trotz Therapieversuch sehr oft zum Transplantatverlust. Deshalb sind die AB0-Kompatibilität von Spender und Empfänger und das Fehlen präformierter Antikörper wesentliche Voraussetzungen der Transplantation. Unter Einhaltung dieser Kriterien kommen *hyperakute* Abstoßungen nur noch sehr selten vor. *Akute* Abstoßungen treten innerhalb von Tagen bis Monaten nach der Transplantation auf. In Studien zur Wirksamkeit von Immunsuppressiva nach Nierentransplantation wurden für *akute* Abstoßungen unter Immunsuppression Häufigkeiten von 15 % bis zu über 50 % angegeben {1, 2, 3}. Sie können meist erfolgreich behandelt werden, jedoch auch wiederholt auftreten. Für ihre Entstehung spielen T-Lymphozyten (T-Zellen) eine entscheidende Rolle.

Bei Nierentransplantierten sind *akute* Abstoßungen, die später als drei Monate nach Transplantation auftreten, mit einem stark erhöhten Risiko für die *chronische* Transplantatabstoßung assoziiert {4}. Diese Abstoßung vollzieht sich in einem jahrelangen Prozess und schädigt Gefäße und Parenchym. Sie ist wesentlich an der Entstehung der Transplantatvaskulopathie des Herzens und der chronischen Allograftnephropathie beteiligt. Diese Komplikationen stellen jeweils Hauptfaktoren für das Langzeitversagen der Transplantate dar {5, 6}. Die Pathogenese der *chronischen* Abstoßung ist noch nicht geklärt, es wird aber vermutet, dass auch hier T-Zellen aufgrund ihrer regulierenden Funktion von wesentlicher Bedeutung sind.

1.1.1 Funktion der T-Zellen im Rahmen der Transplantatabstoßung

T-Zellen erkennen Antigene über den T-Zellrezeptor (TCR, Zelloberflächenmerkmal CD3). Sie werden jedoch nur durch Antigene aktiviert, die an einen zellmembranständigen individuellen Rezeptorkomplex, das Humane Leukozyten-Antigen (HLA), gebunden sind. Zwei Klassen von HLA werden unterschieden. HLA der Klasse I werden auf fast allen Körperzellen in unterschiedlichem Ausmaß exprimiert. Sie präsentieren intrazelluläre Antigene und führen zur Aktivierung zytotoxischer T-Zellen. HLA der Klasse II sind dagegen nur an Zellmembranen professioneller antigenpräsentierender Zellen (APC) zu finden, nämlich auf B-Lymphozyten (B-Zellen), Makrophagen und dendritischen Zellen, und auf Endothelzellen. Die APC nehmen große extrazelluläre Antigene auf, zerlegen sie und präsentieren die Peptide an HLA der Klasse II gebunden den T-Helferzellen. Zusätzliche Signale zwischen APC und T-Zelle, zu denen die Bindungen von CD40-CD40Ligand und B7-CD28 gehören, können die Aktivierung der T-Helferzellen erheblich steigern. Werden diese kostimulatorischen Signale blockiert, kann die *chronische* Abstoßung von Transplantaten im Tierexperiment verhindert werden {7, 8}.

Abgesehen von eineiigen Zwillingen ist die Wahrscheinlichkeit, zwei Menschen mit identischem HLA-Genotyp zu finden sehr gering. Die für diese Glykoproteine kodierenden Gene weisen nämlich eine Vielzahl von Allelen auf. Aufgrund ihrer Spezifität für einen Menschen werden die HLA des Organspenders im Körper des

Empfängers selbst als Antigene erkannt und zählen zusammen mit den ABO-Merkmalen zu den stärksten Alloantigenen. Neben den HLA gibt es noch viele weitere Alloantigene (minor histocompatibility-Antigene), deren Bedeutung bisher noch weitgehend unbekannt ist.

Nach der Transplantation können Alloantigene auf zwei Wegen den T-Zellen des Empfängers präsentiert werden, zum einen direkt durch Spender-APC und zum anderen indirekt durch Empfänger-APC. Die Präsentation von intakten HLA Klasse I-Molekülen auf Spender-APC führt zur Aktivierung zytotoxischer T-Zellen. Auch die Präsentation von Alloantigenen, die an HLA Klasse II-Moleküle der Spender-APC gebunden sind, kann über die Aktivierung von T-Helferzellen des Typs 1 (Th1-Zellen) eine zytotoxische Antwort auslösen. Werden prozessierte Spender-HLA dagegen an Empfänger-HLA-Klasse II-Moleküle gebunden auf Empfänger-APC präsentiert, aktiviert dies T-Helferzellen des Typs 2 (Th2-Zellen), die wiederum B-Zellen zur Antikörperbildung aktivieren. Während zytotoxische T-Zellen offenbar wichtige Effektorzellen der *akuten* Transplantatabstoßung sind, mehren sich Hinweise darauf, dass die Alloantikörperproduktion durch B-Zellen an der Entwicklung der *chronischen* Abstoßung stark beteiligt ist [9]. T-Helferzellen besitzen durch die Sekretion sowohl T-Zell-stimulierender als auch B-Zell-aktivierender Zytokine ein bedeutendes regulatorisches Potential. Dasselbe Oberflächenmerkmal wie die CD4-positiven T-Helferzellen tragen regulatorische T-Zellen. Sie entstehen, wenn naive T-Zellen mehrfach Kontakt mit unreifen APC haben und vermitteln durch Ausschüttung inhibitorischer Zytokine Toleranz.

1.1.2 Einfluss von Zytokinen auf die Transplantatabstoßung

Zytokine dienen als Botenstoffe zwischen den Zellen des Immunsystems, können aber auch andere Körperzellen direkt beeinflussen, sofern sie Rezeptoren für das jeweilige Zytokin besitzen. Zu den Zytokinen zählen die Interleukine (IL), Interferone (IFN), der Transformierende Wachstumsfaktor β (TGF- β) und Tumornekrosefaktoren. Im Zusammenhang mit der Produktion und der Funktion von Zytokinen spricht man häufig von einem Netzwerk. Einige Zytokine werden jeweils von mehreren Zelltypen gebildet, viele haben mehr als eine Funktion und wirken auf unterschiedliche Zelltypen – manche sogar in paradoxer Weise.

Wichtige immunregulierende Signalwege werden durch mehrere, synergistisch wirkende Zytokine induziert.

Für die *akute* Abstoßung spielen die Th1-Zellen eine bedeutende Rolle. Aktivierte Th1-Zellen setzen IFN- γ , IL-12 und IL-2 frei. IFN- γ aktiviert zytotoxische Funktionen von Makrophagen und führt durch die Erhöhung der HLA-Dichte auf APC zu einer Verstärkung der Antigenpräsentation. Es hemmt die Differenzierung naiver T-Zellen zu Th2-Zellen und fördert daher wie IL-12 die Differenzierung zu Th1-Zellen. Beide Zytokine aktivieren darüber hinaus zytotoxische T-Zellen. IL-2 ist einer der wichtigsten Proliferationsstimuli für T-Zellen. Es wirkt sowohl auf die produzierenden Zellen selbst (autokrin) als auch auf andere T-Zellen (parakrin) {10}.

Th2-Zellen können über die Ausschüttung von IL-4, IL-5, IL-6 und IL-10 B-Zellen und Mastzellen aktivieren und dadurch zur *hyperakuten* Abstoßung beitragen, andererseits aber auch die Aktivierung von Makrophagen hemmen. IL-4 und IL-6 steuern die Differenzierung naiver T-Zellen zu Th2-Zellen. Auch IL-10 fördert diese Differenzierung, da es die Synthese von IL-12 hemmt {11}. Groux beschrieb, dass sich aus chronisch aktivierten CD4-positiven T-Zellen unter IL-10 regulatorische T-Zellklone entwickeln. Diese T-Zellen produzieren sehr viel IL-10, jedoch kaum IL-2 und kein IL-4 {12}. Andere regulatorische T-Zellen sezernieren außer IL-10 noch TGF- β , ein Zytokin, das sämtliche Immunfunktionen hemmt, jedoch das Bindegewebswachstum sowie die Kollagensynthese stimuliert {13}. Ein Zusammenhang zwischen TGF- β und der Fibrosierung von Transplantaten im Rahmen der chronischen Allograftnephropathie wird diskutiert {14}.

Zytokine sind also sowohl an *hyperakuten*, *akuten* Abstoßungen und chronischen Transplantatschäden beteiligt, wie auch an der Entstehung von Toleranz. Die quantitative Bestimmung der Zytokinproduktion reflektiert die Koordination der Immunantwort sowie die Beeinträchtigung der T-Zell-Aktivierung und T-Zellfunktion durch Immunsuppressiva. Verglichen mit histologischen Untersuchungen des Transplantatzustands ist die Messung der Zytokinproduktion wenig invasiv und mit geringerem Aufwand durchführbar, daher wäre sie auch zur regelmäßigen Therapiekontrolle prinzipiell geeignet. Gegenüber der Bestimmung der Konzentrationen von Immunsuppressiva im Blut kann die quantitative Analyse der Zytokinproduktion die Wirkung dieser Immunsuppressiva individuell angeben

und Kombinationseffekte bei gleichzeitigem Einsatz mehrerer Immunsuppressiva aufzeigen. Sie könnte Ursachen eines unterschiedlichen Ansprechens auf Immunsuppressiva aufdecken und dazu beitragen, Abstoßungen, chronische Transplantatschäden und zu starke Immunsuppression zu vermeiden oder zumindest frühzeitig zu erkennen.

Nachfolgend werden die in dieser Arbeit bestimmten Zytokine näher dargestellt.

Interleukin-2:

IL-2 ist ein 15 kDa großes Protein, das von aktivierten T-Zellen gebildet wird {15}. Rezeptoren für IL-2 finden sich auf T-Zellen, auf B-Zellen und auf aktivierten Makrophagen. Es ist der Hauptwachstumsfaktor für T-Zellen, besonders *in vitro*. Nur die regulatorischen T-Zellen proliferieren in Gegenwart von IL-2 kaum, aber auch für ihr Überleben ist dieses Zytokin nötig. Auch auf B-Zellen wirkt IL-2 wachstumsfördernd und induziert die J-Kettensynthese, die die Produktion besonderer Typen von Antikörpern ermöglicht. Aktivierte Makrophagen erhalten durch IL-2 zytotoxische Eigenschaften.

Interleukin-4:

IL-4 ist ebenfalls 15 kDa groß, wird von T-Zellen und Mastzellen gebildet und bewirkt als B-Zellwachstumsfaktor die Teilung und Differenzierung von B-Zellen {16}. Sie produzieren infolge vermehrt IgE und IgG1 und exprimieren mehr Fc-Rezeptoren und HLA Klasse II-Komplexe auf ihrer Oberfläche. Dadurch wird ihre Fähigkeit Antigene zu präsentieren erhöht. IL-4 begünstigt ferner das Wachstum von Mastzellen und T-Zellen.

Interleukin-6:

IL-6 ist ein 20 kDa großes Glykoprotein, das durch Makrophagen, T-Zellen und Fibroblasten gebildet wird {17}. Es bewirkt Wachstum und Differenzierung der B- und T-Zellen und veranlasst die Produktion von Akutphase-Proteinen in Leberzellen. Dies sind Plasmaproteine, die in vielfältiger Weise in den Ablauf der akuten Entzündungsreaktion eingebunden sind. Außerdem bewirkt IL-6 die Proliferation von Mesangialzellen.

1.2 Immunsuppressive Pharmakotherapie

Zum Schutz des transplantierten Gewebes vor dem Immunsystem des Transplantatempfängers ist die Transplantationsmedizin auf den Einsatz und die Entwicklung immunsuppressiver Pharmaka angewiesen.

Zeitgleich mit dem Beginn der Gewebstypisierung von Transplantatspendern und -empfängern kam Anfang der 1960er Jahre Azathioprin als erstes Immunsuppressivum zur Anwendung nach Nierenallotransplantation und führte in Kombination mit Kortikosteroiden zu einem deutlich verlängerten Transplantatüberleben. Nachdem 1978 Ciclosporin A (CsA) zugelassen wurde, nahm innerhalb von 10 Jahren die Anzahl der jährlich in Deutschland durchgeführten Nierentransplantationen um mehr als das dreifache zu.

CsA und das 1990 zugelassene Tacrolimus (FK-506) hemmen Calcineurin. Diese Serin-Threonin-Phosphatase wird durch den Anstieg des intrazellulären Calciums infolge der Bindung von Antigen an den TCR aktiviert. Sie ermöglicht den Übertritt der im Zytosol gelegenen Komponente des nuclear factor of activated T-cells (NFAT) in den Zellkern. Dort bilden sie mit der nukleären Komponente den Transkriptionsfaktor NFAT, der die Transkription des IL-2 Gens und anderer für die T-Zellaktivierung bedeutender Gene induziert. Verschiedene Interaktionen zwischen Oberflächenmolekülen der T-Zelle und der APC können die Transkription entscheidend verstärken. Die Kostimulation über die B7-CD28-Bindung ist so stark, dass die Proliferation der kostimulierten T-Zellen durch Calcineurininhibitoren viel weniger gehemmt wird als die Proliferation nicht kostimulierter Zellen {18}. Dieser kostimulatorische Signalweg ist durch CsA und FK-506 allerdings individuell verschieden stark beeinflussbar. Dies ist ein Erklärungsansatz für die klinische Erfahrung, dass bei einigen Nieren-Transplantierten unter therapeutischen Konzentrationen der Calcineurininhibitoren Abstoßungsepisoden auftreten, während der Großteil der Transplantierten unter denselben Konzentrationen offenbar angemessen immunsupprimiert ist {19, 20}.

Neben CsA und FK-506 zählen heute die Steroide, Antimetabolite wie Azathioprin und Methotrexat, das Alkylans Cyclophosphamid und Antikörper wie OKT3, Antithymozytenglobulin und Basiliximab zum Repertoire der Immunsuppressiva. Aufgrund der immunsuppressiven Wirkung steigern sie alle die Infektanfälligkeit

und das Risiko für Neoplasmen. Darüber hinaus treten bei immunsupprimierten Patienten weitere für das jeweilige Medikament typische, zum Teil schwerwiegende Nebenwirkungen auf. Die Calcineurinantagonisten wirken stark nephrotoxisch {14, 21, 22}. Bei Therapie mit CsA tritt oft auch ein arterieller Hypertonus auf. Unter Therapie mit FK-506 treten häufiger neurologische Krankheitsbilder auf.

1.3 Sirolimus

Auf der Suche nach nebenwirkungsärmeren, wirkungsstärkeren Immunsuppressiva kam dem bereits 1975 aus Bodenproben der Osterinseln isolierten Sirolimus (Rapamycin, SRL) neues Interesse zu. Dabei handelt es sich um ein dem FK-506 ähnliches makrozyklisches Lakton, das ebenfalls an das FK-Bindungsprotein (FKBP) 12 bindet. Im Gegensatz zu FK-506 hemmt der SRL-FKBP 12-Komplex jedoch nicht Calcineurin, sondern das mammalian target of Rapamycin (mTOR) {23}. Dieses 289 kDa große Protein besitzt eine C-terminal gelegene Proteinkinase. Oberhalb liegt die Bindungsstelle des SRL-FKBP12-Komplexes {24}. Er hemmt die Autophosphorylierung und somit die Aktivierung von mTOR durch Zytokine und Wachstumsfaktoren.

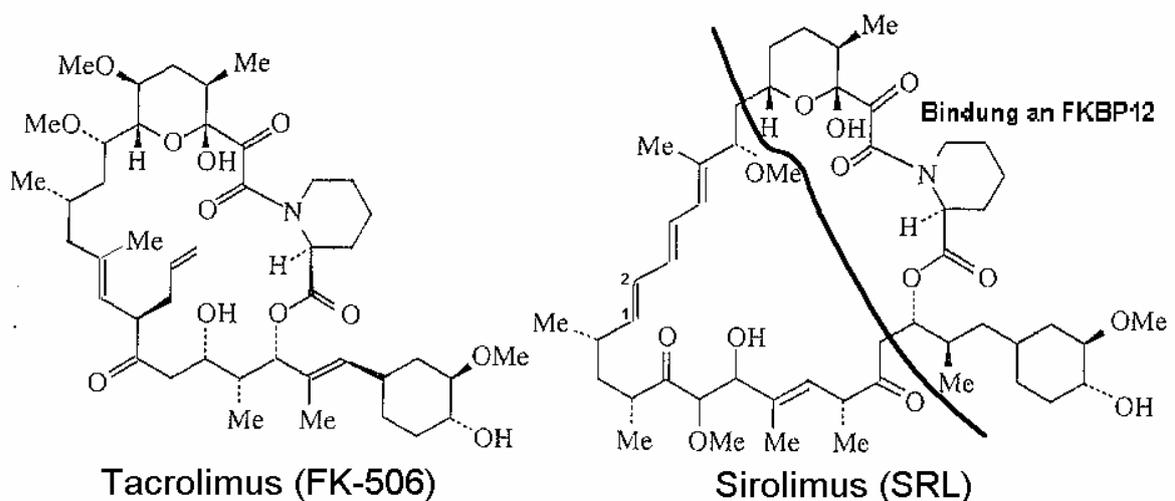


Abb.1 Sirolimus und FK-506 besitzen identische Strukturbereiche, die an FKBP12 binden. Die entstehenden Komplexe wirken auf unterschiedliche Ziele. (nach {72})

Wichtige Wege der Zellaktivierung und der Proliferation werden durch mTOR reguliert und bieten daher Angriffspunkte für die Therapie mit SRL. SRL hemmt die durch mTOR aktivierte p70s6-Kinase {25, 26}. Sie fördert die Translation von Zytokin-mRNAs und steuert den für die Replikation der DNA notwendigen eukaryontischen Elongationsfaktor 2. Die Translation von Wachstumsfaktoren wird durch SRL über die Hemmung von eukaryontischen Initiationsfaktor 4E entscheidend vermindert {27}. SRL hemmt auch die durch CD28 vermittelte Transkription der Zytokingene {28}. Durch die verringerte Produktion Wachstumsfördernder Proteine wird die Zellproliferation indirekt verlangsamt. Auch direkt hält SRL das Fortschreiten des Zellzyklus am Übergang zur Synthesephase auf, indem es die Elimination der Inhibitoren p21 und p27kip1 verhindert {29, 30}. Es resultiert eine verminderte Synthese von Zellzyklusproteinen und dadurch der Arrest des Zellzyklus in der G1-Phase.

SRL wurde 2001 unter dem Namen Rapamune[®] von der europäischen Zulassungsstelle EMEA für Deutschland als selektiv immunsuppressiver Stoff zur Prophylaxe der Organabstoßung nach Nierentransplantation bei Erwachsenen mit geringem bis mittlerem Abstoßungsrisiko zugelassen. Initial soll die Therapie mit Kortikosteroiden und CsA kombiniert erfolgen und anschließend CsA abgesetzt werden.

Wie die Calcineurinantagonisten wird auch SRL nach der Talspiegelkonzentration, d.h. nach der Konzentration des Medikaments im Blut unmittelbar vor der nächsten Medikamenteneinnahme, dosiert. Die empfohlenen Talspiegelkonzentrationen liegen bei Kombination von SRL und CsA im Bereich von 4-12 ng/ml SRL und nach Absetzen von CsA bei 12-20 ng/ml SRL. Neben der Talspiegelkonzentration sollen auch der klinische Verlauf und Laborparameter des Patienten bei der Dosisanpassung berücksichtigt werden. In der Regel führt die Einnahme von 2-5 mg SRL pro Tag zu den angegebenen Talspiegelkonzentrationen. Es existieren deutliche interindividuelle Unterschiede in der Pharmakokinetik {31}: Die terminale Halbwertszeit schwankt zwischen 46 und 78 Stunden und variiert aufgrund der Metabolisierung über das CYP 3A4 auch intraindividuell. Das Verteilungsvolumen beträgt 7-17 l/kg und das Blut-Plasma-Verhältnis ist mit 25 bis 51 sehr hoch. Da SRL außerdem zu 92 % an

Plasmaproteine gebunden ist, ist der freie Anteil des Medikaments im Blut gering {32}.

Neben den Ergebnissen der Anwendung von SRL in Tiermodellen und den Daten zur Pharmakokinetik gibt es bisher nur wenige klinische Studien. In zwei großen, multizentrischen Phase III Studien erhielten mit CsA und Prednisolon behandelte Nierentransplantierte zusätzlich SRL in zwei verschiedenen Dosen (2 mg und 5 mg) oder Azathioprin bzw. Placebo {1, 2}. Beide Untersuchungen belegen unter der Kombination mit SRL weniger *akute* Abstoßungen und auch weniger mäßige und schwere Abstoßungen in den ersten sechs Monaten. Das Patienten- und Transplantatüberleben war in allen Studiengruppen im ersten Jahr gleich. Unter der Kombination von SRL, FK-506 und initial Steroiden trat nur bei einem von 32 Patienten nach Leber-, Nieren- oder Pankreastransplantation eine Abstoßung auf {33}. Die Wirksamkeit von SRL zur Behandlung der Steroid- und Antikörperrefraktären Abstoßung von Nierentransplantaten konnte im Vergleich mit Mycophenolatmofetil nachgewiesen werden {34}. In der mit SRL behandelten Gruppe kehrte in 96 % die Nierenfunktion wieder, in der anderen Gruppe dagegen nur in 67 %. Die Rückfallraten und das Patienten- und Transplantatüberleben nach einem Jahr unterschieden sich nicht wesentlich. Im Vergleich der Kombinationen FK-506 / SRL, FK-506 / Mycophenolatmofetil und CsA / SRL wurde bei den 150 Patienten nach einem Jahr kein Unterschied im Patienten- und Transplantatüberleben beobachtet, jedoch zeigte die Kombination von CsA und SRL eine schlechtere Nierenfunktion und mehr Nebenwirkungen als die anderen beiden Kombinationen {35}. Ebenso wurde in einer multizentrischen Studie nachgewiesen, dass die Nierenfunktion und auch die Histologie von Nierenbiopsien der Patienten des Studienarms, in dem CsA drei Monate nach Beginn der SRL-Therapie abgesetzt wurde, besser war als diejenige der Patienten, die weiterhin mit der Kombination von CsA und SRL behandelt wurden {36, 37}. Hinsichtlich des Patienten- und Transplantatüberlebens konnte in dieser und auch in einer weiteren Studie, die nach Induktion mit Basiliximab und unter Erhaltungstherapie mit Mycophenolatmofetil die Wirkung von CsA versus SRL prüfte, kein Unterschied festgestellt werden {38}. Jedoch wies auch diese Studie auf eine bessere Nierenfunktion unter SRL als unter CsA hin. Im Hinblick auf die Nephrotoxizität von CsA wurden Protokolle geprüft, die bei Nierentransplantierten mit verspätetem Einsetzen der Transplantatfunktion eine Calcineurininhibitor-freie

Induktions-Therapie und den Beginn der Therapie mit CsA erst nach Einsetzen der Nierenfunktion vorsahen. Die Kombinationen von Basiliximab bzw. Antithymozytenglobulin, Steroiden und SRL bewirkten eine rasche Erholung der Nierenfunktion bei geringem Risiko für Episoden *akuter* Abstoßungen {39, 40, 41}. Überzeugt von den Möglichkeiten, die SRL in der Anwendung bei erwachsenen Nierentransplantierten bietet, führten Tejani et al. kürzlich auch eine Phase I-Studie mit pädiatrischen Patienten durch {42}.

Häufige Nebenwirkungen der Therapie mit SRL sind Hyperlipidämie, periphere Ödeme, Diarrhö, Anämie und Thrombozytopenie, Hypokaliämie, Anstieg der Laktatdehydrogenase, Arthralgien, Akne und Harnwegsinfekte {43}. Sie treten bei mehr als 10 % der Patienten auf. Seltener kommen gefährliche Nebenwirkungen wie Sepsis, Hämolytisch-Urämisches Syndrom und nichtinfektiöse Lungenentzündung vor {44}. Im Gegensatz zu den Calcineurininhibitoren wurden unter SRL-Therapie bisher keine nephrotoxischen Nebenwirkungen festgestellt, allerdings wirkt die Kombination von SRL und CsA bei Anwendung über mehr als drei Monate stärker nephrotoxisch als die CsA-Monotherapie. Wie bei allen immunsuppressiven Substanzen ist das Risiko für Lymphome und Tumoren erhöht, jedoch wies eine multizentrische Studie mit 1295 immunsupprimierten Patienten unter SRL weniger Tumoren als unter Placebo und auch weniger Tumoren als bei Therapie mit CsA nach {45}. Im Gegensatz zu CsA, das die Produktion von vaskulärem Endothelzellwachstumsfaktor (VEGF) in Mäusen steigert und dadurch die Tumorangiogenese vorantreibt, wurden in Mausmodellen unter 39 ng/ml SRL eine Abnahme der VEGF-Produktion und durch die verminderte Angiogenese eine Hemmung des Wachstums bestehender Tumoren beobachtet {46}. Die antiangiogenetische Wirkung von SRL hat allerdings wahrscheinlich auch Anteil an der Pathogenese der Wundheilungsstörungen, die unter SRL häufiger als bei Therapie mit Calcineurininhibitoren auftreten {47}. Die antiproliferative Wirkung von SRL wird therapeutisch zur Prävention von Restenosen in Koronarstents genutzt {48}. Die Wirkung von SRL auf Tumoren und der Einsatz von SRL zur Therapie von Tumoren wurde bisher nur ansatzweise in experimentellen und klinischen Studien geprüft {49, 50, 51}.

2 Fragestellung

Die Therapieüberwachung und die individuelle Dosisanpassung sind wesentliche Problempunkte in der Anwendung von SRL. Trotz Ausrichtung der Therapie an engmaschig durchgeführten Blutspiegelkontrollen treten einerseits *akute* Abstoßungsepisoden und andererseits schwerwiegende Nebenwirkungen auf.

In dieser Arbeit soll anhand folgender Fragestellungen die individuelle pharmakodynamische Wirksamkeit von SRL untersucht und damit Voraussetzungen für die Entwicklung einer verbesserten individuellen Überwachung der immunsuppressiven Pharmakotherapie geschaffen werden.

Wie wirkt sich SRL *in vitro* auf die Lymphozytenfunktion aus?

In Vollblutkulturen gesunder Probanden sollte der Effekt von SRL auf die mRNA-Expression von IL-2, IL-4 und IL-6, auf die Sekretion dieser Zytokine und auf die Lymphozytenproliferation individuell untersucht werden.

Ist der Effekt auf die Lymphozytenfunktion dosisabhängig und wann ist er maximal?

Unter Einsatz verschiedener therapeutisch relevanter Konzentrationen von SRL und durch Anfertigen von Kinetiken sollte eine Dosisabhängigkeit der Zytokin-mRNA-Expression und der Zytokinsekretion geprüft und der zeitliche Verlauf beschrieben werden.

Wie verändert sich die Lymphozytenfunktion bei der Umstellung Nierentransplantierter von CsA auf SRL?

Anhand von nierentransplantierten Patienten sollten der Einfluss von SRL-Zusatz *in vitro* zu bestehender CsA-Therapie, die Effekte der Kombinationstherapie von SRL und CsA *ex vivo* und die Wirkung der SRL-Monotherapie *ex vivo* untersucht und mit dem Effekt der CsA-Monotherapie verglichen werden.

3 Material und Methoden

3.1 Material

Geräte

Pipetten, Eppendorf, Hamburg

Sarstedt Serological Pipette, 10ml, Sarstedt, Nümbrecht

Multipette, Eppendorf, Hamburg

Finnpipette Digital Multichannel, Labsystems, Finnland

6-Loch-Kulturplatten: TC-Plate 6 Well, Einzellochdurchmesser 35 mm, Cellstar, greiner bio-one

Gewebekulturflaschen: Tissue Culture Flask 25 cm², Sarstedt, Nümbrecht

Reagiergefäße: PP Test tubes 50 ml, 15 ml Cellstar, greiner bio-one

Mikro-Schraubröhre 1,5 ml PP, Sarstedt, Nümbrecht

MicroAmp Optical Tubes and Optical Caps, Applied Biosystems, Foster City, USA

Reagiergefäße 1,5 ml, Sarstedt, Nümbrecht

PS Röhrrchen 5 ml, 12,0/75 mm, greiner bio-one

Vortexer Reax 2000, Heidolph, Kelheim

Tischzentrifuge Biofuge 13, Heraeus, Hamburg

Centrifuge 5416, Eppendorf, Hamburg

Varifuge RF, Heraeus Sepatech, Osterode

Varifuge 3.2RS, Heraeus Sepatech, Osterode

PH-Meter pHM 83 Autocal, Radiometer, Kopenhagen, Dänemark

Magnetrührer, Gerhardt, Bonn

Brutschrank, Labotect, Göttingen

Hood, Heraeus Lamintir HA 2472-GS, Heraeus, Hamburg

UV-Lampe, Herolab, Wiesloch

ABI Prism 7700 Sequence Detection System, Perkin Elmer Cetus, Norwalk, USA

Vollblut-Zellzähler Coulter T660, Coulter Electronics GmbH, Krefeld

Columbus ELISA-Washer, TECAN, Crailsheim

Photometer für Mikrottestplatten Anthos 2001, anthos Mikrosysteme GmbH, Krefeld

Reagenzien

- Vollblutansätze

IMDM, Bio Whittaker, Verviers, Belgien

Penicillin-Streptomycin DE 17-602, Bio Whittaker, Verviers, Belgien

L-Glutamin, BE 17605 E, Bio Whittaker

Sirolimus: Rapamune[®], Wyeth Europa Ltd., Taplow, Maidenhead UK

Dimethylsulphoxid Sigma D2650, Sigma, Deisendorf

monoklonale Mausantikörper:

anti-CD3 2µg/µl PeliCluster clone CLB-T3/4.E, Sanguin Amsterdam

anti-CD28 2µg/µl PeliCluster clone CLB-CD28/1, Sanguin Amsterdam

LPS Sigma L-4310, 10 mg, Sigma, Deisendorf

- RNA-Isolierung

Hämolysepuffer pH 8,0: NH₄Cl, KHCO₃, EDTA

Trypsin Versene, Bio Whittaker, Verviers, Belgien

Purescript RNA Isolierungskit für Vollblutproben, Gentra Systems (Gentra R-5000), Biozym Diagnostik GmbH, Hessisch Oldendorf

- Mastermix für die RT-PCR

Von Applied Biosystems, Foster City, Kalifornien, USA wurden bezogen:

TaqMan[®] 1000 Rxn Gold / Buffer A Pack: Taq-Polymerase, MgCl, Taq-Puffer A

MuLV reverse Transkriptase, Gene Amp[®] RNA PCR

RNAse Inhibitor, Gene Amp[®] RNA PCR

Gene Amp[®] dNTPs with UTP.

Primer und Sonden wurden von TIB MOLBIOL, Berlin hergestellt:

IL-2, sense	5' – gAA Tgg AAT TAA TAA TTA CAA gAA TCC C
IL-2, antisense	5' – gAC ACT gAA gAT gTT TCA gTT CTg T
IL-2, Sonde	5' – 6FAM-Agg ATg CTC ACA XT TT AAg TTT TAC ATg CCC p
IL-4, sense	5' – AAC AgC CTC ACA gAg CAg AAg ACT
IL-4, antisense	5' – gCC CTg CAg AAg gTT TCC TT
IL-4, Sonde	5' – 6FAM-TgC TgC CTC CAA gAA CAC AAC TgA XT p
IL-6, sense	5' – CAg CCC TgA gAA Agg AgA CAT g
IL-6, antisense	5' – ggT TCA ggT TgT TTT CTg CCA
IL-6, Sonde	5' – 6FAM-AgT AAC ATg TgT gAA AgC AgC AAA gAg gCA XT—PH

- ELISA:

Quantikine® human IL-6 Immunoassay, R&D Systems, Minneapolis, USA

human IL-4 ELISA, Bender MedSystems, Wien, Österreich

human IL-2 ELISA, Bender MedSystems, Wien, Österreich

- UVID

Biocoll Separation Solution, Seromed Biochrom, Berlin

BrdUrd, Fluka Biochemica

Dulbecco's Phosphate Buffered Saline, BioWhittaker, Verviers, Belgien

PE anti-human CD4, LOT M069634, PharMingen, Becton Dickinson Labware, Franklin Lakes, USA

Dimethylsuberimidate, Sigma D7636, Deisendorf

N-Methylformamid purum, Fluka Chemica 66900

Borax, Sigma, Deisendorf

Maus anti-Bromodeoxyuridine/ FITC, clone Bu20a, DAKO

7-Amino-actinomycin D, Sigma A-9400, 5mg/10ml, Sigma, Deisendorf

Blutproben

Für die Untersuchungen zur Wirkung von SRL auf die Lymphozytenfunktion gesunder Personen *in vitro* wurden Blutproben 16 gesunder Probanden, die Blutspender des Instituts für Immunologie und Transfusionsmedizin des UK-SH Lübeck (Direktor Prof. Dr. med. Kirchner) sind, eingesetzt.

Von Patienten der Station 19 T (jetzt 11 T) des UK-SH, Campus Lübeck (Leitung Prof. Dr. med. Fricke) wurden Blutproben jeweils vor, während und nach Umstellung der immunsuppressiven Therapie nach Nierentransplantation von CsA auf SRL zur Verfügung gestellt. Vor der Umstellung konnten Parameter der Lymphozytenfunktion unter CsA *ex vivo* bestimmt werden. Parallel dazu wurde die Wirkung eines Zusatzes von SRL (*in vitro*) auf diese Parameter gemessen. Ab Beginn der Umstellung nahmen die Patienten kein CsA mehr ein, so dass während der Umstellung die CsA-Konzentration im Blut sank. Stattdessen erhielten die Patienten SRL, Patient Nr. 1 anfangs in hoher Dosis (10 mg), die übrigen Patienten in einer Dosierung von 3 mg bis 5 mg. Mindestens 21 Tage nach Ende der CsA-Einnahme wurden nochmals Blutproben untersucht. Da CsA eine Halbwertszeit von 8 bis maximal 17 Stunden hat, war zu diesem Zeitpunkt theoretisch weniger als ein Millionstel der zu Beginn der Umstellung gemessenen Talspiegelkonzentration CsA im Blut vorhanden, so dass die Ergebnisse dieser Messungen weitgehend den Effekt von SRL *ex vivo* reflektieren.

Die Blutproben wurden in Lithium-Heparin-gefüllten Monovetten abgenommen und innerhalb von zwei Stunden nach Abnahme verarbeitet.

3.2 Methoden

3.2.1 Vollblutansatz

Der angewandte Vollblutstimulationsansatz basiert auf dem Protokoll von Härtel et al., das zur quantitativen Analyse der Expression von T-Zell-Zytokinen erstellt wurde {52}. In allen Versuchsansätzen wurden die Vollblutproben 1:10 mit Kulturmedium verdünnt und mit anti-CD3 und anti-CD28 monoklonalen Mausantikörpern stimuliert. Der Gebrauch dieser Antikörper ahmt die antigenspezifische Stimulation von T-Zellen nach {53}. Zur Messung der IL-6 Produktion durch Makrophagen wurde den entsprechenden Ansätzen als Stimulans Lipopolysaccharid (LPS) anstelle der Antikörper zugesetzt. Die Ansätze für die Zytokin-mRNA-Messung durch RT-PCR wurden jeweils doppelt angesetzt. Die Überstände dieser Ansätze wurden mit den ELISA auf ihre Zytokinkonzentration untersucht. Zur Bestimmung der Lymphozytenproliferation mittels UVID wurden Einzelansätze in Kulturflaschen für 72 Stunden inkubiert (Proliferationsansätze).

Protokoll:

- In eine 6-Lochkulturplatte je Ansatz 9 ml Kulturmedium und 10 µl SRL-Stammlösung der gewünschten Konzentration vorlegen und nach Zugabe von 1 ml Lithium-Heparin-Vollblut gut mischen.
- Die Ansätze bei 37 °C und 5 % CO₂ für 2 Stunden vorinkubieren.
- Jeden Ansatz mit 5 µl anti-CD3 und 5 µl anti-CD28 bzw. mit 1 µg LPS stimulieren und gut mischen.
- Die Ansätze bei 37 °C und 5 % CO₂ für 4, 8 oder 24 Stunden inkubieren.

Kulturmedium:

500 ml IMDM, 500 U Penicillin, 500 µg Streptomycin, 10 mM L-Glutamin

SRL-Stammlösung:

10, 20, 50 µg/ml Lyophilisat in DMSO gelöst

3.2.2 Bestimmung der Zytokin-mRNA-Kopienzahlen mit quantitativer RT-PCR

Zunächst müssen die Leukozyten aus den inkubierten Ansätzen präpariert werden. Danach kann aus diesen Zellen die Zytokin-mRNA isoliert und anschließend mittels der Echtzeit-RT-PCR quantitativ analysiert werden.

Präparation der Leukozyten

- Die Ansätze jeweils mit einer 10 ml Pipette aufnehmen und in ein 50 ml Reagiergefäß überführen.
- Die an der Platte adhärenen Zellen mit 1 ml Trypsin je Ansatz bei 37 °C 10 min lösen und anschließend zum jeweiligen Ansatz hinzugeben.
- Jedes Reagiergefäß mit Hämolysepuffer auf 50 ml auffüllen und die Ansätze bei Raumtemperatur 30 min lysieren.
- Bei 1500 U, 300g, 10 °C, brake 8 10 min zentrifugieren und den Überstand abkippen.
- 500 µl Hämolysepuffer zugeben, das Pellet lösen und in ein 1,5 ml Schraubgefäßröhrchen überführen.
- Bei 8000 U 1 min zentrifugieren und den Überstand gründlich abpipettieren.
- 1 ml Hämolysepuffer zugeben, das Pellet lösen und erneut 1 min zentrifugieren.
- Den Überstand abpipettieren und 100 µl IMDM zugeben.
- Das Pellet möglichst gut lösen und bei – 80 °C einfrieren.

Hämolysepuffer pH 8,0:

NH₄Cl 16,52 g

KHCO₃ 2,0g

EDTA 0,08g

Aqua dest ad 2 l

RNA-Isolierung

Die Isolierung der RNA erfolgte mit einem kommerziellen Kit der Firma Gentra, Missouri, USA. Zuerst werden die aufgetauten Zellen lysiert. Anschließend werden Proteine und DNA ausgefällt und abzentrifugiert. Die im Überstand befindliche RNA wird mit Isopropanol ausgefällt und nach Waschung mit Ethanol in RNase-freiem Wasser gelöst. Da im Anschluss die Quantität der RNA bestimmt und verglichen werden sollte, wurde bei der Isolierung größter Wert auf die Vermeidung von RNA-Verlusten und Kontamination durch DNA sowie auf die Gleichbehandlung der Proben gelegt. Deshalb wurden die Proben durchgängig auf Eis gekühlt und in keim- und staubarmer Umgebung verarbeitet. Nach Möglichkeit wurde eine konstante Anzahl von Proben gleichzeitig isoliert.

Protokoll:

- Die auftauenden Zellen mindestens 30 sec lang rütteln. – Es sollten hiernach keine großen Zellklumpen vorhanden sein.
- 450 µl Cell lysis solution zugeben und mit der Pipette vorsichtig mischen. – Dabei darauf achten, dass möglichst wenige Zellen an der Pipettenspitze adhären.
- 150 µl Protein-DNA-Precipitation Solution zugeben und vorsichtig aber gründlich mischen.
- Die Röhrchen 5 min auf Eis stellen und anschließend 4 min bei 15.000 U zentrifugieren.
- Auf Eis 600 µl Isopropanol absolut in Schraubgefäßröhrchen vorlegen und den Überstand langsam und möglichst vollständig überführen – Es sollte möglichst kein Präzipitat mit überführt werden.
- Die Röhrchen schwenken bis die Flüssigkeit klar und ein Faden zu erkennen ist.
- 3 min bei 15.000 U zentrifugieren, den Überstand verwerfen.
- 300 µl 70 % Ethanol zugeben, das Pellet von der Gefäßinnenseite lösen und 1 min bei 15.000 U zentrifugieren.
- Den Überstand möglichst vollständig entfernen, die Röhrchen für bis zu 5 min trocknen lassen und 300 µl Nuclease-freies Wasser zugeben.
- Die RNA zum Lösen für mindestens 30 min auf Eis stellen, anschließend für die RT-PCR einsetzen oder bei -80 °C bis auf weiteres einfrieren.

Quantitative Echtzeit-RT-PCR

Zur Bestimmung der Menge von Zytokin-mRNA in den Ansätzen wurde das Verfahren der quantitativen Echtzeit-Reverse Transkription-Polymeraseketten-Reaktion (RT-PCR) mit dem TaqMan[®] gewählt. Dieses Verfahren ermöglicht den quantitativen Nachweis auch sehr geringer Mengen von RNA.

In einem ersten Schritt, der reversen Transkription, wird die RNA durch die MuLV-Reverse Transkriptase in DNA übersetzt. Im direkt anschließenden zweiten Schritt, der Polymerasekettenreaktion, stellt die AmpliTaq-Gold-Polymerase viele Kopien der übersetzten DNA her. Neben der Fähigkeit zur Synthese komplementärer 5'→3' Stränge besitzt die Polymerase eine 5'-Endonuklease-Aktivität, d.h. sie kann einen bereits angelagerten komplementären DNA-Strang vom 5'-Ende her zerlegen. Diese Eigenschaft wird bei der Echtzeit-PCR folgendermaßen zu Messzwecken genutzt: Außer den zwei für das zu bestimmende Zytokin spezifischen Primern gibt man eine Zytokin-spezifische Sonde zum Reaktionsansatz. Sie lagert sich in einem Bereich an den DNA-Strang an, der hinter der Bindungsstelle des sense (5'→3')-Primers liegt. Ihr 5'-Ende ist durch den Fluoreszenzfarbstoff 6-Carboxyfluoreszein (FAM) markiert, dessen Emissionsspektrum durch die räumliche Nähe einer weiteren Fluoreszenzmarkierung mit 6-Carboxytetramethylrhodamin (TAMRA) unterdrückt wird (so genanntes Quenching). Trifft die Taq-Polymerase bei der Synthese auf die Sonde, so wird sie zerlegt und somit das Emissionsspektrum von FAM detektierbar. Als Fluoreszenz-Detektor dient das ABI Prism 7700 Sequence Detection System, das im TaqMan[®] integriert für jedes Reaktionsgefäß alle 7 Sekunden das Emissionsspektrum misst (Echtzeitverfahren). Mit jedem PCR-Zyklus wird mehr Sonde abgebaut und dementsprechend steigt die Intensität des FAM-Signals. Ab einer bestimmten Zykluszahl übersteigt die Signalintensität die Grundlinienfluoreszenz merklich, dieser Zyklus wird Schwellenzyklus (threshold cycle) genannt und als Ct-Wert angegeben. Von Beginn der reversen Transkription bis zum Abschluss der Messung bleiben die Proben verschlossen in demselben Reagenzgefäß, so dass eine Verunreinigung oder ein Verlust von Probenmaterial durch Transfer nicht auftritt. Eine Kontaminierung der Mastermixe während der Vorbereitung der RT-PCR kann durch zwei RNA-freie Kontrollen pro

Primer/Sonden-Kombination, die für jeden RT-PCR-Ansatz mitgeführt werden, erkannt werden.

Protokoll:

- Je Zytokin und für β -Aktin einen Reaktionsansatz (Mastermix) pipettieren:

Die Anzahl der Reaktionsgefäße beträgt das Doppelte der Proben und zusätzlich zwei Gefäße für die Kontrollen.

Reagenzien	Menge je Reaktionsgefäß (Tube)
MgCl ₂ , 25 mM	7 μ l
dATP, dCTP, dGTP; 10 mM	Je 1,5 μ l
dUTP; 20 mM	1,5 μ l
10 x Taq Man Puffer A	5 μ l
Spezifischer sense Primer, 10 μ M	0,5 μ l
Spezifischer antisense Primer, 10 μ M	0,5 μ l
Spezifische fluorogene Sonde, 10 μ M	0,5 μ l
RNAse Inhibitor, 20 U	0,66 μ l
MuLV reverse Transkriptase, 25 U	0,5 μ l
Ampli Taq Gold Polymerase; 1,25 U	0,25 μ l

- Jedes Tube mit 20 μ l RNA-Probe und 30 μ l Mastermix beschicken:

Für jede RNA-Probe zwei Tubes mit β -Aktin-Mastermix und jeweils zwei Tubes mit IL-2, IL-4 und/oder IL-6-Mastermix füllen.

Pro PCR-Platte je eingesetztem Mastermixtyp zwei Tubes mit 20 μ l Aqua dest. und 30 μ l Mastermix versehen (RT-PCR-Kontrollen).

- Die Tubes mit den Caps verschließen und die Platte bis zur RT-PCR auf Eis bzw. im Eisschrank im Dunkeln lagern – maximal 24 Stunden lang.

- Folgende RT-PCR-Bedingungen am TaqMan[®] eingeben:
 - stage 1: 50 °C, 2 min
 - stage 2 (RT): 48 °C, 30 min
 - stage 3: 95 °C, 10 min
 - stage 4 (PCR): I: 95 °C, 15 sec - 60 °C, 90 sec :I, 40 Zyklen.

Für dieses Programm und die anschließende Berechnung der Ct-Werte benötigt der TaqMan[®] knapp drei Stunden. Es liegen dann für jede RNA-Probe zwei Ct-Werte für β -Aktin und für die gemessenen Zytokine vor.

Die Bestimmung der RNA-Kopienzahlen (K) erfolgt jeweils anhand des Mittelwertes dieser zwei Ct-Werte auf der Basis von Standardkurven, die durch Messen von Verdünnungsreihen bekannter Konzentrationen erstellt wurden.

$$\text{für IL-2: } K = 10^{(\text{Ct} - 49,5) : (-4,3)}$$

$$\text{für IL-4: } K = 10^{(\text{Ct} - 48,5) : (-4,3)}$$

$$\text{für IL-6: } K = 10^{(\text{Ct} - 41,0) : (-3,25)}$$

$$\text{für } \beta\text{-Aktin: } K = 10^{(\text{Ct} - 46,6) : (-4,07)}$$

β -Aktin wird konstitutiv exprimiert und seine Produktion wird nicht durch mTOR-abhängige Mechanismen beeinflusst {54}. Es eignet sich somit als interner Standard zum Ausgleich von Schwankungen der Zellzahl der Proben.

Die Zytokin-mRNA-Kopienzahl jeder Probe wird auf die Kopienzahl von β -Aktin-mRNA (in Millionen) in der entsprechenden Probe bezogen:

$$\text{Kopien Zytokin-mRNA} / 1 \text{ Mio. Kopien } \beta\text{-Aktin-mRNA}$$

Abschließend wird pro Vollblutansatz-Paar der Mittelwert der zugehörigen Zytokin-mRNA-Kopienzahlen errechnet.

Für interindividuelle Vergleiche des Effektes von SRL eignet sich das Verhältnis (Angabe in %) aus dem Mittelwert der Ansätze mit SRL zu dem Mittelwert der Kontrollansätze.

3.2.3 Bestimmung der Zytokinsekretion mit ELISA

Der Enzyme-Linked-Immunosorbent-Assay (ELISA) ist ein weit verbreitetes immunologisches Verfahren zum Nachweis biologisch aktiver Substanzen mittels substanzspezifischer Antikörpern, die an ein Enzym gekoppelt sind.

Die eingesetzten ELISA gehören zur Gruppe der quantitativen sandwich-ELISA, d.h. die in der Probe enthaltenen Zytokine werden zum einen durch einen plattenadhärenten monoklonalen, zytokinspezifischen Antikörper, zum anderen durch einen enzymgekoppelten, polyklonalen, zytokinspezifischen Antikörper gebunden. Das Enzym bedingt eine Farbänderung des Substrats, deren Ausprägung der Enzym- und somit der Antikörper- bzw. der Zytokinkonzentration proportional ist. Diese Farbänderung wird mit einem Photometer gemessen, das aus der unterschiedlichen Absorption die Konzentration des Zytokins berechnet.

Als Beispielprotokoll werden die Arbeitsschritte des IL-6 ELISA dargestellt.

- Eingefrorene Überstände auftauen.
- In PS-Röhrchen jeweils 50 µl Überstand in 450 µl IMDM verdünnen.
- Die Standards und den Waschpuffer entsprechend der Anweisung des Kits herstellen.
- In eine Elisa-Platte je Loch 100 µl RD1A vorlegen und darauf 100 µl verdünnten Überstand bzw. Standard geben.
- Die Platte mit Folie abgedeckt für 2 Stunden bei Raumtemperatur inkubieren.
- Im ELISA-Washer viermal mit jeweils 350 µl Waschpuffer waschen.
- 200 µl IL-6-Konjugat je Loch zugeben, die Platte abdecken und für 2 Stunden bei Raumtemperatur inkubieren.
- Die Substratlösung gemäß der Anweisung des Kits herstellen und den Assay erneut viermal mit je Loch 350 µl Waschpuffer waschen.
- 200 µl Substratlösung je Loch zugeben und im Dunkeln bei Raumtemperatur genau 20 min inkubieren.
- 50 µl Stopplösung je Loch zugeben und mischen bis die Farbe ganz nach gelb umgeschlagen ist.
- Innerhalb der nächsten 30 min die optische Dichte im Mikroplattenleser bestimmen: Messung bei 450 nm bei Korrekturwellenlänge von 540 nm.

3.2.4 Bestimmung der T-Lymphozytenproliferation mit UVID

Die Ultraviolett-Induzierte Detektion (UVID) halogenierter Pyrimidine ermöglicht den nicht-enzymatischen Nachweis der DNA-Synthese mit der Möglichkeit, gleichzeitig Zelloberflächenmoleküle zu bestimmen. Hammers et al. etablierten diesen DNA-Synthesenachweis auch für Lymphozytensubpopulationen {55}. Mit dieser Methode kann die Proliferationsfähigkeit mononukleärer Zellen, spezifisch der CD4-positiven mononukleären Zellen, aus 72 Stunden lang inkubierten Vollblutansätzen bestimmt werden. Als halogeniertes Pyrimidin wird 5-Bromo-2-deoxyuridin (BrdU) eingesetzt, das während der einstündigen Inkubation in die DNA proliferierender Zellen eingebaut wird.

Durch Exposition der mit Ficoll isolierten, gewaschenen mononukleären Zellen gegenüber UV-B-Licht kommt eine partielle Photolyse infolge der sequenzabhängigen Photosensitivität nukleären BrdUs zustande. Hiernach können die CD4-positiven Zellen mit Phycoerythrin (PE) -konjugierten monoklonalen Antikörpern gegen CD4 markiert werden. Anschließend folgt die Fixierung mit Dimethylsuberimidate (DMS). Im letzten Schritt werden die Zellen mit Fluorescein-Isothiocyanat (FITC) -konjugierten Antikörpern gegen BrdU und mit dem DNA-Farbstoff 7-Aminoactinomycin D (7-AAD) inkubiert. Mit dem Fluoreszenz-Absorbierenden Durchflusszytometer (FACS) können nun aufgrund der unterschiedlichen Fluoreszenz dreier Farbstoffe der Anteil CD4 positiver Zellen, der DNA-Gehalt jeder Zelle und die Menge eingebauten BrdUs als Maß der DNA-Syntheserate einer jeden Zelle bestimmt werden.

Die UVID-Methode ermöglicht also die Bestimmung der Proliferation CD4-positiver und CD4-negativer Zellen.

Protokoll:

- Vollblutansätze wie unter 3.2.1 beschrieben in Vollblutkulturflaschen ansetzen und für 72 Stunden bei 37°C und 5 % CO₂ inkubieren.
- 30 µl BrdU-Stammlösung zu den Ansätzen geben und bei 37°C, 5 % CO₂ für 60 min inkubieren lassen.
- 5 ml Biocoll Separation Solution in ein 15 ml Reagenzgefäß vorlegen, mit dem Ansatz vorsichtig überschichten und 20 min bei 1710 U, 600g, Beschleunigung 2, brake 2, 18 °C zentrifugieren.
- Den Lymphozytenring in ein 15 ml Reagenzgefäß überführen und mit 10 ml DBPS waschen (1210 U, 300g, 10 min).
- Das Pellet in 1 ml DBPS auflösen, in ein klares Eppendorf-Reaktionsgefäß 1,5 ml überführen und 5 min in die UV-Lampe stellen.
- Bei 3000 U 3 min zentrifugieren und das Pellet in 100 µl DBPS resuspendieren.
- 20 µl PE anti-human CD4 zugeben, mischen und 15 min im Dunkeln bei Raumtemperatur inkubieren.
- Mit 1 ml DBPS-Puffer mischen und bei 3500 U 3 min zentrifugieren.
- Das Pellet in 100 µl DBPS resuspendieren, 1 ml DMS-Puffer und 100 µl DMS-Stocklösung zugeben und 5 min bei Raumtemperatur fixieren lassen.
- Anschließend bei 3000 U 3 min zentrifugieren und mit 1 ml DBPS waschen (3000 U, 3 min).
- Ein PS-Röhrchen wie folgt beschicken:
 - 1 ml Aqua dest.
 - 50 µl 0,1 M Borax, pH 8,0
 - 10 µl Maus anti-BrdU/FITC
 - 20 µl 7 AADin 100 µl DBPS resuspendiertes Pellet.
- Bei Raumtemperatur im Dunkeln mindestens 60 min inkubieren, anschließend im FACS messen.

3.2.5 Statistische Auswertung

Zur Auswertung der Daten wurde das SPSS-Statistikprogramm benutzt. Die graphische Darstellung erfolgte unter Anwendung des Grahikprogrammes GraphPad Prism 4.

Die Versuchsreihen zur Bestimmung der immunsuppressiven Wirkung von SRL im Probandenkollektiv (Ergebnisteil 4.1.1 bis 4.1.3) wurden mit dem Paardifferenzentest nach Wilcoxon analysiert. Die Dosisabhängigkeit der immunsuppressiven Effekte von SRL (Ergebnisteil 4.2.2) wurde unter Anwendung des Friedman-Tests (Rangvarianzanalyse) geprüft. Aufgrund der geringen Patientenzahl und der sehr unterschiedlichen Vorbedingungen wurden die im Patientenkollektiv erhaltenen Daten (Ergebnisteil 4.3) nicht statistisch ausgewertet, sondern rein beschreibend dargestellt.

4 Ergebnisse

4.1 Effekte von SRL auf die Lymphozytenfunktion *in vitro*

SRL kann durch Hemmung mTORs auf vielfältige Art und Weise die Lymphozytenfunktion und -proliferation beeinflussen. Drei bedeutende Parameter wurden ausgewählt, den Effekt von SRL auf unterschiedliche Ebenen der Zellaktivierung zu charakterisieren. Mittels der Echtzeit-RT-PCR wurde die Zytokin-mRNA-Expression quantitativ analysiert. Durch ELISA wurde die Sekretion von IL-2, IL-4 und IL-6 gemessen. UVID diente dazu, den Einfluss von SRL auf die Proliferation der CD4-positiven und CD4-negativen Lymphozytenpopulationen zu charakterisieren. Um eventuell vorhandene interindividuelle Unterschiede in der Wirksamkeit von SRL nachzuweisen, wurden Vollblutansätze von elf gesunden Probanden jeweils mit 10 ng/ml SRL und ohne SRL (Kontrollansätze) untersucht.

4.1.1 Effekt von SRL auf die mRNA-Expression von IL-2, IL-4 und IL-6

Zunächst sollte untersucht werden, welchen zeitlichen Verlauf die Expression der einzelnen Zytokin-mRNAs nach Beginn der Stimulation nimmt und ob SRL die Expression messbar beeinflusst. Deshalb wurde die mRNA-Expression jeweils nach 4 Stunden und 24 Stunden Inkubation bestimmt.

Es zeigte sich, dass IL-2 und IL-4 nach 24 Stunden maximal exprimiert werden. IL-6 wird dagegen nach 4 Stunden maximal exprimiert (Abb.1, 3). Unter 10 ng/ml SRL ändert sich der Zeitpunkt der maximalen Expression nicht. Für IL-2 ist unter SRL die Zunahme der Expression geringer als in den Kontrollansätzen.

Nach 4 und 24 Stunden Inkubation lagen signifikant niedrigere Kopienzahlen von IL-2 und IL-4 mRNA in Ansätzen mit 10 ng/ml SRL als in den Kontrollansätzen vor. Bei individueller Betrachtung der Ergebnisse fällt auf, dass nach 4 Stunden in den Ansätzen von drei Probanden unter SRL mehr IL-2 mRNA gemessen wurde als in den Kontrollansätzen (Abb. 2).

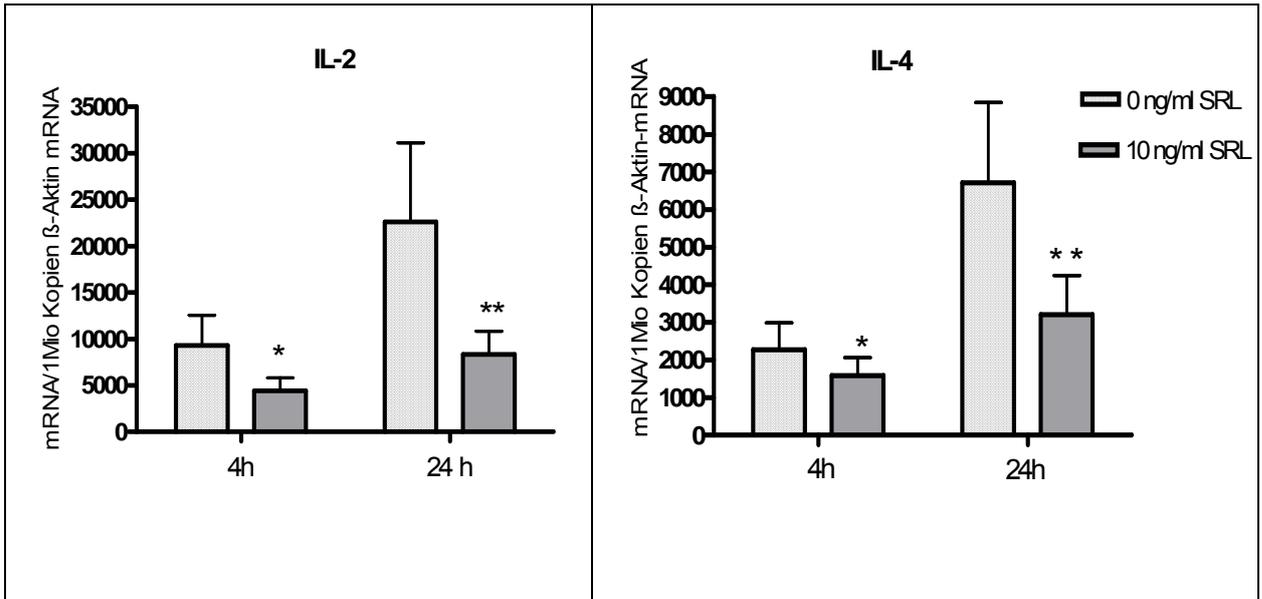


Abb. 1: Suppression der IL-2 und IL-4 mRNA Expression durch SRL in Abhängigkeit von der Inkubationsdauer: SRL-freie Kontrolle 0 ng/ml, 10 ng/ml SRL; Mittelwert \pm Standardabweichung, $n = 11$ *: $p < 0.05$ **: $p < 0.005$

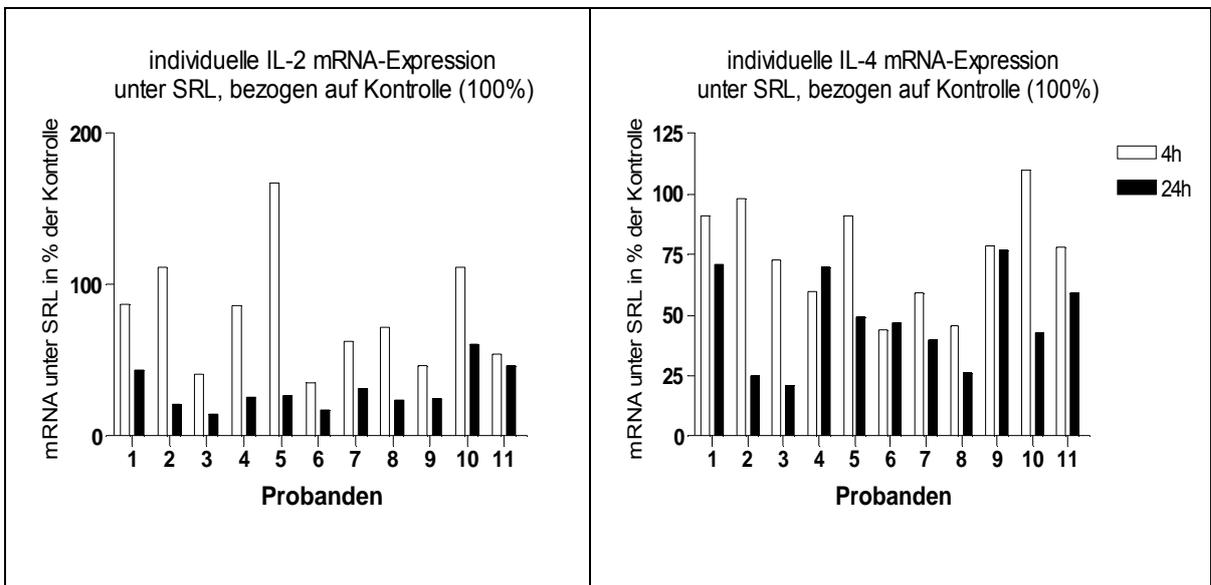


Abb. 2: Individuelle Suppression der IL-2 und IL-4 mRNA-Expression durch 10 ng/ml SRL in Relation zur jeweiligen Kontrolle. mRNA-Menge unter SRL in Prozent der Kontrolle, nach 4 und 24 Stunden Inkubation.

Hinsichtlich der IL-6 mRNA-Expression interessierte die Beeinflussung der Transkription sowohl der T-Zellen als auch der Monozyten und Makrophagen. Deshalb wurde in einer ersten Versuchsreihe T-Zell-spezifisch mit anti-CD3/anti-CD28-Antikörpern und in einer zweiten Versuchsreihe mit LPS stimuliert (Abb. 3). Die Kopienzahlen nach LPS-Stimulation waren viel höher als nach Stimulation mit anti-CD3/anti-CD28-Antikörpern. Auch der Unterschied zwischen der Expression nach 4 und 24 Stunden ist unter LPS viel größer als unter Stimulation mit anti-CD3/anti-CD28-Antikörpern.

Nach 4 Stunden wird die IL-6 mRNA-Expression unter LPS-Stimulation durch SRL signifikant vermindert. Bei beiden Stimulationsarten zeigten jeweils neun von elf Ansätze nach 4 Stunden niedrigere, die übrigen zwei Ansätze dagegen höhere Kopienzahlen unter Zugabe von SRL (Abb. 4). Nach 24 Stunden waren die Kopienzahlen in acht von zehn T-Zell-spezifisch stimulierten Ansätzen mit SRL niedriger als in den Kontrollansätzen. Bei Stimulation mit LPS kamen in sechs Ansätzen mit SRL niedrigere und in fünf Ansätzen mit SRL höhere IL-6 mRNA-Kopienzahlen im Vergleich zu den jeweiligen Kontrollansätzen vor.

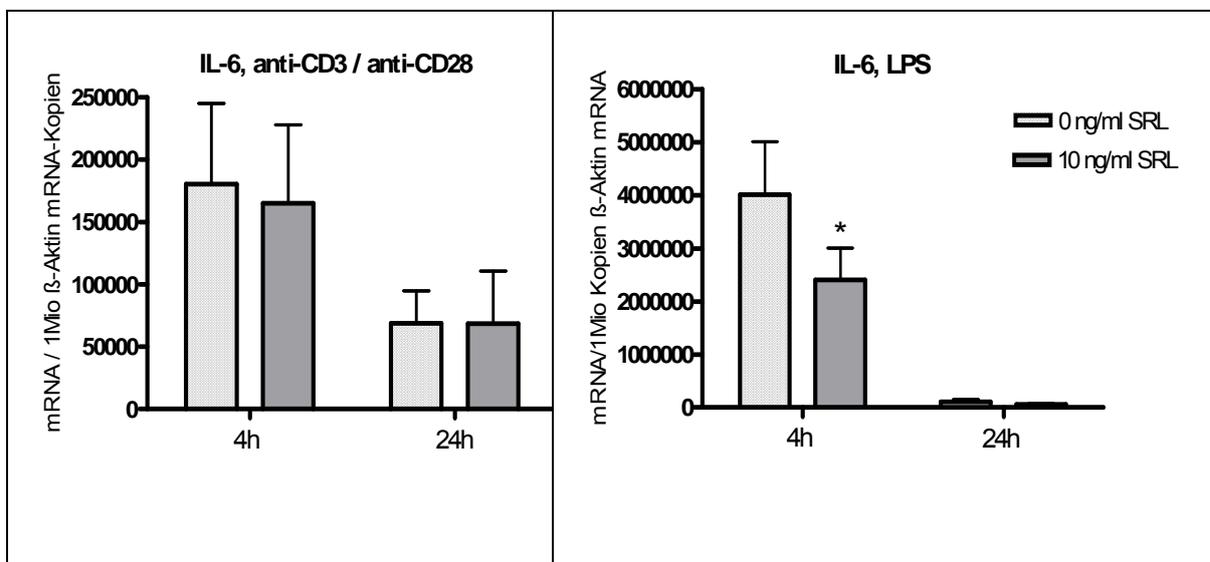


Abb. 3: IL-6 mRNA-Expression nach Stimulation mit anti-CD3/anti-CD28-Antikörpern (n=10) bzw. mit LPS (n=11) in Abhängigkeit von der Inkubationsdauer, SRL-freie Kontrolle (0 ng/ml), 10 ng/ml SRL, Mittelwert \pm Standardabweichung, *: $p < 0.05$

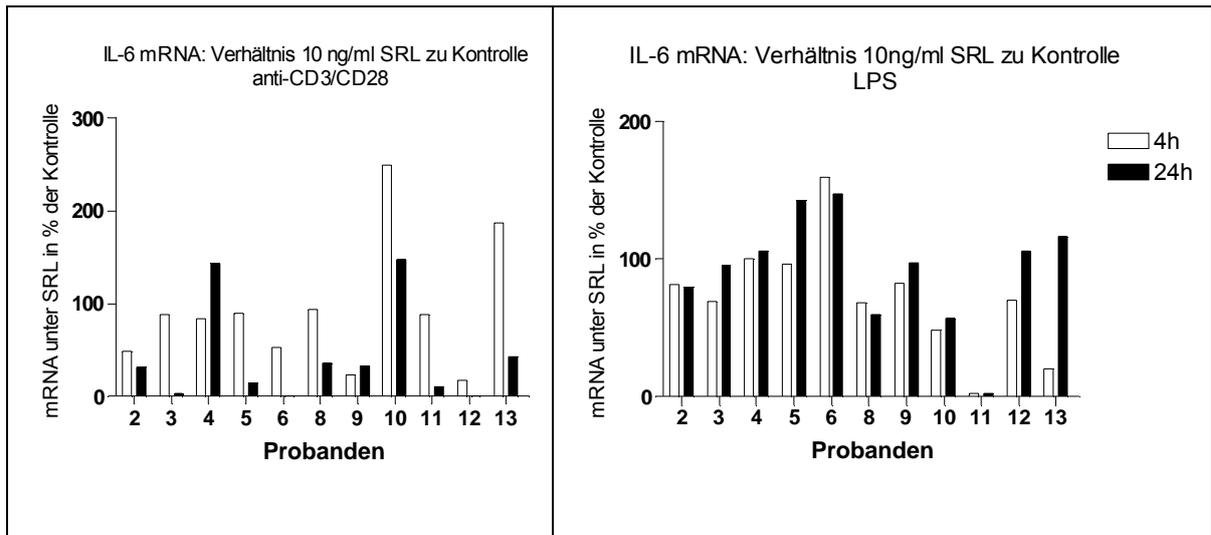


Abb.4: Individuelle IL-6 mRNA-Expression unter 10 ng/ml SRL in Relation zur jeweiligen Kontrolle (100 %), nach 4 und 24 Stunden Inkubation, Probanden Nr. 2-6 und 8-11 sind dieselben wie in Abb. 2

Aus den beiden Versuchsreihen zur Messung des Effekts von SRL auf die IL-6 mRNA-Expression wird deutlich, dass Monozyten und Makrophagen nach Stimulation mit LPS weit mehr IL-6 mRNA bilden als T-Zellen nach T-Zell-spezifischer Stimulation. Die IL-6 mRNA-Expression von Monozyten und Makrophagen wird zum Zeitpunkt der maximalen Expression, nach 4 Stunden, durch SRL gehemmt. Nach 24 Stunden und unter T-Zell-spezifischer Stimulation zeigen einige Probanden keine Suppression, andere eine Suppression bis zu 0.1 % der Kontrolle.

4.1.2 Effekt von SRL auf die Sekretion von Zytokinen

Die Untersuchung der Zytokinsekretion in den Überständen der Vollblutansätze erfolgte durch ELISA. Mit Ausnahme der LPS-stimulierten Ansätze, bei denen auch die IL-6 Konzentration nach 4 Stunden Inkubation bestimmt wurde, wurden die Zytokin-Konzentrationen nur in den 24 Stunden-Ansätzen gemessen. In Übereinstimmung mit dem suppressiven Effekt SRLs auf die IL-2 mRNA-Expression zeigte der ELISA in den Ansätzen mit SRL geringere IL-2 Konzentrationen als in den Kontrollansätzen ($p < 0.05$, $p < 0.005$ in Bestätigungsuntersuchung, Abb.5). Die Konzentrationen von IL-4 lagen in der Mehrzahl unterhalb der Nachweisgrenze von 3 pg/ml. Die übrigen Ansätze mit IL-4 Konzentrationen geringfügig oberhalb der Nachweisgrenze (bis zu 14.61 pg/ml) ließen keinen eindeutigen Effekt von SRL auf die IL-4 Konzentration erkennen.

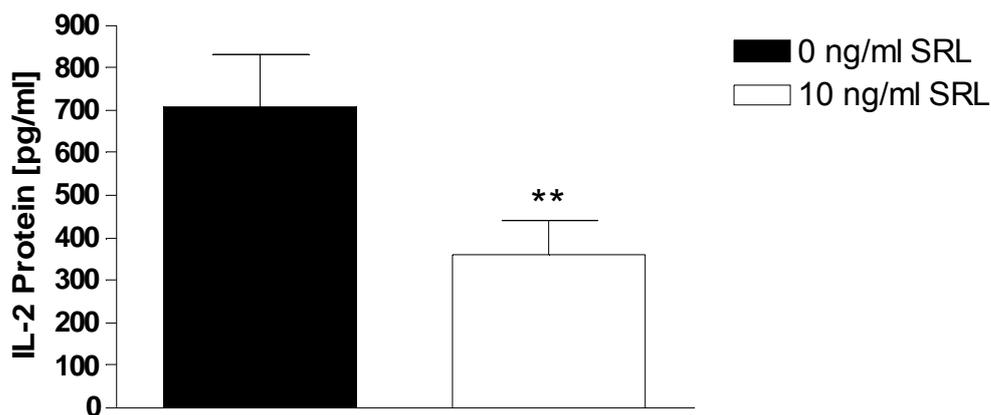


Abb.5: Suppression der Konzentration von IL-2 Protein durch 10 ng/ml SRL gegenüber SRL-freier Kontrolle nach 24 Stunden Inkubation. Mittelwert \pm Standardabweichung, $n = 11$, **: $p < 0.005$

In T-Zell-spezifisch stimulierten Ansätzen ist nach 24 Stunden Inkubation unter SRL die IL-6 Konzentration geringer als in den Kontrollansätzen ($p=0.05$). Bei Stimulation mit LPS treten nach 4 Stunden Inkubation unter SRL signifikant geringere IL-6 Konzentrationen auf als in den Kontrollansätzen ($p<0.05$). Nach 24 Stunden Inkubation mit LPS wiesen drei von elf Ansätzen unter SRL höhere und zwei Ansätze gleich hohe IL-6 Konzentrationen wie im Kontrollansatz auf.

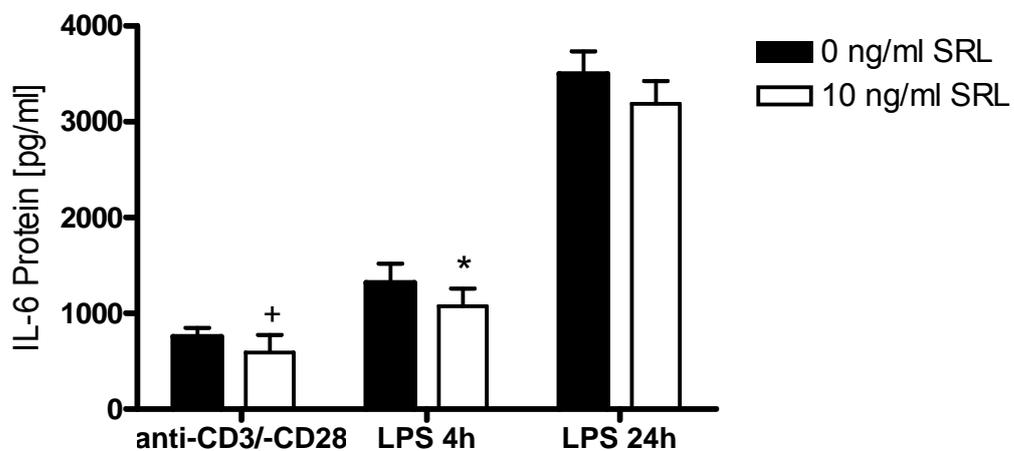


Abb.6: Effekt von 10 ng/ml SRL auf die Konzentration von IL-6 Protein nach Stimulation mit anti-CD3/anti-CD28 Antikörpern über 24 Stunden, mit LPS über 4 und über 24 Stunden. Mittelwert \pm Standardabweichung, $n = 11$, +: $p = 0,05$, *: $p < 0.05$.

4.1.3 Effekt von SRL auf die Lymphozytenproliferation

Da IL-2 und IL-4 wichtige Wachstums- und Proliferationsstimuli für T-Zellen sind, sollte eine Suppression der Produktion dieser Zytokine durch SRL zu einem verminderten Wachstum und einer geringeren Proliferation der T-Zellen führen. Dies wurde an 72 Stunden lang inkubierten Ansätzen mittels UVID überprüft. Tatsächlich war in den Ansätzen mit SRL der Anteil proliferierender CD4-positiver aber auch CD4-negativer T-Zellen signifikant geringer als in den Kontrollansätzen (Abb. 7).

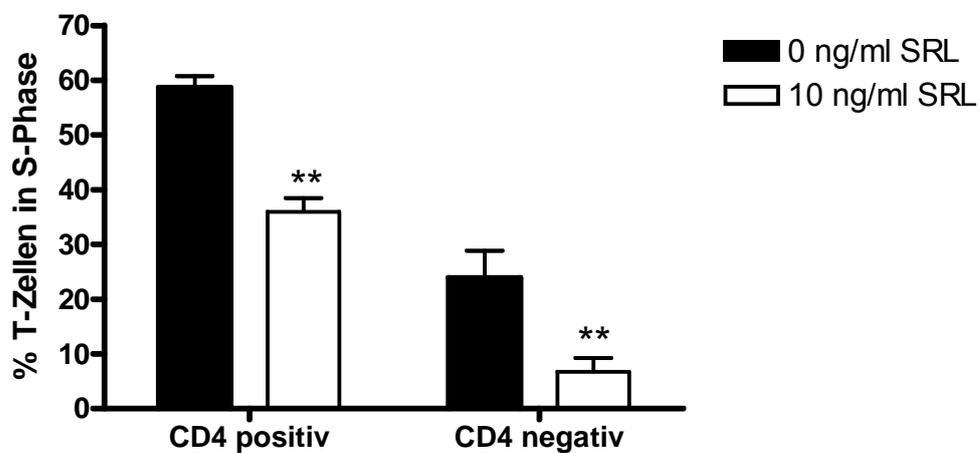


Abb.7: Suppression der Proliferation CD4-positiver und CD4-negativer T-Zellen unter 10 ng/ml SRL gegenüber SRL-freier Kontrolle. Mittelwert \pm Standardabweichung, $n = 11$, **: $p < 0.005$

4.2 Kinetik und Dosisabhängigkeit der SRL-Wirkung

Der Effekt verschiedener Konzentrationen von SRL auf die Lymphozytenfunktion wurde untersucht, indem Vollblutansätze von fünf Probanden mit 10 ng/ml und 20 ng/ml SRL, sowie ohne SRL inkubiert wurden. Die Inkubation erfolgte über 4, 8 und 24 Stunden, so dass der Einfluss der verschiedenen Konzentrationen auf den zeitlichen Verlauf der Zytokinexpression und -produktion bestimmt werden konnte. Die Zytokin-mRNA von IL-2 und IL-4 wurde für alle Ansätze bestimmt und in den Überständen der 8 und der 24 Stunden lang inkubierten Ansätze wurde zusätzlich die Konzentration von IL-2 und IL-4 gemessen. Von drei der fünf Probanden konnten auch Ansätze mit 50 ng/ml SRL parallel zu den übrigen Ansätzen untersucht werden. Alle Ansätze dieser drei Probanden wurden auch auf die IL-6 mRNA-Expression und die Konzentration von IL-6 untersucht.

4.2.1 Effekt von SRL auf die Kinetik der Zytokin-mRNA-Expression

In den Kontrollansätzen nahm die Menge an IL-2 mRNA innerhalb von 24 Stunden nach Stimulation kontinuierlich zu (Abb.8). Dagegen stieg die Menge IL-2 mRNA in der Mehrzahl der Ansätze mit 10 ng/ml und 20 ng/ml SRL nur innerhalb der ersten 8 Stunden und blieb danach bis 24 Stunden nach Stimulation konstant (Abb.9). Unter 50 ng/ml nahm die IL-2 mRNA-Menge zwar kontinuierlich über 24 Stunden zu, jedoch in deutlich geringerem Maße als unter 0, 10 und 20 ng/ml.

Die IL-4 mRNA-Kopienzahlen in den Kontrollansätzen nahm innerhalb der ersten 8 Stunden Inkubation deutlich zu und blieb bis nach 24 Stunden konstant. Diese Kinetik wurde durch SRL nicht beeinflusst.

Die IL-6 mRNA-Expression erreichte in den Kontrollansätzen ein Maximum bei 8 Stunden nach Stimulation, nach 24 Stunden war sie deutlich geringer als nach 4 Stunden. Unter 50 ng/ml SRL wurde bei zwei Probanden ein gegenüber der Kontrolle sehr niedriges Maximum nach 4 Stunden gemessen. Bei einem dieser Probanden lag im Gegensatz zu den anderen die IL-6 mRNA-Kopienzahl unter 20 und 50 ng/ml nach 24 Stunden über der Kontrolle.

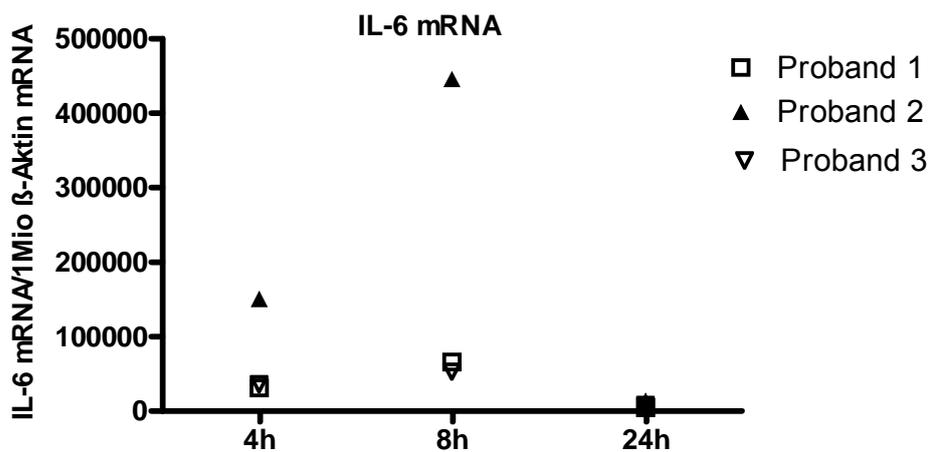
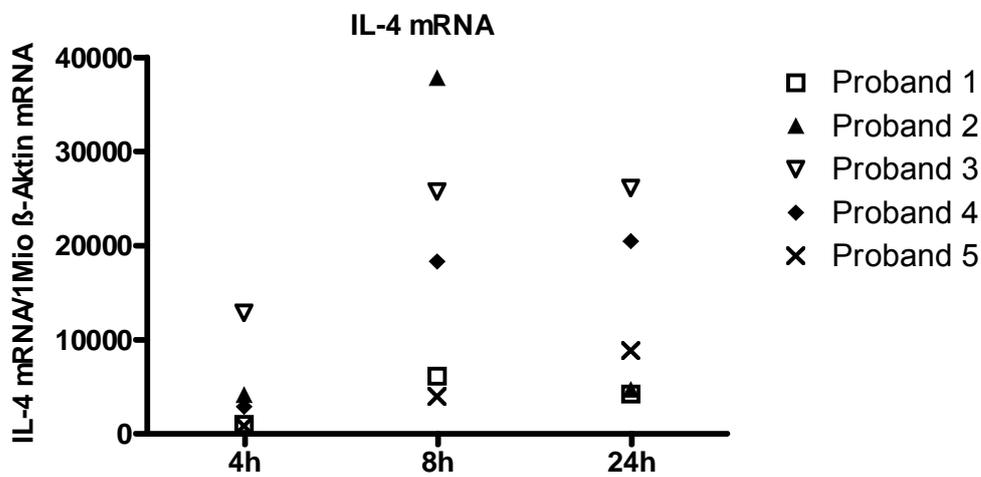
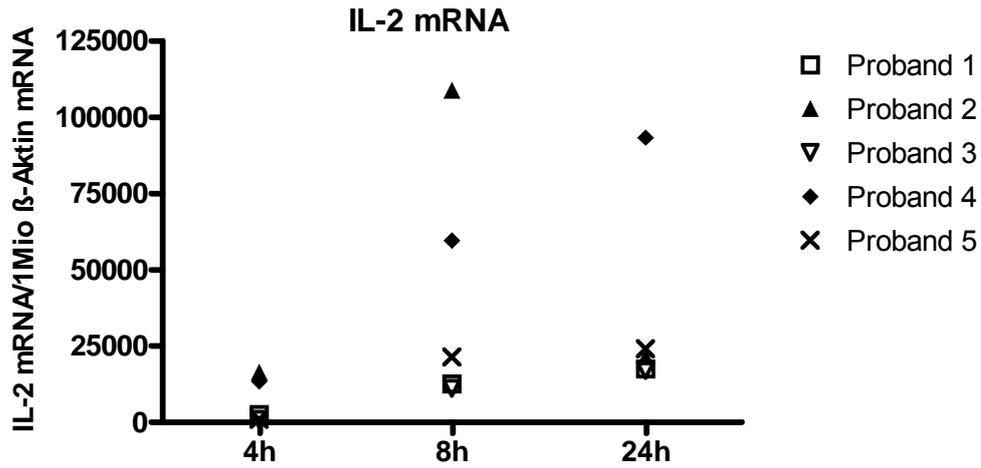


Abb.8: Kinetik der Zytokin-mRNA-Expression ohne SRL. Anzahl mRNA-Kopien von IL-2 (n=5), IL-4 (n=5) und IL-6 (n=3) bezogen auf 1 Million β -Aktin mRNA-Kopien nach 4, 8 und 24 Stunden Inkubation.

4.2.2 Dosisabhängigkeit der SRL-Wirkung

In zwei der drei Ansätze war nach 8 Stunden Inkubation die IL-2 und IL-4 mRNA-Expression unter 50 ng/ml SRL deutlich stärker gehemmt als unter 10 ng/ml, die IL-6 mRNA-Expression war bei allen drei Ansätzen unter 50 ng/ml niedriger als unter 10 ng/ml (Abb. 9, 10). Bei der statistischen Auswertung erwies sich jedoch, eventuell aufgrund der sehr kleinen Probandenzahl, die Korrelation zwischen SRL-Konzentration und Zytokin-mRNA-Kopienzahlen als nicht signifikant.

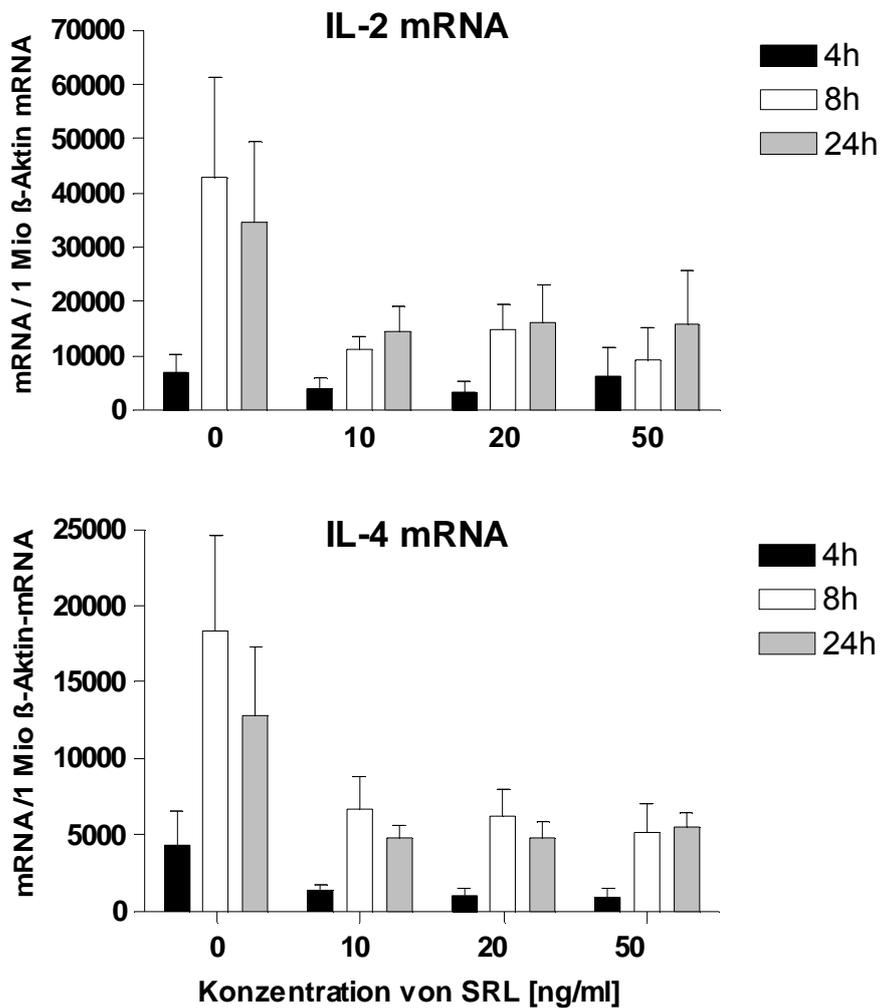


Abb. 9: Dosisunabhängige Suppression der IL-2 mRNA und IL-4 mRNA Expression durch 10-50 ng/ml SRL nach 4, 8 und 24 Stunden Inkubation. Mittelwert \pm Standardabweichung, n=5

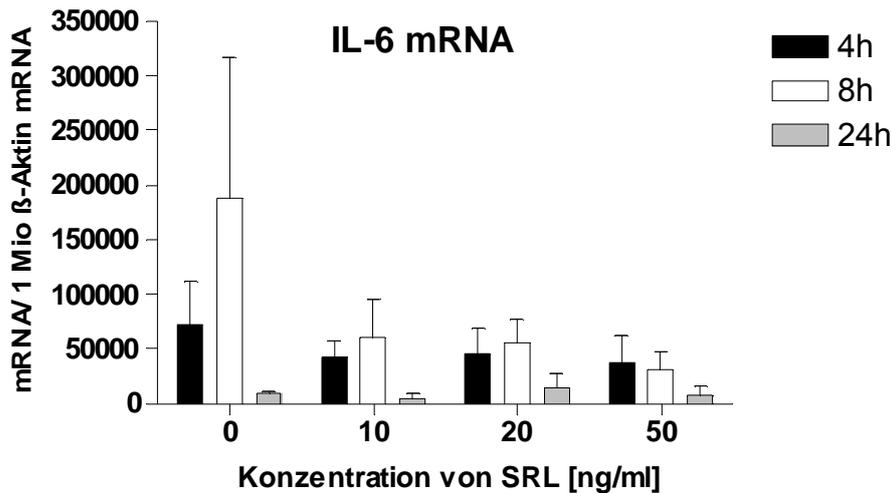


Abb.10: Suppression der IL-6 mRNA-Expression durch 10 ng/ml, 20 ng/ml und 50 ng/ml SRL nach Stimulation mit anti-CD3/anti-CD28 Antikörpern und 4, 8 und 24 Stunden Inkubation. Mittelwert \pm Standardabweichung, $n=3$

Auch die Konzentrationen des sezernierten IL-2 und IL-6 waren nach 24 Stunden Inkubation in Ansätzen mit SRL-Konzentrationen von 10-50 ng/ml nahezu gleich und gegenüber den Kontrollansätzen nicht signifikant vermindert. Dagegen wurde nach 8 Stunden Inkubation in den Ansätzen mit 50 ng/ml SRL niedrigere Zytokinkonzentrationen als in denen mit 10 ng/ml SRL gemessen. Die Verminderung der Zytokinkonzentrationen in den Ansätzen mit 50 ng/ml SRL gegenüber den Kontrollansätzen war nach 8 Stunden signifikant ($p < 0.05$).

4.3 Wirkung der Kombination von CsA und SRL bzw. SRL-Monotherapie auf die Lymphozytenfunktion *ex vivo*

Von vier nierentransplantierten Patienten wurden vor, während und nach der Umstellung von CsA- auf SRL-basierte immunsuppressive Therapie Blutproben untersucht. Blutproben einer nierentransplantierten Patientin mit CsA-basierter Therapie wurden ebenfalls zur Bestimmung der Lymphozytenfunktion unter CsA *ex vivo* und unter Zusatz von SRL *in vitro* eingesetzt. Da diese Patientin nicht auf SRL-basierte Therapie umgestellt wurde, liegen keine Daten über den Effekt von SRL *ex vivo* vor. Nähere Angaben zu allen Patienten enthält Tabelle 1.

	Alter	Zeit seit Transplantation	Hämodialyse vor Transplantation	Verlauf nach Umstellung
Patient 1	64 Jahre	11 Jahre	7 Jahre	Nach 1 Monat refraktäre Anämie, CK-Anstieg, Ödeme: Umstellung auf CsA, darunter nach 1,5 Jahren chronisches Transplantatversagen, Hämodialyse
Patient 2	34 Jahre	2 Jahre	k.A.	Unter SRL stabil
Patient 3	61 Jahre	5 Jahre	5 Jahre	Unter SRL stabil, nach 1 Jahr Blasen- und Mamma-Carcinom
Patient 4	66 Jahre	8 Jahre	4 Jahre	Innerhalb 2 Monaten Umstellung auf FK-506 und Transplantatversagen, Hämodialyse
Patientin 5	65 Jahre	6 Jahre	2,5 Jahre	(stabil unter CsA, Endometriumcarcinom)

Tab. 1: Charakteristika der untersuchten Patienten

Die Talspiegelkonzentrationen von CsA lagen vor der Umstellung im Bereich von 100-120 ng/ml und während der Umstellung bei 50-80 ng/ml. Für SRL wurden mit einer Ausnahme (33.9 ng/ml während der Umstellung bei Patient 1) während und nach der Umstellung Talspiegelkonzentrationen von 8-12 ng/ml bestimmt.

Für die Versuche wurde Vollblut zum Zeitpunkt der Talspiegelkonzentration abgenommen und nach Stimulation mit anti-CD3/anti-CD28 Antikörpern inkubiert. Nach 4 und 24 Stunden Inkubation wurde die IL-2 und IL-4 mRNA-Expression untersucht, nach 24 Stunden auch die Konzentration von IL-2 und IL-4. Außerdem wurde nach 72 Stunden Inkubation die Proliferation der CD4-positiven und CD4-negativen T-Zellen gemessen.

4.3.1 Beeinflussung der mRNA-Expression und Sekretion von IL-2

Die absoluten mRNA-Kopienzahlen variierten unter CsA-basierter Therapie interindividuell stark (nach 4 Stunden von 7.300 bis 162.848, nach 24 Stunden von 55.147 bis 277.445 IL-2 mRNA-Kopien pro 1 Mio. β -Aktin-Kopien, Abb. 11). Unter SRL-Zusatz *in vitro* war nach 4 Stunden bei den Patienten Nr. 2 und Nr. 4 die IL-2 mRNA-Kopienzahl auf 20 % bzw. 50 % vermindert. In den Ansätzen der Patienten Nr. 1, 3 und 5 konnte nach 4 Stunden hingegen keine wesentliche Änderung der IL-2 mRNA-Expression festgestellt werden. Nach 24 Stunden Inkubation wurden bei allen Patienten unter SRL-Zusatz *in vitro* deutlich weniger IL-2 mRNA-Kopien als unter CsA-Monotherapie gemessen. Auch die Konzentration von IL-2 Protein war nach 24 Stunden bei allen Patienten unter SRL-Zusatz vermindert (412.94 ± 304.97 pg/ml in Ansätzen mit SRL versus 715.48 ± 317.25 pg/ml in Ansätzen ohne SRL).

Unter Kombinationstherapie von CsA und SRL wurden *ex vivo* nach 4 Stunden Inkubation bei allen Patienten außer bei Patient Nr. 3 weniger IL-2 mRNA-Kopien als unter CsA-Monotherapie gemessen. Nach 24 Stunden war die IL-2 mRNA-Kopienmenge bei allen Patienten verringert, bei Patient Nr. 2 jedoch erst nach einem Monat. Patient Nr. 1 hatte unter Kombinationstherapie zunächst eine Talspiegelkonzentration von 33.9 ng/ml SRL. Im Blut, das zwei Stunden *nach* SRL-Einnahme abgenommen wurde, waren nach 4 und 24 Stunden Inkubation keine IL-2 mRNA-Kopien nachweisbar. Die Konzentration von IL-2 war nach 24 Stunden gegenüber dem Ansatz mit SRL *in vitro* stark vermindert (109.5 versus 207 pg/ml). Zwei Tage nach Dosiskorrektur wurde *vor* SRL-Einnahme Blut abgenommen und untersucht. Die mRNA-Kopienzahlen waren noch deutlich geringer und die IL-2 Konzentration so hoch wie bei SRL-Zusatz *in vitro*.

Nach der Umstellung, d.h. unter SRL-Monotherapie, war die Menge von IL-2 mRNA-Kopien nach 4 Stunden bei allen Patienten außer bei Patient Nr. 2 so groß wie unter CsA-SRL-Kombination in vitro. Bei den Patienten Nr. 1 und Nr. 3 lagen also ähnlich hohe Kopienzahlen wie unter CsA-Monotherapie vor, bei den Patienten

Nr. 2 und Nr. 4 waren sie auf 1.35 % bzw. 16.6 % vermindert. Nach 24 Stunden wiesen alle Patienten eine deutlich geringere IL-2 mRNA-Expression (Verringerung auf 5-25 %) und IL-2 Konzentration als unter CsA-Monotherapie auf.

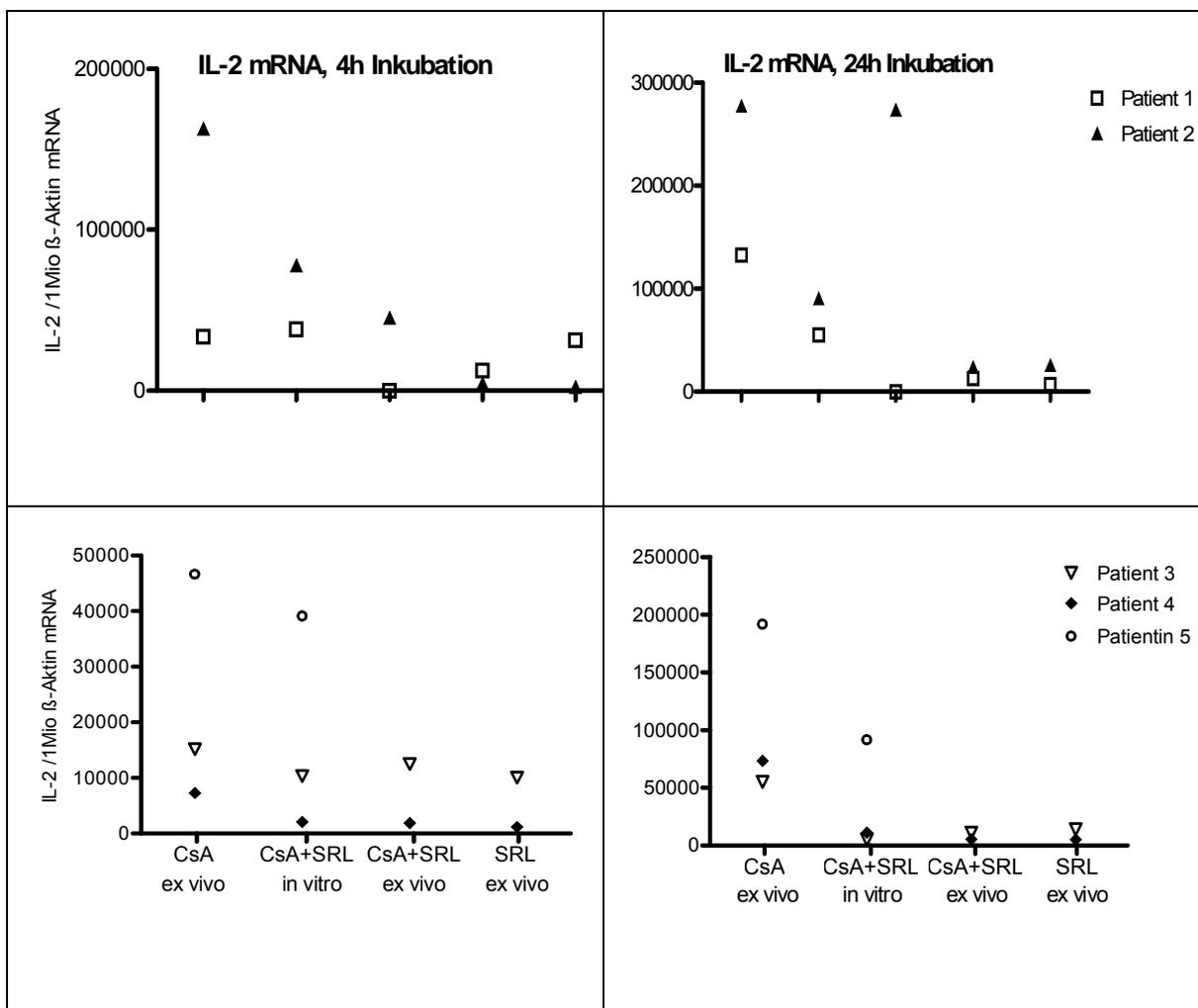


Abb.11: IL-2 mRNA-Expression vor (CsA-Monotherapie ex vivo, CsA+SRL in vitro), während (CsA+SRL ex vivo) und nach (SRL-Monotherapie ex vivo) Umstellung von CsA- auf SRL-basierte Therapie bei fünf Patienten. 4 Stunden (links), 24 Stunden (rechts) Inkubation, Stimulation mit anti-CD3/anti-CD28-Antikörpern, IL-2 mRNA-Kopien pro 1 Million Kopien β-Aktin mRNA.

4.3.2 Beeinflussung der mRNA-Expression und Sekretion von IL-4

Unter CsA-Monotherapie variierten die absoluten Kopienzahlen nach 4 Stunden von 3.988 bis 20.044 IL-4 mRNA-Kopien pro 1 Mio. Kopien β -Aktin, nach 24 Stunden von 11.418 bis 57.108 Kopien pro 1 Mio. Kopien β -Aktin (Abb. 12).

SRL-Zusatz *in vitro* bewirkte in den Ansätzen aller Patienten nach 4 und 24 Stunden Inkubation eine Verringerung der IL-4 mRNA-Kopien auf 25-57 %. Unter der Kombinationstherapie von CsA mit SRL wiesen die Ansätze aller Patienten ebenfalls sowohl nach 4 Stunden als auch nach 24 Stunden geringere Mengen an IL-4 mRNA auf als unter CsA-Monotherapie. Bei Patient Nr. 2 war, analog zur IL-2 mRNA-Expression, ein deutlicher Rückgang der IL-4 mRNA-Expression erst im Verlauf eines Monats unter Kombinationstherapie festzustellen. Nach der Umstellung war unter SRL-Monotherapie die Menge von IL-4 mRNA-Kopien nach 4 Stunden Inkubation gegenüber der unter CsA-basierter Therapie auf 15-78 %, nach 24 Stunden auf 11-23 % vermindert.

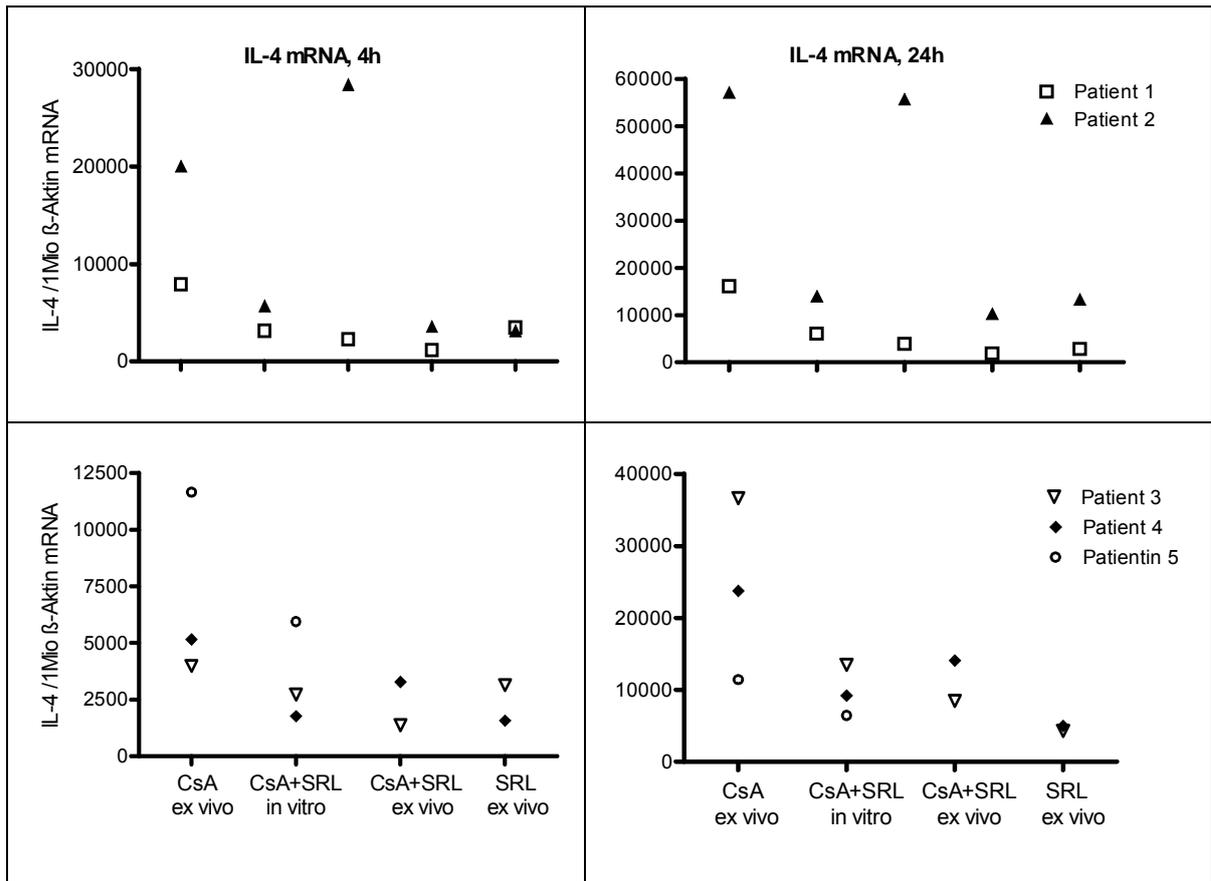


Abb. 12: IL-4 mRNA-Expression nach 4h (links) und 24h (rechts) Inkubation unter CsA-Monotherapie ex vivo und mit SRL-Zusatz in vitro, unter Kombination von CsA und SRL ex vivo und unter SRL-Monotherapie ex vivo bei fünf Patienten. IL-4 mRNA-Kopien pro 1 Million Kopien β -Aktin mRNA

4.3.3 Beeinflussung der T-Zell-Proliferation

Der Anteil proliferierender CD4-positiver T-Zellen war unter SRL-Zusatz *in vitro* gegenüber CsA-Monotherapie vermindert ($28.76 \pm 8.47 \%$ versus $50.76 \pm 5.86 \%$, Abb. 13).

Unter der Kombination von CsA und SRL *ex vivo* war die Proliferation der T-Zellen ebenfalls geringer als unter CsA-Monotherapie. Verglichen mit den Ansätzen mit SRL-Zusatz *in vitro* war die Hemmung der Proliferation CD4-positiver T-Zellen unter der Kombination von CsA und SRL *ex vivo* bei den Patienten Nr. 1, 2 und 3 weniger stark.

Unter SRL-Monotherapie war der proliferierende Anteil der CD4-positiven T-Zellen bei Patient Nr. 2 höher als unter CsA-Monotherapie, bei den anderen Patienten geringer. Der proliferierende Anteil der CD4-negativen T-Zellen war bei allen Patienten verglichen mit CsA-Monotherapie stark vermindert,

Gegenüber der Kombinationstherapie von CsA und SRL nahm unter SRL-Monotherapie die Proliferation CD4-positiver T-Zellen bei den Patienten Nr. 3 und Nr. 4 ab, bei den Patienten Nr. 1 und Nr. 2 zu.

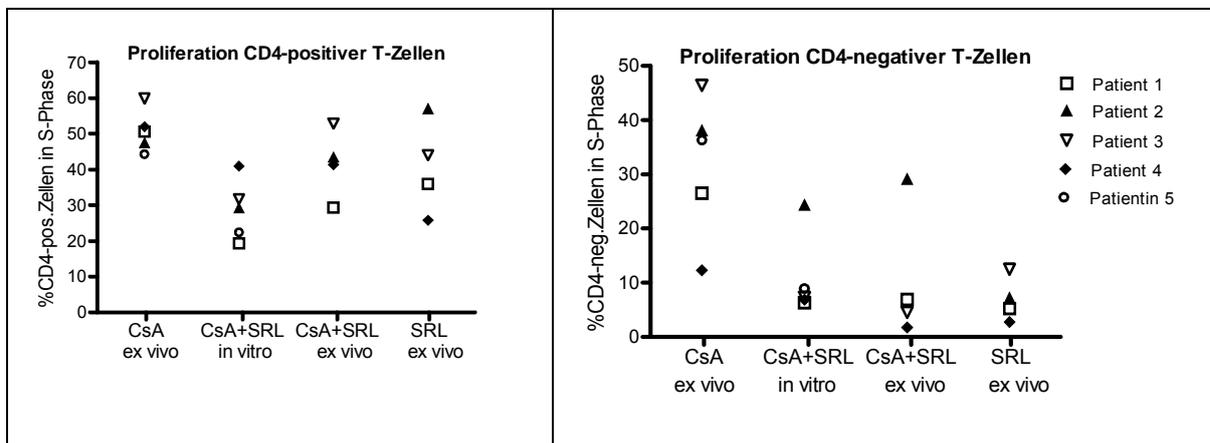


Abb. 13: Proliferation der CD4-positiven und CD4-negativen T-Zellen unter CsA-Monotherapie (CsA *ex vivo*), unter Kombination von CsA und SRL *in vitro* und *ex vivo* und unter SRL-Monotherapie (SRL *ex vivo*) bei fünf Patienten. Anteil der proliferierenden an allen CD4-positiven bzw. CD4-negativen Zellen. Stimulation mit anti-CD3/anti-CD28-Antikörpern, Inkubation für 72 Stunden.

5. Diskussion

SRL ist ein makrozyklisches Lakton, das seit wenigen Jahren zur immunsuppressiven Therapie nach allogener Nierentransplantation zugelassen ist. Es bindet wie FK-506 an FKBP12, hemmt aber nicht Calcineurin sondern mTOR. Diese Proteinkinase beeinflusst unter anderem die Zytokinproduktion und Proliferation von Lymphozyten maßgeblich. T-Lymphozyten erkennen körperfremde Zellen durch das CD3-Oberflächenmolekül und leiten die allogene Transplantatabstoßung ein. Zusätzliche Zell-Zell-Kontakte, z.B. zwischen dem CD28 und dem B7-Molekül der B-Lymphozyten, führen zu einer Verstärkung der T-Lymphozyten-Aktivierung, die in einer deutlichen Zunahme der Produktion inflammatorischer Zytokine, insbesondere IL-2, resultiert. IL-2 wirkt nicht nur proliferationssteigernd auf die T-Lymphozyten sondern auch aktivierend auf Makrophagen. Auch IL-4 wird vermehrt produziert und bewirkt die Synthese von allereaktiven Antikörpern durch B-Lymphozyten. Durch Antikörper markierte Fremdzellen werden von Makrophagen zerstört, die außerdem inflammatorische Zytokine, u.a. IL-6, freisetzen. Bei *akuter* Transplantatabstoßung lassen sich eine Infiltration des Transplantats durch T-Lymphozyten und erhöhte Konzentrationen von IL-2 mRNA im Transplantat nachweisen {56, 57}. T-Lymphozyten wird deshalb eine zentrale Rolle bei der *akuten* Abstoßung zugeschrieben. Bei *chronischer* Transplantatabstoßung finden sich Hinweise auf eine erhöhte Makrophagenaktivität.

Eine immunsuppressive Wirkung von SRL wurde erstmals 1977 durch Martel beschrieben {58}. Er stellte fest, dass SRL die Entstehung zweier experimentell induzierter Autoimmunkrankheiten bei Ratten verhinderte. Obwohl SRL erfolgreich in Tiermodellen der Allotransplantation eingesetzt wurde, blieb eine Charakterisierung seiner Effekte auf das Immunsystem zunächst aus. Erst mit der Untersuchung von FK-506 kam der Substanz wieder Aufmerksamkeit zu. Dumont stellte fest, dass SRL im Gegensatz zu CsA und FK-506 kaum Einfluss auf die IL-2 mRNA-Expression muriner T-Zellen hatte, jedoch die IL-2 und IL-4 abhängige Proliferation stark hemmte {59}. Henderson und Tocci bestätigten diese Ergebnisse für menschliche T-Zellen {60, 61}. In Untersuchungen von Khanna wurde die IL-2 mRNA Expression in menschlichen PBMC-Kulturen jedoch schon durch 1 ng/ml SRL nach 4 Stunden Inkubation gehemmt {62}.

Diese Konzentration liegt deutlich unter den in klinischen Studien wirksamen Talspiegelkonzentrationen. Ein Grund für die erhöhte Wirksamkeit von SRL in PBMC-Kulturen könnte darin liegen, dass in diesen Kulturen keine Erythrozyten vorhanden sind. SRL wird in sehr hohem Anteil an Erythrozyten gebunden {32}. Der gebundene Anteil kann *in vivo* wahrscheinlich nicht immunsupprimierend wirken und die klinische Wirksamkeit setzt erst bei höheren SRL-Konzentrationen ein als in Erythrozyten-freien Kulturen.

Eine Möglichkeit *in vivo*-nähere Kulturbedingungen zu schaffen, bietet die Untersuchung von Vollblutkulturen. Im Gegensatz zu PBMC-Kulturen werden nicht selektiv bestimmte Blutzellen sondern Vollblut eingesetzt. Vollblutkulturen beinhalten also alle im peripheren Blut befindlichen Komponenten des Immunsystems. Wechselwirkungen zwischen Blutkomponenten, z.B. Erythrozyten oder Plasmaeiweißen, und Pharmaka können die Ergebnisse ähnlich wie *in vivo* beeinflussen. Im Gegensatz zu PBMC-Kulturen findet außerdem keine unspezifische Aktivierung der Zellen durch Separierungsschritte statt {52, 63}. In *ex vivo*-Versuchen liegt zudem während der ganzen Kulturzeit das Pharmakon in der Konzentration und dem Aktivitätsgrad vor wie *in vivo* – abgesehen von der Tatsache, dass keine renale oder biliäre Elimination erfolgt. Die Halbwertszeit von SRL (46-78 Stunden, {31}) ist jedoch verglichen mit der Kulturdauer (4-24 Stunden für RT-PCR und ELISA) lang, so dass solche Eliminationsprozesse von untergeordneter Bedeutung seien dürften. Ein Defizit der Vollblutkulturen gegenüber dem Zustand *in vivo* ist der fehlende Kontakt mit Transplantantantigenen. Der vor Blutabnahme und Kulturbeginn bestehende Kontakt des zirkulierenden Blutes mit diesen Antigenen reicht zur Aktivierung der Zellen nicht aus. Verschiedene Stimulantien werden zur T-Zell-Aktivierung eingesetzt. Van der Pouw-Kraan zeigte, dass die IL-4 Produktion bei Zugabe von Phorbol-12-myristat-13-acetat (PMA), einem starken Induktor der IL-2 Produktion, stark vermindert ist {64}. Die Wahl des Stimulans beeinflusst also die Zytokinproduktion erheblich und die Anwendung unterschiedlicher Stimulantien kann zu konträren Ergebnissen führen. In dieser Arbeit wurden Antikörper gegen CD3 und CD28 als Stimulantien gewählt, da sie über dieselben Signalwege wie Alloantigene die T-Zellen aktivieren. Die Blockade der Kostimulation über CD28 hemmte experimentell die *chronische* Transplantatabstoßung {7}. CD3-blockierende Antikörper werden zur

Therapie der *akuten* Transplantatabstoßung eingesetzt. Diese beiden Signalwege sind also wesentlich an der Einleitung von Abstoßungsprozessen beteiligt.

Der Großteil der Patienten ist unter den empfohlenen SRL-Talspiegelkonzentrationen von 12-20 ng/ml bei Monotherapie klinisch ausreichend immunsupprimiert. Bei einigen Patienten kommt es jedoch unter derselben Therapie zu Episoden *akuter* Transplantatabstoßung. In den experimentellen Studien zur Wirkung von SRL auf das Immunsystem wurde bisher auf diesen klinischen Hinweis einer möglicherweise bestehenden interindividuell variierenden Empfindlichkeit gegenüber SRL nicht eingegangen. In dieser Arbeit wurden die Proben individuell getrennt untersucht, so dass die Ergebnisse auch auf interindividuelle Unterschiede geprüft werden konnten.

Zunächst wurde der Effekt von SRL auf Vollblut gesunder Probanden *in vitro* untersucht. In diesen Versuchen sollte geklärt werden, ob sich die eingesetzten Methoden zum Nachweis der immunsuppressiven Wirkung von SRL eignen und ob interindividuelle Unterschiede bezüglich Art und Ausmaß der Wirkung vorliegen. Außerdem wurde die Dosisabhängigkeit der Effekte im Bereich der therapeutischen Talspiegelkonzentrationen untersucht, da Abstoßungsepisoden und Nebenwirkungen besonders an der Unter- bzw. Obergrenze dieses engen Konzentrationsbereichs auftreten {1, 43, 65}. Kinetiken wurden erstellt, um eine zeitliche Veränderung der Leukozytenfunktion durch SRL feststellen und um den Zeitpunkt seines maximalen Effekts bestimmen zu können. Im Anschluss an die *in vitro*-Versuche bestand die Möglichkeit Blutproben von Patienten während der Umstellung der immunsuppressiven Therapie von CsA auf SRL *ex vivo* zu untersuchen. Hierfür wurden dieselben Methoden und Versuchsbedingungen wie in den *in vitro*-Versuchen eingesetzt, so dass nicht nur die Wirkung der Therapieumstellung auf die Lymphozytenfunktion bestimmt, sondern auch die Ergebnisse der *ex vivo*- den *in vitro*-Versuchen gegenübergestellt werden konnten.

Aufgrund der komplexen Effekte und Wechselwirkungen im Immunsystem lässt sich der Einfluss, den ein Immunsuppressivum wie SRL ausübt, nicht anhand eines einzigen Parameters vollständig abbilden. Abhängig von den Teilfunktionen des Immunsystems, die untersucht werden sollen, müssen unterschiedliche

Methoden eingesetzt werden. In dieser Arbeit wurde die Lymphozytenfunktion mit RT-PCR, ELISA und UVID untersucht.

Die Echtzeit-RT-PCR ist eine neue Methode zur quantitativen Analyse der mRNA-Kopienzahl. Sie kann spezifisch Änderungen der Transkription ausgewählter Gene reflektieren und dadurch Effekte von SRL auf frühe Stadien der Zellaktivierung nachweisen. Sie lässt jedoch keine Differenzierung zwischen einer Änderung der Transkription und einer Änderung der posttranskriptionellen Prozessierung der mRNA als Ursache veränderter Kopienzahlen zu {66, 67}. Eine Verminderung der Kopienzahlen durch SRL könnte also nicht nur auf einer Hemmung der Transkription von Zytokingenen beruhen, sondern auch durch eine geringere Stabilität der mRNA-Transkripte verursacht sein {68}.

Neben der Echtzeit-RT-PCR werden auch das so genannte Primer-dropping-Verfahren und die kompetitive RT-PCR zur quantitativen Analyse eingesetzt. Das Primer-dropping-Verfahren ermöglicht die gleichzeitige Bestimmung verschiedener Transkripte, indem die Primer dieser Transkripte nacheinander zur laufenden PCR zugegeben werden. Dadurch befinden sich alle Transkripte gleichzeitig in der Phase des exponentiellen Anstiegs und ihre Mengen können zu diesem Zeitpunkt bestimmt werden. Auch bei der kompetitiven RT-PCR wird nur einmalig die Transkriptmenge bestimmt. Die zu bestimmende RNA wird mit synthetischer RNA bekannter Konzentration kompetitiv vervielfältigt. In dieser Arbeit wurde das Echtzeitverfahren eingesetzt, da es weniger störanfällig als das Primer-dropping-Verfahren ist und besser reproduzierbare Ergebnisse mit höherer Spezifität bei geringerem Aufwand liefert als die kompetitive RT-PCR {69}. Da diese Methode sehr sensitiv ist, können Störungen bei der Probenvorbereitung, insbesondere bei der mRNA-Isolierung, z.B. die ungenügende Lösung der mRNA, die Ergebnisse stark verfälschen. Deshalb wurde je Doppelansatz viermal die mRNA-Kopienzahl bestimmt. Die Quantifizierung erfolgte auf der Basis von Standardkurven, die mit den eingesetzten Primern erstellt wurden. Die Kopienzahlen wurden auf das konstitutiv exprimierte β -Aktin normalisiert, um eine Beeinflussung der Ergebnisse durch unterschiedlich effiziente Reverse Transkription auszugleichen. Insbesondere sehr hohe und sehr niedrige Kopienzahlen sind eventuell weniger exakt, als die errechnete absolute Zahl dies vermittelt, da sie Ct-Werten in den Randbereichen der logarithmischen Standardkurve zugeordnet sind. Aufgrund des

logarithmischen Zusammenhangs von Ct-Werten und berechneten Kopienzahlen besitzen die absoluten Kopienzahlen eine relativ große Fehlerbreite (Variiert der Ct-Wert um 0.1 so ergibt sich eine Änderung der Kopienzahl um ca. 5 %, das sind bei 100000 Kopien 5000. Die in dieser Arbeit bestimmten Ct-Werte zeigten für jeweils dieselbe Probe in der Regel Differenzen von 0 bis 0.5. Bis zu einer Differenz der Ct-Werte von 1.5 wurden Mittelwerte gebildet und ausgewertet.). Es wurden deshalb im Ergebnisteil neben den absoluten Kopienzahlen auch die Relationen der Kopienzahlen dargestellt.

Die Änderung der Transkriptionsrate bestimmter Zytokine stellt einen bedeutenden Schritt in der Zellaktivierung dar, der jedoch durch nachfolgende Mechanismen kompensiert oder verstärkt werden kann. Wang und Rosenthal zeigten z.B. eine posttranskriptionelle bzw. posttranslationale Beeinflussung der IL-4 Produktion und IL-1 Funktion durch Pentamidin bzw. vasoaktives intestinales Polypeptid (VIP) {70, 71}.

Mit den ELISA sollte geprüft werden, ob die unter SRL aufgetretene Hemmung der mRNA-Transkription auch zu einer Änderung der Zytokinsekretion führt. Eine veränderte Zytokinsekretion kann auf einer veränderten Produktion, aber auch auf einer Änderung der Freisetzung der Zytokine beruhen. Dies lässt sich mit den ELISA nicht differenzieren. Die ELISA geben außerdem keine Auskunft über die Wirkung veränderter Zytokinkonzentrationen auf die Lymphozytenfunktion und -proliferation, über die Relevanz insgesamt erhöhter Konzentrationen bestimmter Zytokine und über Interferenzen der Wirkung mit anderen Zytokinen. Deshalb wurde mit UVID zumindest die autokrine Wirkung des IL-2 und IL-4, nämlich die Proliferation der T-Zellen untersucht.

In den *in vitro*-Versuchsreihen lässt sich ein immunsuppressiver Effekt von SRL mit den eingesetzten Methoden nachweisen. SRL hemmt die T-Zell-abhängige Transkription von IL-2 und IL-4, sowie die LPS-induzierte Transkription von IL-6. Auch die Sekretion von IL-2 und IL-6 ist, eventuell infolge der verminderten Transkription, unter SRL signifikant vermindert. Die Suppression der IL-2-Sekretion trägt möglicherweise dazu bei, dass die Proliferation der T-Lymphozyten unter SRL signifikant gehemmt wird. Die Zytokinsekretion und die Lymphozytenproliferation könnten zusätzlich über andere Mechanismen durch SRL supprimiert werden.

Die *in vitro*-Versuche, insbesondere die Kinetiken zeigen, dass zur Beurteilung der Effekte von SRL auf die Zytokinexpression mehrere Messzeitpunkte nötig sind. Zum einen hängt das Ausmaß der Suppression von der Transkriptionsaktivität ab, deren Kinetik zytokinspezifische Unterschiede aufweist. Die Transkription von IL-2 und IL-4 ist bei den Probanden zwischen 8 und 24 Stunden Inkubation am stärksten. Das Maximum der IL-6 mRNA-Expression wird nach 8 Stunden Inkubation erreicht. Zum Zeitpunkt starker Transkription ist die Suppression durch SRL besonders ausgeprägt. Für IL-2 und IL-4 scheint daher die Bestimmung nach 8 bis 24 Stunden, für IL-6 nach 8 Stunden Inkubation geeignet. Neben der Kinetik der normalen Zytokinexpression muss jedoch auch der Zeitraum der SRL-Wirkung und eine Beeinflussung der Kinetik durch SRL bei der Auswahl der Messzeitpunkte berücksichtigt werden. Vor bzw. nach Erreichen des Expressionsmaximums wird die IL-2 und IL-6 mRNA-Expression nicht bei allen Probanden in gleichem Ausmaß supprimiert. Beginn und Dauer der Suppression durch SRL weisen also interindividuelle Unterschiede auf. SRL beeinflusst die Kinetik der IL-2 und IL-6 mRNA-Expression. In niedriger Konzentration hemmt es die Zunahme der IL-2 mRNA-Transkription im Zeitraum 8 bis 24 Stunden und unter 50 ng/ml verzögert sich die Zunahme der Expression im gesamten Inkubationszeitraum. Unsere Arbeitsgruppe konnte zeigen, dass auch FK-506 zu einer Verzögerung der Expressionskinetik von IL-2 mRNA führt {19}. Die IL-6 mRNA-Expression war bei einem Probanden unter höheren SRL-Konzentrationen im gesamten Inkubationszeitraum verzögert. Zwei Probanden wiesen unter SRL einen beschleunigten Abfall der IL-6 mRNA-Expression nach dem Expressionsmaximum auf. Die Expression wurde bei zwei Probanden dosisabhängig so stark gehemmt, dass sie unter 50 ng/ml bereits im Zeitraum 4-8 Stunden abnahm. Eine Messung zu einem einzigen Zeitpunkt wird also den individuell unterschiedlichen Expressionsverläufen und der unterschiedlichen Sensibilität gegenüber SRL nicht gerecht.

Unter 10 bis 50 ng/ml SRL wird die mRNA-Expression und Zytokinsekretion bei allen Probanden supprimiert. Die Expression und Zytokinsekretion wird bei keinem Probanden vollständig gehemmt und das Ausmaß der Suppression variiert interindividuell. Eine statistisch signifikante Dosisabhängigkeit lässt sich in diesem Konzentrationsbereich nicht feststellen. Allerdings ist die Suppression nach 8 Stunden unter 50 ng/ml SRL geringfügig ausgeprägter als unter 10 ng/ml.

Die mangelnde Signifikanz könnte auf der kleinen Probandenzahl beruhen. In der Literatur wurde eine Dosisabhängigkeit insbesondere der IL-2 Produktion bei Vergleich der Konzentrationen 0.1, 1, 10 und 100 ng/ml beschrieben {60}. Barten et al. stellten dagegen keine Steigerung der Wirkung auf die Proliferation im Konzentrationsbereich 0.1, 25, 100 ng/ml fest {72}. Der Konzentrationsbereich von 10-50 ng/ml wurde ausgewählt, da er den Bereich der therapeutisch angestrebten Talspiegelkonzentrationen und den entsprechenden Maximalkonzentrationen enthält: Zimmerman ermittelte für Talspiegelkonzentrationen von 5 ng/ml, 9.5 ± 3 ng/ml und 12 ng/ml Maximalkonzentrationen von 10 ng/ml bzw. 21 ± 8 ng/ml bzw. 30 ± 7 ng/ml. Für Talspiegelkonzentrationen von 27 ± 12.9 ng/ml und 37.5 ± 18.9 ng/ml fand Zimmerman Maximalkonzentrationen von 110 ± 89 ng/ml bzw. 93.6 ± 32.7 ng/ml {31}. Bei Talspiegelkonzentrationen um 10 ng/ml liegen die zugehörigen Maximalkonzentrationen demnach im Bereich von 10-50 ng/ml. Fehlt in diesem Bereich tatsächlich eine Dosisabhängigkeit, so sollte die Suppression bei regelmäßiger Einnahme konstant sein. Bei Talspiegelkonzentrationen oberhalb des empfohlenen Bereichs könnte jedoch durch hohe Maximalkonzentrationen eine relevante Zunahme der Suppression vorkommen. Inwiefern eine unter solchen Bedingungen eventuell auftretende kurzfristig verstärkte Suppression klinisch relevant ist, sollte in klinischen Studien untersucht werden.

Unter FK-506 konnte unsere Arbeitsgruppe nur bei drei der elf Probanden nach 24 Stunden eine Suppression der IL-2 mRNA-Expression nachweisen, bei den anderen Probanden wurde die Expression zu anderen Zeitpunkten supprimiert. Eine Dosisabhängigkeit der mRNA-Expression von IL-2, IL-4 und TNF α lag im Bereich 0, 12.5, 25 und 100 ng/ml vor {19}. Auch unter CsA (1 μ g/ml) war die IL-2 mRNA-Expression nach 24 Stunden nur bei einigen Probanden supprimiert, bei den übrigen Probanden trat eine Suppression zu anderen Zeitpunkten auf {20}. CsA und FK-506 weisen somit ähnlich SRL interindividuelle Unterschiede hinsichtlich der IL-2 mRNA-Expression auf. Die Konzentration des sezernierten IL-2 und die Lymphozytenproliferation werden durch alle drei Immunsuppressiva signifikant gehemmt.

Die absoluten mRNA-Kopienzahlen sind individuell sehr unterschiedlich, sowohl in den Kontrollen als auch unter SRL. Die Sekretion von IL-2 und IL-6 weisen

dagegen individuell nur geringfügige Unterschiede auf. Ursächlich für diese Diskrepanz könnten interindividuelle Unterschiede in der Steuerung posttranskriptioneller oder posttranslationaler Prozesse sein. Theoretisch führt eine niedrige Translationsaktivität bei starker Transkription zu ähnlich hohen Proteinkonzentrationen wie eine hohe Translationsaktivität bei geringer Transkription. Ebenso könnte eine unterschiedliche Regulation der Zytokinfreisetzung die verschieden starke Zytokinproduktion kompensieren. Da unter SRL die Konzentrationen von sezerniertem IL-2 und IL-6 signifikant verringert waren, können diese Prozesse jedoch den supprimierenden Effekt von SRL nicht ausgleichen. Möglicherweise unterliegen sie ebenfalls einer Hemmung durch SRL. Die Unterschiede in der mRNA-Expression könnten unabhängig vom Einfluss auf die Zytokinsekretion auch relevant für andere intrazelluläre Prozesse sein oder gut mit anderen für das Transplantatüberleben relevanten Mechanismen korrelieren.

IL-4 wurde insgesamt in geringerem Ausmaß exprimiert als IL-2 und IL-6. Die Konzentration von sezerniertem IL-4 lag unterhalb der Nachweisgrenze des ELISA. Deshalb kann keine Aussage zum Einfluss der interindividuellen Unterschiede der IL-4 mRNA-Expression auf die Zytokinsekretion gemacht werden. Die gegenüber IL-2 und IL-6 geringere Produktion und Sekretion von IL-4 ist eventuell durch eine geringere Aktivierung dieser Prozesse durch die gewählte Stimulation bedingt. Der Vergleich der absoluten Konzentrationen verschiedener Zytokine lässt keine Schlüsse auf die Bedeutung der einzelnen Zytokine zu, da sie jeweils verschiedene Funktionen haben. Für die Wirkung ist möglicherweise das Ausmaß der Konzentrationsänderung eines Zytokins bedeutsamer als die absolute Konzentration.

In *ex vivo*-Versuchen, in denen die IL-2 mRNA-Expression von nierentransplantierten Patienten unter Therapie mit FK-506 bzw. CsA gemessen wurde, stellte unsere Arbeitsgruppe fest, dass die Untersuchung eines Einzelwerts der individuell stark unterschiedlichen Empfindlichkeit gegenüber Calcineurininhibitoren nicht gerecht wird. Insbesondere nach 24 Stunden Inkubation zeigten sich konträre Effekte {19, 20}.

Ex vivo konnte in dieser Arbeit bei vier Patienten unter der Kombination von SRL und CsA eine zusätzliche Suppression der Expression von IL-2 und IL-4 und der IL-2 Sekretion gegenüber der CsA-Monotherapie festgestellt werden. Diese zusätzliche Suppression trat bei einem der Patienten erst im Verlauf eines Monats deutlich auf und führte bei einem anderen Patienten mit sehr hoher SRL-Konzentration im Blut kurzfristig zur völligen Blockierung der IL-2 mRNA-Expression. Mit Ausnahme dieses Patienten unterschied sich die Suppression unter CsA und SRL *ex vivo* von der unter SRL und CsA *in vitro* bei annähernd gleichen SRL-Konzentrationen unwesentlich.

Auch für die Kombination von SRL mit FK-506 wurden gegenüber der Therapie mit FK-506 und Azathioprin oder Mycophenolatmofetil geringere Konzentrationen von zirkulierendem IL-2 und IL-4 im Blut Nierentransplantierter beschrieben {73}. Die zusätzliche Suppression durch SRL lässt sich wahrscheinlich dadurch erklären, dass SRL die Zytokinproduktion an anderer Stelle beeinflusst als die Calcineurininhibitoren. In der Kombinationstherapie werden zusätzlich zur Hemmung calciumabhängiger Signaltransduktionswege auch Effekte der nicht durch Calcineurin regulierten Wege (z.B. B7/CD28) gehemmt. Unter SRL-basierter Therapie wurde *ex vivo* eine stärkere Suppression der IL-2 und IL-4 mRNA-Expression und der IL-2 Sekretion als unter CsA-basierter Therapie nachgewiesen. Möglicherweise sind die durch SRL gehemmten Effekte calciumunabhängiger Signaltransduktion ungleich bedeutender für die IL-2 und IL-4 Produktion sowie für die T-Zell-Proliferation. Eventuell erfolgt die Hemmung durch SRL an einem Punkt, an dem gleichzeitig Effekte calciumabhängiger und calciumunabhängiger Signaltransduktion unterbunden werden.

Angesichts der stärkeren Suppression der IL-2 und IL-4 Produktion und der Lymphozytenproliferation unter SRL-Monotherapie gegenüber CsA-Monotherapie könnte man zwar folgern, dass auch bei SRL-Talspiegelkonzentrationen unter 8 ng/ml noch eine ausreichende Immunsuppression resultierte. Möglicherweise spielen jedoch für die immunsuppressive Wirksamkeit von SRL und CsA noch andere als die untersuchten Parameter des Immunsystems eine wichtige Rolle. Wenn diese durch CsA anders als durch SRL beeinflusst würden, könnte zur Erzielung des gleichen immunsuppressiven Gesamteffekts eventuell eine stärkere Suppression der IL-2 und IL-4 Produktion sowie der Lymphozytenproliferation durch SRL als durch CsA nötig sein.

Die Beobachtung, dass unter Therapie mit SRL im Vergleich zu CsA, FK-506 und Mycophenolatmofetil häufiger bakterielle Wundinfektionen auftreten, weist auf Unterschiede der Wirkung dieser Immunsuppressiva auf weitere Elemente des Immunsystems hin. Jörgensen führte die erhöhte Infektionsneigung auf die deutliche Suppression der Produktion des antiinflammatorischen IL-10 durch SRL im Gegensatz zu CsA und FK-506 in LPS-stimulierten Vollblutkulturen zurück. Die Produktion des proinflammatorischen IL-6 wurde in den Kulturen weder durch SRL noch durch CsA oder FK-506 beeinflusst {74}. Andere Studien bestätigen, dass CsA und FK-506 keinen bzw. kaum einen Einfluss auf die LPS-stimulierte Zytokinproduktion haben {75, 76, 77}. In Kulturen von Feinnadelbiopsien sieben Tage nach Nierentransplantation wurden allerdings bei den mit SRL behandelten Patienten geringere Konzentrationen von IL-6 als bei den mit Mycophenolatmofetil behandelten Patienten nachgewiesen {78}.

In dieser Arbeit konnte eine signifikante Hemmung der IL-6 mRNA-Expression und der IL-6 Sekretion in LPS-stimulierten Vollblutkulturen mit SRL beobachtet werden. Da die eingesetzten Konzentrationen von SRL jeweils im therapeutischen Bereich lagen, die Konzentration von LPS in den Ansätzen dieser Arbeit aber das Zehnfache der von Jörgensen eingesetzten Konzentration betrug, wirkt SRL eventuell erst bei entsprechend starker Aktivierung supprimierend auf die IL-6 Produktion. Möglicherweise führt die Bindung von LPS an lösliches CD14 bei hohen LPS-Konzentrationen zur Verschiebung des Maximums der IL-6 Produktion von Makrophagen, die CD14 zellgebunden als hochaffinen LPS-Rezeptor besitzen, zu anderen Zellen, deren IL-6 Produktion durch den Komplex von LPS

und löslichem CD14 beträchtlich gesteigert, aber durch SRL auch stark gehemmt wird. Die IL-6 Produktion nach T-Zell-spezifischer Stimulation war deutlich geringer als nach LPS-Stimulation und ließ sich nicht bei allen Probanden durch SRL supprimieren.

Für die Transplantationsmedizin ist eine Beeinflussung der IL-6 Produktion durch Immunsuppressiva interessant, da viele Untersuchungen für eine Beteiligung dieses Zytokins an Abstoßungsprozessen sprechen: Bei *akuten* und insbesondere bei *chronischen* Abstoßungsprozessen ist die IL-6 mRNA-Expression im Transplantat stark erhöht {81, 82}. IL-6 führt zur Differenzierung und Reifung von B-Zellen zu Antikörper-produzierenden Plasmazellen. Antikörper gegen Fremd-HLA sind wesentlich an der Entstehung *chronischer* Abstoßungen beteiligt {4, 9}. Außerdem begünstigt IL-6 die Proliferation mesangialer Zellen der Niere, die zur Pathogenese der chronischen Abstoßung beiträgt {83}.

Einen klinischen Hinweis auf die Bedeutung von IL-6 im Kontext der Transplantation gibt die Entdeckung, dass Polymorphismen im Bereich des IL-6 Promotors (Startbereich der Transkription) mit dem langfristigen Überleben von Nierenallotransplantaten assoziiert sind {79}.

Nutzen eines Monitorings der Zytokinexpression

Die Praxis der Dosierung von Immunsuppressiva anhand ihrer Talspiegelkonzentrationen ist mit wenig Aufwand durchführbar und erlaubt im Gegensatz zu einer fixen Dosierung eine Anpassung der Therapie an individuell unterschiedliche pharmakokinetische Bedingungen. Jedoch geben die Talspiegelkonzentrationen keine Information über die pharmakodynamische Wirksamkeit der Immunsuppressiva, insbesondere auch keine Information über das Zusammenwirken von Immunsuppressiva in Kombinationen. Neben den Talspiegelkonzentrationen orientiert sich die Therapie daher wesentlich an klinischen Parametern, die allerdings erst verspätet die Folgen einer meist länger bestehenden Fehldosierung aufzeigen können. Aufgrund der Unzulänglichkeiten der pharmakokinetischen und der klinischen Therapieüberwachung wäre eine wirkungsbezogene Therapiekontrolle, ein pharmakodynamisches Monitoring,

hilfreich. Prinzipiell können zwei Arten des pharmakodynamischen Monitoring unterschieden werden. Einerseits besteht die Möglichkeit, die Funktion des Zielmoleküls zu prüfen. Das Ausmaß der Dephosphorylierung phosphorylierter Polypeptide durch Calcineurin wurde zur Messung der Wirkung von CsA bestimmt. Ebenso wurde der Effekt von Mycophenolatmofetil anhand der Funktion der Inosinmonophosphatdehydrogenase festgestellt. Ein entsprechender Ansatz versucht die Wirkung von SRL mit Hilfe der Messung der Aktivität der p70s6-Kinase zu beschreiben. Unter Verwendung dieses wenig robusten Ansatzes wurde ab einer Konzentration von 10 µg/l ein proportionales Verhältnis zwischen Enzymhemmung und SRL-Konzentration festgestellt {80}.

Offensichtlich lässt diese Variante des pharmakodynamischen Monitoring die individuellen Unterschiede in der Regulation der Immunantwort unbeachtet. Einige T-Zellfunktionen sind *in vitro* und *ex vivo* gegenüber CsA und FK-506 interindividuell verschieden sensibel {19, 20}. Die Ergebnisse dieser Arbeit weisen auf interindividuelle Unterschiede in der Sensibilität der T-Zell-spezifischen IL-2 und IL-6 Produktion gegenüber SRL hin. Über die Bedeutung dieser Unterschiede für den klinischen Verlauf kann aufgrund der kleinen Patientenzahl und des kurzen Untersuchungszeitraums keine allgemeine Aussage gemacht werden. Vielleicht besteht ein Zusammenhang zwischen der Sensibilität der IL-6 Produktion gegenüber SRL und IL-6 Promotorpolymorphismen, die wie eingangs erwähnt mit einem unterschiedlichen Nierentransplantatüberleben assoziiert sind.

Eine Korrelation zwischen SRL-Konzentrationen im Bereich von 10-50 ng/ml und den untersuchten Parametern der Leukozytenfunktion konnte nicht eindeutig nachgewiesen werden. Einerseits mag dies auf der geringen Fallzahl beruhen, andererseits erschwert auch der enge Konzentrationsbereich den Nachweis einer eventuell bestehenden Korrelation. Eine oberhalb des therapeutischen Konzentrationsbereichs gelegene SRL-Konzentration führte bei Patient Nr. 2 zu einer vollständigen Suppression der IL-2 mRNA-Expression. In Fällen, in denen Interaktionen hinsichtlich der Immunsuppression bestehen, z.B. bei Kombinationstherapie oder Therapieumstellung, und bei dem Verdacht auf ein besonders starkes oder schwaches Ansprechen einzelner Patienten auf die immunsuppressive Therapie könnte ein Monitoring der Leukozytenfunktion frühzeitig Aufschluss über die Effektivität der Therapie im Einzelfall geben.

Anhand der Untersuchung der Interleukinproduktion im *in vitro*-Ansatz ist vielleicht sogar eine semiquantitative Vorhersage des Ausmaßes der immunsuppressiven Wirkung von SRL möglich. Da die Interleukinexpression individuell sehr unterschiedlich hoch ist, müssen zur Beurteilung einzelner Messergebnisse allerdings Vorwerte bekannt sein. Es war daher in dieser Arbeit nicht möglich den Effekt von SRL und CsA bei den Patienten absolut gegenüberzustellen, da keine Werte über die Interleukinexpression vor Beginn der Immunsuppression vorlagen: Alle Patienten waren zum Zeitpunkt des Beginns der Studie schon längere Zeit mit CsA behandelt.

Gegenüber der Proliferationsmessung durch UVID hat die Bestimmung der Interleukinproduktion mittels Echtzeit-RT-PCR und ELISA kürzere Inkubationszeiten und somit ein schneller verfügbares Ergebnis zum Vorteil. Untersuchungen zur Interleukinproduktion an größeren Patientenkollektiven könnten den Weg für ein effizientes Therapiemonitoring bahnen. Solche Untersuchungen sollten klären, welche Interleukine am stärksten mit dem klinischen Verlauf korrelieren, und ob die Messung der Interleukinproduktion in einem einzigen Inkubationszeitraum die immunsuppressive Wirkung ausreichend reflektiert, oder ob der Einfluss auf die Kinetik der Expression wesentlicher ist.

6. Zusammenfassung

Sirolimus ist ein vor kurzem zugelassenes Immunsuppressivum, das bei Patienten nach allogener Nierentransplantation eingesetzt wird. Es hemmt mTOR, das bedeutende Signalwege der Zellaktivierung und -proliferation reguliert. Neben dem direkten Zellzyklusarrest von T-Zellen in der G1-Phase führt auch die verminderte Produktion aktivierender Zytokine zur Immunsuppression. Ziel der immunsuppressiven Therapie ist es, Patienten vor allogenen Transplantatabstoßungen zu schützen und die Nebenwirkungen der Therapie, insbesondere das Risiko opportunistischer Infektionen zu minimieren. Dazu bedarf es einer individuell angepassten Dosierung, die sich momentan am klinischen Verlauf und an den Talspiegelkonzentrationen von SRL orientiert. Unter diesen Therapiekontrollen treten dennoch bei einer Anzahl von Patienten Abstoßungsreaktionen bzw. nicht-tolerierbare Nebenwirkungen auf. Eventuell werden sie durch individuelle Unterschiede der Wirksamkeit von SRL verursacht. Im Hinblick auf eine Verbesserung der Therapiekontrolle durch Bestimmung pharmakodynamischer Parameter sollten in dieser Arbeit die Effekte von SRL auf einzelne Parameter des Immunsystems mit quantitativer RT-PCR, ELISA und UVID-Technologie individuell charakterisiert werden.

Durch SRL wird die mRNA-Expression von IL-2, IL-4 und IL-6 *in vitro* insbesondere zum Zeitpunkt maximaler Transkription gehemmt, d.h. bei IL-2 und IL-4 nach 8 bis 24 Stunden, bei IL-6 nach 4 bis 8 Stunden Inkubation. Ähnlich wie unter CsA und FK-506 variieren jedoch Maximum, Ausmaß, Dauer und damit der optimale Messzeitpunkt der Suppression individuell. Unter einer SRL-Konzentration von 50 ng/ml kommt es gegenüber 10 ng/ml zu einer weiteren, jedoch nicht signifikanten Zunahme der Suppression. Verglichen mit einer CsA-Monotherapie wirken sowohl die Kombination von CsA und SRL *in vitro* und *ex vivo*, als auch eine SRL-Monotherapie stärker supprimierend auf die Produktion von IL-2 und IL-4 bzw. die T-Zell-Proliferation.

Die quantitative Bestimmung transplantationsrelevanter Zytokine in Vollblutkulturen mittels RT-PCR stellt möglicherweise einen geeigneten und schnell verfügbaren pharmakodynamischen Parameter zur Bestimmung der individuellen Wirksamkeit von SRL dar. Inwiefern eine Korrelation zu klinischen Verläufen

besteht und ob eine individuelle Therapiesteuerung dadurch möglich ist, muss in prospektiven klinischen Studien geklärt werden.

7. Literaturverzeichnis

- 1 MacDonald AS: A worldwide, phase III, randomized, controlled, safety and efficacy study of a sirolimus/cyclosporine regimen for prevention of acute rejection in recipients of primary mismatched renal allografts. *Transplantation* 2001;71:271-280.
- 2 Kahan BD: Efficacy of sirolimus compared with azathioprine for reduction of acute renal allograft rejection: a randomised multicentre study. The Rapamune US Study Group. *Lancet* 2000;356:194-202.
- 3 Tanabe K: Calcineurin inhibitors in renal transplantation: what is the best option? *Drugs* 2003;63:1535-1548.
- 4 Sijpkens YW, Doxiadis II, van Kemenade FJ, Zwinderman AH, de Fijter JW, Claas FH, Bruijn JA, Paul LC: Chronic rejection with or without transplant vasculopathy. *Clin Transplant* 2003;17:163-170.
- 5 Joosten SA, van Kooten C, Paul LC: Pathogenesis of chronic allograft rejection. *Transpl Int* 2003;16:137-145.
- 6 Mancini D, Pinney S, Burkhoff D, LaManca J, Itescu S, Burke E, Edwards N, Oz M, Marks AR: Use of rapamycin slows progression of cardiac transplantation vasculopathy. *Circulation* 2003;108:48-53.
- 7 Azuma H, Chandraker A, Nadeau K, Hancock WW, Carpenter CB, Tilney NL and Sayegh MH: Blockade of T-cell costimulation prevents development of experimental chronic renal allograft rejection. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1996;93[22]:12439-12444.
- 8 Larsen CP, Elwood ET, Alexander DZ, Ritchie SC, Hendrix R, Tucker-Burden C, Cho HR, Aruffo A, Hollenbaugh D, Linsley PS, Winn KJ, Pearson TC: Long-term acceptance of skin and cardiac allografts after blocking CD40 and CD28 pathways. *Nature* 1996;381:434-438.
- 9 Cai J, Terasaki PI, Bloom DD, Torrealba JR, Friedl A, Sollinger HW and Knechtle SJ: Correlation between human leukocyte antigen antibody production and serum creatinine in patients receiving sirolimus monotherapy after Campath-1H induction. *Transplantation* 2004;78[6]:919-924.
- 10 Chandler C, Passaro E Jr: Transplant rejection. Mechanisms and treatment. *Arch Surg* 1993;128[3]:279-283.
- 11 D'Andrea A, Aste-Amezaga M, Valiante NM, Ma X, Kubin M, Trinchieri G: Interleukin 10 (IL-10) inhibits human lymphocyte interferon gamma- production by suppressing natural killer cell stimulatory factor/IL-12 synthesis in accessory cells. *J Exp Med* 1993;178:1041-1048.
- 12 Groux H, O'Garra A, Bigler M, Rouleau M, Antonenko S, deVries JE, Roncarolo MG: A CD4+ T-cell subset inhibits antigen-specific T-cell responses and prevents colitis. *Nature* 1997;389[6652]:737-742.

- 13 Walsh PT, Strom TB, Turka LA: Routes to transplant. Tolerance versus rejection: The role of cytokines. *Immunity* 2004;20:121-131.
- 14 Pascual M, Swinford RD, Ingelfinger JR, Williams WW, Cosimi AB, Tolkoff-Rubin N: Chronic rejection and chronic cyclosporin toxicity in renal allografts. *Immunol Today* 1998;19:514-519.
- 15 Smith KA: Interleukin-2: inception, impact, and implications. *Science* 1988;240[4856]:1169-1176.
- 16 Paul WE: Interleukin-4: A prototypic immunoregulatory lymphokine. *Blood* 1991;77[9]:1859-1870.
- 17 Kishimoto T: The biology of Interleukin-6. *Blood* 1989;74:1-10.
- 18 Geginat J, Clissi B, Moro M, Dellabona P, Bender JR and Pardi R: CD28 and LFA-1 contribute to cyclosporin A-resistant T cell growth by stabilizing the IL-2 mRNA through distinct signaling pathways. *Eur J Immunol* 2000; 30[4]: 1136-1144.
- 19 Hartel C, Schumacher N, Fricke L, Ebel B, Kirchner H, Muller-Steinhardt M: Sensitivity of whole-blood T lymphocytes in individual patients to tacrolimus (FK 506): impact of interleukin-2 mRNA expression as surrogate measure of immunosuppressive effect. *Clin Chem* 2004;50:141-151.
- 20 Hartel C, Hammers HJ, Schlenke P, Fricke L, Schumacher N, Kirchner H, Muller-Steinhardt M: Individual variability in cyclosporin A sensitivity: the assessment of functional measures on CD28-mediated costimulation of human whole blood T lymphocytes. *J Interferon Cytokine Res* 2003;23:91- 99.
- 21 Beveridge T and Calne RY: Cyclosporine (Sandimmun) in cadaveric renal transplantation. Ten-year follow-up of a multicenter trial. European Multicentre Trial Group. *Transplantation* 1995; 59[11]: 1568-1570.
- 22 Bertani T, Ferrazzi P, Schieppati A, Ruggenti P, Gamba A, Parenzan L, Mecca G, Perico N, Imberti O, Remuzzi A: Nature and extent of glomerular injury induced by cyclosporine in heart transplant patients. *Kidney Int* 1991;40:243-250.
- 23 Sabers CJ, Martin MM, Brunn GJ, Williams JM, Dumont FJ, Wiederrecht G, Abraham RT: Isolation of a protein target of the FKBP12-rapamycin complex in mammalian cells. *J Biol Chem* 1995;270:815-822.
- 24 Chen J, Zheng XF, Brown EJ and Schreiber SL: Identification of an 11-kDa FKBP12-rapamycin-binding domain within the 289-kDa FKBP12- rapamycin-associated protein and characterization of a critical serine residue. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1995; 92[11]: 4947-4951.
- 25 Kuo CJ, Chung J, Fiorentino DF, Flanagan WM, Blenis J, Crabtree GR: Rapamycin selectively inhibits interleukin-2 activation of p70 S6 kinase. *Nature* 1992;358:70-73.
- 26 Price DJ, Grove JR, Calvo V, Avruch J, Bierer BE: Rapamycin-induced inhibition of the 70-kilodalton S6 protein kinase. *Science* 1992;257:973-977.

- 27 Brunn GJ, Hudson CC, Sekulic A, Williams JM, Hosoi H, Houghton PJ, Lawrence JC, Jr. And Abraham RT: Phosphorylation of the translational repressor PHAS-I by the mammalian target of rapamycin. *Science* 1997; 277[5322]: 99-101.
- 28 Lai JH, Tan TH: CD28 signaling causes a sustained down-regulation of I kappa B alpha which can be prevented by the immunosuppressant rapamycin. *J Biol Chem* 1994;269:30077-30080.
- 29 Luo Y, Marx SO, Kiyokawa H, Koff A, Massague J and Marks AR: Rapamycin resistance tied to defective regulation of p27Kip1. *Mol Cell Biol* 1996; 16[12]: 6744-6751.
- 30 Nourse J, Firpo E, Flanagan WM, Coats S, Polyak K, Lee MH, Massague J, Crabtree GR, Roberts JM: Interleukin-2-mediated elimination of the p27Kip1 cyclin-dependent kinase inhibitor prevented by rapamycin. *Nature* 1994;372:570-573.
- 31 Zimmerman JJ, Kahan BD: Pharmacokinetics of sirolimus in stable renal transplant patients after multiple oral dose administration. *J Clin Pharmacol* 1997;37:405-415.
- 32 Yatscoff R, LeGatt D, Keenan R, Chackowsky P: Blood distribution of rapamycin. *Transplantation* 1993;56:1202-1206.
- 33 McAlister VC, Gao Z, Peltekian K, Domingues J, Mahalati K, MacDonald AS: Sirolimus-tacrolimus combination immunosuppression. *Lancet* 2000;355:376-377.
- 34 Hong JC, Kahan BD: Sirolimus rescue therapy for refractory rejection in renal transplantation. *Transplantation* 2001;71:1579-1584.
- 35 Ciancio G, Burke GW, Gaynor JJ, Mattiazzi A, Roth D, Kupin W, Nicolas M, Ruiz P, Rosen A and Miller J: A randomized long-term trial of tacrolimus/sirolimus versus tacrolimus/mycophenolate mofetil versus cyclosporine (NEORAL)/sirolimus in renal transplantation. II. Survival, function, and protocol compliance at 1 year. *Transplantation* 2004; 77[2]: 252-258.
- 36 Mota A, Arias M, Taskinen EI, Paavonen T, Brault Y, Legendre C, Claesson K, Castagneto M, Campistol JM, Hutchison B, Burke JT, Yilmaz S, Hayry P, Neylan JF: Sirolimus-based therapy following early cyclosporine withdrawal provides significantly improved renal histology and function at 3 years. *Am J Transplant* 2004;4:953-961.
- 37 Oberbauer R, Kreis H, Johnson RW, Mota A, Claesson K, Ruiz JC, Wilczek H, Jamieson N, Henriques AC, Paczek L, Chapman J, Burke JT: Long-term improvement in renal function with sirolimus after early cyclosporine withdrawal in renal transplant recipients: 2-year results of the Rapamune Maintenance Regimen Study. *Transplantation* 2003;76:364-370.

- 38 Flechner SM, Goldfarb D, Modlin C, Feng J, Krishnamurthi V, Mastroianni B, Savas K, Cook DJ, Novick AC: Kidney transplantation without calcineurin inhibitor drugs: a prospective, randomized trial of sirolimus versus cyclosporine. *Transplantation* 2002;74:1070-1076.
- 39 Hong JC, Kahan BD: Use of anti-CD25 monoclonal antibody in combination with rapamycin to eliminate cyclosporine treatment during the induction phase of immunosuppression. *Transplantation* 1999;68:701-704.
- 40 Hong JC, Kahan BD: A calcineurin antagonist-free induction strategy for immunosuppression in cadaveric kidney transplant recipients at risk for delayed graft function. *Transplantation* 2001;71:1320-1328.
- 41 Knight RJ, Kerman RH, Schoenberg L, Podder H, Van Buren CT, Katz S, Kahan BD: The selective use of basiliximab versus thymoglobulin in combination with sirolimus for cadaveric renal transplant recipients at low risk versus high risk for delayed graft function. *Transplantation* 2004;78:904-910.
- 42 Tejani A, Alexander S, Ettenger R, Lerner G, Zimmerman J, Kohaut E, Briscoe DM: Safety and pharmacokinetics of ascending single doses of sirolimus (Rapamune, rapamycin) in pediatric patients with stable chronic renal failure undergoing dialysis. *Pediatr Transplant* 2004;8:151-160.
- 43 Hong JC, Kahan BD: Sirolimus-induced thrombocytopenia and leukopenia in renal transplant recipients: risk factors, incidence, progression, and management. *Transplantation* 2000;69:2085-2090.
- 44 Pham PT, Pham PC, Danovitch GM, Ross DJ, Gritsch HA, Kendrick EA, Singer J, Shah T and Wilkinson AH: Sirolimus-associated pulmonary toxicity. *Transplantation* 2004; 77[8]: 1215-1220.
- 45 Mathew T, Kreis H, Friend P: Two-year incidence of malignancy in sirolimus-treated renal transplant recipients: results from five multicenter studies. *Clin Transplant* 2004;18:446-449.
- 46 Guba M, von Breitenbuch P, Steinbauer M, Koehl G, Flegel S, Hornung M, Bruns CJ, Zuelke C, Farkas S, Anthuber M, Jauch KW and Geissler EK: Rapamycin inhibits primary and metastatic tumor growth by antiangiogenesis: involvement of vascular endothelial growth factor. *Nat Med* 2002; 8[2]: 128-135
- 47 Dean PG, Lund WJ, Larson TS, Prieto M, Nyberg SL, Ishitani MB, Kremers WK and Stegall MD: Wound-healing complications after kidney transplantation: a prospective, randomized comparison of sirolimus and tacrolimus. *Transplantation* 2004; 77[10]: 1555-1561.
- 48 Moses JW, Leon MB, Popma JJ, Fitzgerald PJ, Holmes DR, O'Shaughnessy C, Caputo RP, Kereiakes DJ, Williams DO, Teirstein PS, Jaeger JL, Kuntz RE: Sirolimus-eluting stents versus standard stents in patients with stenosis in a native coronary artery. *N Engl J Med* 2003;349:1315-1323.
- 49 Harding MW: Immunophilins, mTOR, and pharmacodynamic strategies for a targeted cancer therapy. *Clin Cancer Res* 2003;9:2882-2886.

- 50 Huang S, Shu L, Easton J, Harwood FC, Germain GS, Ichijo H, Houghton PJ: Inhibition of mammalian target of rapamycin activates apoptosis signal-regulating kinase 1 signaling by suppressing protein phosphatase 5 activity. *J Biol Chem* 2004;279:36490-36496.
- 51 Panwalkar A, Verstovsek S, Giles FJ: Mammalian target of rapamycin inhibition as therapy for hematologic malignancies. *Cancer* 2004;100:657-666.
- 52 Hartel C, Bein G, Kirchner H, Kluter H: A human whole-blood assay for analysis of T-cell function by quantification of cytokine mRNA. *Scand J Immunol* 1999;49:649-654.
- 53 Riddell SR, Greenberg PD: The use of anti-CD3 and anti-CD28 monoclonal antibodies to clone and expand human antigen-specific T cells. *J Immunol Methods* 1990;128:189-201.
- 54 Jefferies HB, Reinhard C, Kozma SC, Thomas G: Rapamycin selectively represses translation of the polypyrimidine tract mRNA family. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1994;91:4441-4445.
- 55 Hammers HJ, Saballus M, Sheikzadeh S, Schlenke P: Introduction of a novel proliferation assay for pharmacological studies allowing the combination of BrdU detection and phenotyping. *J Immunol Methods* 2002;264:89-93.
- 56 Suthanthiran M: Molecular analysis of human renal allografts: differential intragraft gene expression during rejection. *Kidney Int Suppl* 1997;58:S15- 21.
- 57 Bachetoni A, Lionetti P, Cinti P, Alo P, Molajoni ER, Di Tondo U, Barnaba V, Alfani D, Cortesini R: Homing of CD4+ CD56+ T lymphocytes into kidney allografts during tubular necrosis or rejection. *Clin Transplant* 1995;9[6]: 433-437.
- 58 Martel RR, Klicius J, Galet S: Inhibition of the immune response by rapamycin, a new antifungal antibiotic. *Can J Physiol Pharmacol* 1977;55:48-51.
- 59 Dumont FJ, Staruch MJ, Koprak SL, Melino MR, Sigal NH: Distinct mechanisms of suppression of murine T cell activation by the related macrolides FK-506 and rapamycin. *J Immunol* 1990;144:251-258.
- 60 Henderson DJ, Naya I, Bundick RV, Smith GM, Schmidt JA: Comparison of the effects of FK-506, cyclosporin A and rapamycin on IL-2 production. *Immunology* 1991;73:316-321.
- 61 Tocci MJ, Matkovich DA, Collier KA, Kwok P, Dumont F, Lin S, Degudicibus S, Sikierka JJ, Chin J, Hutchinson NI: The immunosuppressant FK 506 selectively inhibits expression of early T cell activation genes. *J Immunol* 1989;143:718-726.
- 62 Khanna AK: Mechanism of the combination immunosuppressive effects of rapamycin with either cyclosporine or tacrolimus. *Transplantation* 2000;70:690-694.

- 63 Elsasser-Beile U, von Kleist S, Gallati H: Evaluation of a test system for measuring cytokine production in human whole blood cell cultures. *J Immunol Methods* 1991;139:191-195.
- 64 Pouw-Kraan T, van Kooten C, Rensink I, Aarden L: Interleukin (IL)-4 production by human T cells: differential regulation of IL-4 vs. IL-2 production. *Eur J Immunol* 1992;22:1237-1241.
- 65 Groth CG, Bäckman L, Morales JM, Calne R, Kreis H, Lang P, Touraine JL, Claesson K, Campistol JM, Durand D, Wramner L, Brattström C, Charpentier B: Sirolimus (Rapamycin)-based therapy in human renal transplantation. *Transplantation* 1999;67:1036-1042.
- 66 Walker KB: Detection and analysis of cytokine mRNA in tissues and cell lines. *J Immunol Methods* 1998;212:113-123.
- 67 Henics T, Sanfridson A, Hamilton BJ, Nagy E, Rigby WF: Enhanced stability of interleukin-2 mRNA in MLA 144 cells. Possible role of cytoplasmic AU-rich sequence-binding proteins. *J Biol Chem* 1994;269:5377-5383.
- 68 Ghosh P, Buchholz MA, Yano S, Taub D, Longo DL: Effect of rapamycin on the cyclosporin A-resistant CD28-mediated costimulatory pathway. *Blood* 2002;99:4517-4524.
- 69 Wall SJ, Edwards DR: Quantitative reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR): a comparison of primer-dropping, competitive, and real-time RT-PCRs. *Anal Biochem* 2002;300:269-273.
- 70 Wang HY, Xin Z, Tang H, Ganea D: Vasoactive intestinal peptide inhibits IL-4 production in murine T cells by a post-transcriptional mechanism. *J Immunol* 1996;156:3243-3253.
- 71 Rosenthal GJ, Corsini E, Craig WA, Comment CE, Luster MI: Pentamidine: an inhibitor of interleukin-1 that acts via a post-translational event. *Toxicol Appl Pharmacol* 1991;107:555-561.
- 72 Barten MJ, Gummert JF, van Gelder T, Shorthouse R, Morris RE: Flow cytometric quantitation of calcium-dependent and -independent mitogen-stimulation of T cell functions in whole blood: inhibition by immunosuppressive drugs in vitro. *J Immunol Methods* 2001;253:95-112.
- 73 Khanna A, Plummer M, Bromberek K, Woodliff J, Hariharan S: Immunomodulation in stable renal transplant recipients with concomitant tacrolimus and sirolimus therapy. *Med Immunol* 2002;1:3.
- 74 Jorgensen PF, Wang JE, Almlof M, Solberg R, Okkenhaug C, Scholz T, Thiemermann C, Foster SJ, Aasen AO: Sirolimus interferes with the innate response to bacterial products in human whole blood by attenuation of IL-10 production. *Scand J Immunol* 2001;53:184-191.
- 75 Kay JE, Kromwel L, Doe SE, Denyer M: Inhibition of T and B lymphocyte proliferation by rapamycin. *Immunology* 1991;72:544-549.

- 76 Wicker LS, Boltz RC, Jr., Matt V, Nichols EA, Peterson LB, Sigal NH: Suppression of B cell activation by cyclosporin A, FK506 and rapamycin. *Eur J Immunol* 1990;20:2277-2283.
- 77 Andersson J, Nagy S, Groth CG, Andersson U: Effects of FK 506 and cyclosporin A on cytokine production studied in vitro at a single-cell level. *Immunology* 1992;75:136-142.
- 78 Oliveira JG, Xavier P, Sampaio SM, Henriques C, Tavares I, Mendes AA, Pestana M: Compared to mycophenolate mofetil, rapamycin induces significant changes on growth factors and growth factor receptors in the early days post-kidney transplantation. *Transplantation* 2002;73:915-920.
- 79 Muller-Steinhardt M, Fricke L, Muller B, Ebel B, Kirchner H, Hartel C: Cooperative influence of the interleukin-6 promoter polymorphisms -597, -572 and -174 on long-term kidney allograft survival. *Am J Transplant* 2004;4:402-406.
- 80 Yatscoff RW, Aspeslet LJ, Gallant HL: Pharmacodynamic monitoring of immunosuppressive drugs. *Clin Chem* 1998;44:428-432.
- 81 Waiser J, Budde K, Katalinic A, Kuerzdorfer M, Riess R, Neumayer HH: Interleukin-6 expression after renal transplantation. *Nephrol Dial Transplant* 1997;12:753-9.
- 82 Malan Borel I, Racca A, Garcia MI, Bailat A, Quiroga F, Soutullo A, Gaité L: Gammadelta T cells and interleukin-6 levels could provide information regarding the progression of human renal allograft. *Scand J Immunol* 2003;58:99-105.
- 83 Hancock WH, Whitley WD, Tullius SG, Heeman UW, Wasowska B, Baldwin WM 3rd, Tilney NL

8. Danksagung

Ich möchte mich bedanken bei meinem Doktorvater, Herrn PD Dr. med. Müller-Steinhardt für das große Engagement, mit dem er mir von der Planung bis zum Schreiben der Arbeit entgegentrat. Auch Herr Dr. med. Härtel trug wesentlich zum Gelingen dieser Arbeit bei.

Ich danke Herrn Prof. Dr. med. Kirchner für die Bereitstellung eines Arbeitsplatzes und allen Mitarbeitern des Instituts für Immunologie und Transfusionsmedizin des UKSH-Lübeck für die Hilfsbereitschaft.

Für die gute Zusammenarbeit danke ich auch dem Leiter des Transplantationszentrums des UKSH-Lübeck, Herrn Prof. Dr. med. Fricke, den Mitarbeitern der Station 19T (jetzige 11T) und der nephrologischen Poliklinik.

Allen Probanden und Patienten sage ich ein herzliches Dankeschön für die Blutproben, ohne die diese Arbeit nicht hätte durchgeführt werden können.

Frau Brigitte Ebel danke ich nicht nur für die geduldige Einführung in die Arbeitstechniken, sondern auch für die vielen Gespräche und die Freundschaft, die sich in den zwei Jahren Doktorandenzeit entwickelt hat.

Meinen großen und kleinen Freunden spreche ich Anerkennung und Dank aus für das Warten, wenn der Versuch doch etwas länger dauerte, für das Mitschreiben in Vorlesungen, die ich verpasste und für das Bemühen, mich aus dem Labor und vom Schreibtisch zu lösen.

Meinen Eltern danke ich, dass sie mir das Studium ermöglicht haben und stets hinter mir standen. Bei meiner Schwester bedanke ich mich für die konstruktive Kritik an meinen schriftlichen Ausführungen.

Lebenslauf

Name: Kristina Wortmeier

Geburtsdatum: 10.03.1980

Geburtsort: Bielefeld

Eltern: Harald Wortmeier, Wirtschaftsprüfer und Steuerberater
Christiane Wortmeier, geb. Zurgeissel

Geschwister: Catarina und Christoph Wortmeier

Juni 1999 Abitur an der Marienschule der Ursulinen, Bielefeld

seit 1999 Studium der Humanmedizin an der Universität zu Lübeck

September 2001 Ärztliche Vorprüfung (Physikum)

seit August 2002 Doktorandin am Institut für Immunologie und
Transfusionsmedizin der Universität zu Lübeck

September 2002 1. Staatsexamen

September 2004 2. Staatsexamen

Juni 2006 3. Staatsexamen