Aus der Klinik für Kinder- und Jugendmedizin
der Universität zu Lübeck

Direktor: Prof. Dr. med. E. Herting

Charakterisierung der individuellen Tacrolimus Sensitivität von humanen T-Lymphozyten im Vollblutstimulationstest

Inauguraldissertation
zur
Erlangung der Doktorwürde
der Universität zu Lübeck
- Aus der Medizinischen Fakultät zu Lübeck -

vorgelegt von
Nina Schumacher
aus Gießen

Lübeck 2011

---

1. **Berichterstatter: Priv.-Doz. Dr. med. Christoph Härtel**

2. **Berichterstatter: Priv.-Doz. Dr. med. Jens Habermann**

Tag der mündlichen Prüfung: 25.05.2012
zum Druck genehmigt. Lübeck, den 25.05.2012

-Promotionskomission der Sektion Medizin-

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung 1

1.1. Das Immunsystem 1
1.2. Die allogene Nierentransplantation 2
1.3. Die allogene Transplantatabstoßung 2
1.4. Die T-Lymphozyten – Aktivierung und Transplantatabstoßung 3
1.5. Zytokine und Transplantatabstoßung 6
1.6. Immunsuppressive Pharmakotherapie 8
1.6.1. Tacrolimus 10
1.7. Monitoring der immunsuppressiven Therapie mit Tacrolimus 11
1.8. Fragestellung 13

2. Materialien 15

2.1. Geräte 15
2.2. Laborbedarf 15
2.3. Reagenzien und Zellkulturmedien 16
2.4. Antikörper und Stimulanzien 16
2.5. Reagenzien für molekularbiologische Arbeiten 16
2.6. Testkits 17

3. Methoden und Patienten 18

3.1. Vollblutstimulationstest 18
3.2. Enzyme-linked-immunosorbent-assay (ELISA) 19
3.3. RNA-Isolierung 20
3.4. Reverse-Transkriptions-Polymerasekettenreaktion (RT-PCR) 22
3.4.1. Quantitative RT-RCR 23
3.4.2. Quantifizierung der Zytokin mRNA-Expression 24
3.5. Durchflusszytometrie 26
3.5.1. Analyse von Aktivierungsmarkern (CD25/CD69 Expression) auf der Oberfläche von T-Lymphozyten mittels Durchflusszytometrie 27
3.6. UV-induzierte Detektion (UVID) 28
3.7. Studiendesign 30
3.7.1. Probanden und Patienten 30
3.7.2. *In-vitro*-Studie mit gesunden Probanden 31
3.7.3. *In-vitro*- vs. *Ex-vivo*- Studie mit Patienten unter immunsuppressiver Therapie 32
3.8. Statistische Verfahren 33

4. Ergebnisse 34

4.1. *In-vitro*-Charakterisierung der individuellen Tacrolimus-Sensitivität.....34

4.1.1. Effekte von Tacrolimus auf die Zytokin mRNA Expression 34

4.1.2. Effekte von Tacrolimus auf weitere Parameter der T-Zell-Aktivierung.....37

4.1.3. Kinetik der Anti-CD3/Anti-CD28-mAb- induzierten Zytokin mRNA-Expression bei unterschiedlichen Tacrolimuskonzentrationen 40

4.1.4. Einfluss der Tacrolimuskonzentration auf die Zytokin Proteinsekretion.....44

4.1.5. Zytokin mRNA-Expressionskinetiken nach Anti-CD3 mAb Stimulation unter Zugabe unterschiedlicher Tacrolimuskonzentrationen 44

4.1.6. Einfluss von Tacrolimus und Cyclosporin A auf die IL-2 mRNA Expression im Vergleich.....47

4.2. *Ex-Vivo*- Studie 48

4.2.1. Effekte von Tacrolimus auf die IL-2 Expression bei Patienten unter Tacrolimusmonotherapie.....48

5. Diskussion 51

6. Zusammenfassung 63

7. Literaturverzeichnis 65

8. Danksagung 80

9. Lebenslauf 81

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Individuelle Wirkung von Tacrolimus auf die IL-2 mRNA Expression gesunder Probanden unter Anti-CD3/Anti-CD28 mAb Costimulation 35

Abbildung 2: Suppressiver Effekt von Tacrolimus auf die IL-4 mRNA Expression gesunder Probanden unter Anti-CD3/Anti-CD28 mAb Costimulation 36

Abbildung 3: Effekte von Tacrolimus auf weitere Parameter der T-Zell-Aktivierung 39

Abbildung 4: Einfluss von Tacrolimus auf Zytokin mRNA Expressionskinetiken unter Anti-CD3/Anti-CD28 Costimulation 41

Abbildung 5: Dosisabhängige Suppression der Zytokin mRNA-Expression unter Anti-CD3/Anti-CD28 Costimulation 42

Abbildung 6: Individuelle IL-2 mRNA Expressionskinetiken bei unterschiedlicher Tacrolimussensitivität 43

Abbildung 7: Dosisabhängige Effekte von Tacrolimus auf die IL-2 Proteinsekretion 44

Abbildung 8: Einfluss unterschiedlicher Tacrolimuskonzentrationen auf Zytokin mRNA Expressionskinetiken unter Anti-CD3 mAb Stimulation 46

Abbildung 9: Vergleich der IL-2 mRNA Expression gesunder Probanden unter Zugabe von Tacrolimus bzw. CsA 47

Abbildung 10: *Ex-vivo* Studie: Effekte von Tacrolimus auf die Anti-CD3/Anti-CD28 induzierten IL-2 Expressionskinetiken von Patienten unter Tacrolimus Monotherapie 49

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Reagenzien für den Vollblutansatz 19

Tabelle 2: Stimulanzien für den Vollblutansatz 19

Tabelle 3: RT-RCR-Ansatz 23

Tabelle 4: Sequenzen der Primer und Sonden für die quantitative RT-PCR 25

Tabelle 5: Antikörperkonzentration 27

Tabelle 6: Monoklonale Maus-Anti-Human-Antikörper 28

Tabelle 7: Patientendaten unter Tacrolimusmonotherapie 32

Tabelle 8: Zytokin mRNA Expression nach Stimulation mit Anti-CD3 und Anti-CD3/Anti-CD28 mAb 45

Abkürzungsverzeichnis

Anti	Antikörper gegen
APC	Antigen präsentierende Zelle (antigen presenting cell)
Aqua dest.	Aqua destillata
bp	Basenpaar
BrdUrd	5-Bromo-2-Deoxyuridine
CD	Cluster of differentiation
cDNA	Komplementäre Desoxyribonukleinsäure
C_t	Schwellenzyklus der Amplifikation (treshold cycle)
CsA	Cyclosporin A
dATP	2'-Desoxy-Adenosin-5'-Triphosphat
dCTP	2'-Desoxy-Cytidin-5'-Triphosphat
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dUTP	2'-Desoxy-Uracil-5'-Triphosphat
EDTA	Ethylendiamin-Tetraacetat
ELISA	enzyme-linked immunosorbent assay
FK-BP	FK506 bindendes Protein
g	Gravitationsbeschleunigung
h	Stunden
HLA	Human leukocyte antigen
IFN	Interferon
IL	Interleukin
IMDM	Kulturmedium (Isocove's Modified Dulbecco'sMedium)
kb	Kilobase
mAB	Monoklonale Antikörper
MHC	Major histocompatibility complex
min	Minuten
ml	Milliliter
mRNA	messenger-Ribonukleinsäure
MuLV	murine leukemia virus
n	Anzahl der Experimente
NF-AT	nukleärer Faktor aktivierter T-Zellen
NK-Zellen	natürliche Killerzellen
OD	optische Dichte
PBMC	peripheral blood mononuclear cells (mononukleäre Zellen des peripheren Blutes)
PCR	Polymerasekettenreaktion (polymerase chain reaction)
RNA	Ribonukleinsäure
RNAse	Ribonuklease
RT	reverse Transkription

RT-PCR	reverse-Transkriptions-Polymerasekettenreaktion
SD	Standardabweichung des Mittelwerts
Sec	Sekunden
TAMRA	6-Carboxy-Tetramethylrhodamin
TaqMan PCR	Echtzeit Polymerasekettenreaktion
TCR	T-Zell-Rezeptor
T_H	T-Helferzelle
Treg	regulatorische T-Zellen
TNF	Tumor Nekrosis Factor
UVID	ultraviolet induced detection

1. Einleitung

1.1. Das Immunsystem

Die natürliche Aufgabe des Immunsystems besteht darin, den menschlichen Körper in seiner Integrität zu bewahren. Um diese Aufgabe zu erfüllen, müssen körperfremde Substanzen zunächst erkannt und anschließend durch Abwehrmechanismen beseitigt werden. Das menschliche Immunsystem kann in das unspezifische sowie spezifische Abwehrsystem unterteilt werden. Beide lassen sich jeweils in eine humorale und eine zelluläre Komponente untergliedern. Die unspezifische, angeborene Immunität dient der ersten Abwehr. Sie wird von Monozyten, Makrophagen und neutrophilen Granulozyten vermittelt. Diese sind in der Lage, eine Vielzahl löslicher Substanzen zu produzieren, wodurch unter anderem weitere Zellen aktiviert werden. Zu den Merkmalen der spezifischen, erworbenen Immunabwehr gehört die Fähigkeit zur spezifischen Antwort auf körperfremdes Material und wirksamere Reaktion bei erneutem Kontakt mit dem Pathogen (immunologisches Gedächtnis). Diese spezifische Immunität basiert auf einer klonalen Selektion von Lymphozyten, die in B- und T-Lymphozyten (B- und T-Zellen) unterteilt werden. Sie besitzen eine Vielzahl spezifischer Rezeptoren, die es dem Immunsystem ermöglichen, immunogene Fremdsubstanzen (Antigene) zu erkennen. Die Bindung eines Antigens an diese Rezeptoren führt zur Proliferation und Differenzierung der Lymphozyten.

B-Zellen differenzieren nach einer Aktivierung in Plasmazellen und sezernieren Immunglobuline als Antikörper (humorale Komponente). T-Zellen werden aufgrund unterschiedlicher Funktionen in T-Zell-Subpopulationen unterteilt, die sich u. a. durch die Expression verschiedener Oberflächenmoleküle auszeichnen. Dabei sind die akzessorischen Moleküle CD4 und CD8 von großer Bedeutung. Zu den CD8-positiven ($CD8^+$) Zellen gehören die zytotoxischen T-Zellen, die an der Eliminierung von virusinfizierten Zellen oder Tumorzellen beteiligt sind, sowie die T-Suppressorzellen, die regulierend auf die Immunantwort wirken und diese unterdrücken können. Zu den CD4-positiven ($CD4^+$) Zellen gehören die sogenannten T-Helferzellen (T_H-Zellen), die darauf spezialisiert sind, mit anderen Zellen in Verbindung zu treten und dadurch die Immunantwort zu regulieren. Ihre Wirkung können T-Zellen über direkte Zell-Zell-Kontakte oder über die Freisetzung löslicher Mediatoren, sogenannter Zytokine, entfalten. Da T-Lymphozyten eine

entscheidende Bedeutung für die humorale und zellvermittelte Immunantwort haben und eine wichtige Rolle als Vermittler der Immunantwort gegen Gewebetransplantate spielen, sollen sie deshalb im Mittelpunkt weiterer Betrachtungen stehen.

1.2. Die allogene Nierentransplantation

Die allogene Transplantation ist die häufigste Transplantationsart, hier gehören Spender und Empfänger zur selben Spezies, sind jedoch immungenetisch verschieden.

Die allogene Nierentransplantation stellt heute ein Standardverfahren bei chronischem Nierenversagen dar. Die Lebendnierenspende gewinnt neben der postmortalen Organspende zunehmend an Bedeutung. Im Jahre 2009 wurden in Deutschland 600 Nieren nach Lebendspende transplantiert, dies entspricht 21,6 % aller Nierentransplantationen. Die Anzahl der Spenderorgane nach postmortaler Organspende lag bei 2144. Die 5-Jahres-Transplantatfunktionsrate nach postmortaler Organspende lag laut CTS-Studie (Deutschland 1999-2008) bei ca. 70%, die nach Transplantation von Organen lebender Spender bei 84% (DSO, Jahresbericht 2009). Diese Zahlen machen deutlich, welch wichtige Rolle eine Verbesserung des Transplantatüberlebens spielt.

Der Erfolg einer Transplantation hängt von der Kompatibilität von Spender und Empfänger ab. Das Immunsystem des Empfängers erkennt das transplantierte Organ als fremd. Um eine Abstoßungsreaktion zu verhindern, ist eine lebenslange immunsuppressive Therapie notwendig. Die Notwendigkeit, das Transplantatüberleben zu optimieren, zeigt, welch wichtige Bedeutung Strategien zur Verbesserung des Transplantatüberlebens in Zukunft haben könnten. Zu diesen Strategien könnte die Untersuchung einer individuellen pharmakodynamischen Wirksamkeit von Immunsuppressiva gehören.

1.3. Die allogene Transplantatabstoßung

Die Gewebetransplantation zum Ersatz erkrankter Organe ist heute eine wichtige Behandlungsmethode, wobei adaptive Immunreaktionen gegen das transplantierte Gewebe ein großes Hindernis für eine erfolgreiche Übertragung darstellen. Solange Empfänger und Spender nicht genetisch identisch sind, erwächst für ein Spenderorgan eine umso größere Abstoßungsgefahr, je mehr körperfremde

Moleküle auf den Zellen exprimiert werden. Diese Immunreaktion richtet sich gegen fremde, genetisch determinierte, polymorphe Moleküle auf Zellen des Transplantats. Diese Moleküle werden von einer Gruppe von Genen, die als Hauptkompatibilitätskomplex (major histocompatibility complex, MHC) bezeichnet werden, codiert. Man kennt heute zwei Klassen von MHC-Molekülen (MHC-Klasse-I und MHC-Klasse-II), die auf der Zelloberfläche exprimiert werden. MHC-Klasse-I Moleküle finden sich auf praktisch allen Körperzellen, MHC-Klasse-II Moleküle dagegen nur auf B-Zellen, phagozytierenden Zellen, Epithel- und Endothelzellen. Beim Menschen bezeichnet man die Moleküle des MHC auch als HLA-Komplex (human leucocyte antigen). Alle MHC-Moleküle werden von polymorphen Genabschnitten kodiert, die in alternativer Form (Allele) existieren.
Für die Spender / Empfänger-Auswahl spielen die Hauptblutgruppen (AB0-System) und das HLA-System die wichtigste Rolle [Opelz und Döhler, 2007]. Im AB0-System wird eine volle Kompatibilität gefordert, im HLA-System ist lediglich eine Identität der starken antigenen Determinanten notwendig. Bei der Nierentransplantation werden die Merkmale HLA-A und HLA-B (Klasse I Moleküle) und HLA-DRB1 (Klasse II Molekül) berücksichtigt. An jedem dieser Genorte konnten bereits eine Vielzahl unterschiedlicher Allele nachgewiesen werden [Schreuder et al., 2005]. Unterscheiden sich Spender und Empfänger in ihren HLA-Molekülen, lösen die fremden HLA-Moleküle eine Immunreaktion aus. Aufgrund der Komplexität der menschlichen MHCs ist es kaum möglich, HLA-identische Spender zu finden. Alle Transplantatempfänger sind somit auf immunsuppressive Medikamente angewiesen, um eine Abstoßung zu verhindern. Eine Ausnahme bilden genetisch identische, eineiige Zwillinge.

1.4. Die T-Lymphozyten – Aktivierung und Transplantatabstoßung

Anhand zeitlicher Verläufe, der Morphologie und der involvierten immunologischen Mechanismen werden die Abstoßungsreaktionen als hyperakute, akute und chronische Abstoßungsreaktionen klassifiziert. Die hyperakute Transplantat-abstoßung tritt innerhalb von Minuten bis Stunden im Anschluß an die Transplantation auf. Sie beruht auf präformierten Antikörpern gegen HLA- und Isoagglutininen bei inkompatiblen Hauptblutgruppen.
Die akute Abstoßung tritt nach Tagen bis Monaten nach Transplantation auf, sie kann aber auch noch nach Jahren, z.B. nach Absetzen einer medikamentösen

Immunsuppression, auftreten. Histopathologisch ist sie durch ein lymphozytäres und mononukleäres Infiltrat gekennzeichnet. Die akute Abstoßungsreaktion kann zelluläre aber auch humorale Effektormechanismen umfassen. Die zelluläre Abstoßung wird durch T-Zellen vermittelt, wobei $CD4^+$-als auch $CD8^+$-Zellen eine wichtige Rolle spielen. Die humorale Antwort basiert auf einer Neubildung von Antikörpern.

Die chronische Abstoßungsreaktion verläuft teilweise über Monate bis Jahre, oft auf der Basis einer ständigen, schleichenden Entzündung. Die Immunpathogenese ist bisher nicht eindeutig geklärt. Diskutiert werden zelluläre und humorale Reaktionen sowie nicht-immunologische Pathomechanismen. Histopathologisch werden u. a. mononukleäre Zellinfiltrate, Plasmazellen und eosinophile Granulozyten beobachtet [Colvin, 1996].

In mehreren Studien konnte gezeigt werden, dass Episoden akuter Abstoßungereaktionen einen deutlichen Risikofaktor für die chronische Transplantatabstoßung darstellen [Wu et al., 2009]. Die akute Transplantatabstoßung ist ein T-Zell-abhängiger Prozess, bei dem zytotoxische T-Zellen und T_H1-Zellen eine zentrale Rolle spielen. Um an einer Immunantwort teilzunehmen, müssen naive (ungeprägte) T-Zellen durch antigenpräsentierende Zellen (APC) aktiviert werden, um anschließend zu proliferieren bzw. zu T-Effektorzellen zu differenzieren.

Die Aktivierung naiver T-Zellen erfordert die Erkennung eines fremden, antigenen Peptidfragments in Assoziation mit MHC-Molekülen, über den in die Zellmembran verankerten T-Zell-Rezeptor (TCR). Für die Antigenerkennung und die Auslösung einer T-Zell-Antwort werden neben dem TCR-vermittelten Antigenkontakt gleichzeitig weitere, mit dem TCR assoziierte Moleküle benötigt. Die CD4 und CD8 Corezeptoren kooperieren während der Antigenerkennung mit Komponenten des TCR und sind für die Bindung mit MHC-Klasse-I und MHC-Klasse-II Antigenen notwendig. Sie gewährleisten, dass $CD4^+$ Zellen nur an konstante Teile MHC-II-tragender-Zellen, $CD8^+$ Zellen nur an konstante Teile MHC-I-tragender Zellen binden. Die intrazellulären Signaltransduktionswege werden durch die Interaktion von spezifischen Antigenen mit dem TCR-assoziierten CD3-Komplex in Gang gesetzt.

Zur Aktivierung einer naiven T-Zelle ist neben der Bindung des MHC durch den CD3/TCR-Komplex und dem Costimulator ein zweites, costimulierendes Signal

notwendig, das von derselben APC, auf der die T-Zelle ihr spezifisches Antigen erkennt, geliefert werden muß. Zu diesen costimulierenden Molekülen werden die APC-Glykoproteine B7.1 und B7.2 gezählt. Der Rezeptor für B7 auf der T-Zelle ist das Molekül CD28, das von ca. 80% der T-Zellen im peripheren Blut exprimiert wird [Thompson et al., 1989, Acuto und Michel, 2003].

Damit die aktivierten T-Zellen proliferieren und spezielle Funktionen übernehmen können, müssen sie sich in „bewaffnete“ T-Effektorzellen umwandeln. Dabei spielt das Zytokin IL-2 eine entscheidende Rolle. Die Kombination von Antigen und Costimulator veranlasst die naive T-Zelle zur Expression und Sekretion von IL-2, das die klonale Expansion sowie die Differenzierung zu T-Effektorzellen induziert [Robey und Allison, 1995]. Gleichzeitig wird die α-Kette des IL-2-Rezeptors (CD25) auf der Oberfläche aktivierter T-Zellen exprimiert. IL-2 bindet an diesen nun hochaffinen Rezeptor und unterstützt so die T-Zell-Proliferation im Sinne einer positiven, autokrinen Rückkopplung.

Das costimulierende Signal, das durch die Bindung von B7 an CD28 vermittelt wird, bewirkt ein Steigerung der IL-2 Transkription um das dreifache, eine weitere Auswirkung dieser Bindung ist eine deutliche Erhöhung der IL-2 Synthese durch die Stabilisierung der IL-2 mRNA [June et al., 1989, Lindstein et al., 1989, Fraser et al., 1991, Robey und Allison, 1995]. *In vitro* gelingt es durch Zusatz von Anti-CD3 mAb und Anti-CD28 mAb in der T-Zelle eine ähnliche Antwort hervorzurufen, wie nach spezifischem Antigen-Kontakt. Diese spezifische T-Zell-Aktivierung kann man sich durch den Einsatz von Anti-CD3/Anti-CD28 mAb experimentell nutzbar machen.

T-Effektorzellen können eine Vielzahl von Funktionen ausüben. Die Auswahl, welcher Effektormechanismus gegen das spezifische Antigen aktiviert werden soll, erfolgt durch T-Helferzellen. Zu diesen Effektormechanismen gehört die Bildung zytotoxischer T-Zellen (zellvermittelte Immunantwort), die Antikörperproduktion (humorale Immunantwort), sowie die zusätzliche Aktivierung eosinophiler Granulozyten und Mastzellen und die Aktivierung von Makrophagen (zell-vermittelte Immunantwort). Die Entscheidung, was aus einer naiven T-Zelle wird und welche Effektorfunktionen vorherrschen, fällt bereits in den Anfangsstadien der Immunantwort und ist mit der Freisetzung verschiedener Zytokine durch die T_H-Zelle assoziiert. Bisher bekannte Subpopulationen der CD4-T-Effektorzellen sind die T_H1-, T_H2-, T_H17-Zellen und die regulatorischen T-Zellen.

T_H1-und T_H2-Zellen unterscheiden sich in ihrer Zytokinproduktion [Street und Mosmann, 1991, Nakamura et al., 1997], sie hemmen sich gegenseitig, so dass, ist die Weiche einmal gestellt, nur einer der beiden Zelltypen vorherrscht. T_H1-Lymphozyten bilden hauptsächlich IL-2 und IFN-γ und aktivieren Makrophagen zur Immunantwort. T_H2- Zellen bilden u. a. IL-4, IL-5 und IL-10 und unterstützen die Reifung von B-Zellen und die Förderung der Produktion von Mastzellen und eosinophilen Granulozyten.

T_H17-Zellen produzieren IL-17 und den Rezeptor für IL-23. Sie sind für die Mobilisierung von neutrophilen Zellen von Bedeutung [Weaver et al., 2006].

Regulatorische CD4-T-Zellen (Treg) sind eine heterogene Gruppe von Zellen, sie begrenzen die Immunantwort, indem sie inhibitorische Zytokine wie IL-10 und TGF-β produzieren [Roncarolo et al., 2001].

Zytotoxische T-Zellen erkennen mit ihrem CD-8 assoziierten TCR das MHC-I gebundene spezifische Antigen auf Zielzellen. Nach Interaktion mit den Antigen-präsentierenden Zielzellen, sind sie in der Lage Perforine freizusetzen, um die Zielzellen anschließend durch lysierende Enzyme abzutöten [Barry und Bleackley, 2002].

1.5. Zytokine und Transplantatabstoßung

Zytokine sind Proteine, die von einer Vielzahl von Zellen de-novo synthetisiert werden können. Sie sind Mediatoren, die die Aktivierung und Differenzierung von Zellen des Immunsystems steuern und die Effektorfunktionen dieser Zellen koordinieren. Zytokine binden an Rezeptoren auf Zielzellen und können lokal oder über eine Entfernung agieren. Die zahlreichen Interaktionen von unterschiedlichen Zytokinen erzeugen über ein so genanntes Zytokinnetzwerk [Balkwill und Burke, 1989] vielfältige Wirkungen. Nachfolgend sollen einige Zytokine vorgestellt werden.

IL-2 wird von T_H1-Zellen gebildet. Es stimuliert autokrin und parakrin das T-Zell-Wachstum und die T-Zell-Differenzierung [Depper et al., 1985] und induziert die Freisetzung weiterer Zytokine wie z.B. IFN-γ. Zusätzlich ist IL-2 in der Lage, zytotoxische T-Zellen zu stimulieren, Makrophagen zu aktivieren und es ist an der Proliferation und Antikörperbildung von B-Zellen beteiligt.

IFN-γ wird ebenfalls von TH1-Zellen und zusätzlich von zytotoxischen T-Zellen gebildet [Martin-Fontecha et al., 2004]. IFN-γ ist zusammen mit IL-2 an der

Differenzierung naiver T-Zellen zu zytotoxischen T-Zellen beteiligt, gehört zu den wichtigsten makrophagenaktivierenden Zytokinen, fördert die Differenzierung von B-Zellen und wirkt antiviral.

IL-4 wird von aktivierten T-Zellen (T_H2-Zytokin) gebildet. Es fördert die Aktivierung und die Proliferation von T-Zellen sowie die Aktivierung von neutrophilen Granulozyten, Makrophagen und Mastzellen [Webb et al., 2007]. Eine wichtige Funktion ist die Induktion der MHC-Klasse-II Expression auf B-Zellen, die Aktivierung von B-Zellen und die Erhöhung der Antikörperproduktion.

IL-10 wird von T_H2-Lymphozyten sowie Monozyten gebildet und wird ebenfalls zu den T_H2-Zytokinen gezählt. Es hat sowohl hemmende als auch stimulierende Effekte auf verschiedene Zellen des Immunsystems [Moore et al., 2001]. IL-10 ist in der Lage, die Zytokinproduktion von T_H1-Zellen [Mosmann und Moore, 1991, O'Garra und Vieira, 2007], sowie Makrophagen und NK-Zellen zu hemmen. Es vermindert die Expression von MHC-Molekülen auf der Oberfläche von APC sowie die Expression costimulatorischer Signale [De Waal Malefyt et al., 1991]. Darüber hinaus kann IL-10 die B-Zell- und Mastzell-Proliferation stimulieren [Moore et al., 1993].

TNF-α wird von T_H1-, einigen T_H2-, zytotoxischen T-Zellen und aktivierten Makrophagen gebildet. Es induziert eine vermehrte Expression von MHC-Molekülen auf APC. TNF-α stimuliert Makrophagen, Monozyten und Granulozyten, sowie die Proliferation von T-Zellen.

Die Transplantatabstoßung ist ein komplexes Geschehen, bei dem der Einfluß der Zytokine auf die Immunantwort eine wichtige Rolle spielt. Einzelne Zytokine wie z.B. IL-2, könnten sogar eine Schlüsselfunktion bei der Induktion von Transplantatabstoßung bzw. Transplantattoleranz haben [Nickerson et al., 1994, Malek und Bayer, 2004].

Die akute Transplantatabstoßung ist u.a. mit einer erhöhten Expression der T_H1-Zytokine IL-2 und IFN-γ assoziiert [Dallmann und Clark, 1991]. IL-2 stimuliert autokrin die T-Helferzellen und parakrin zytotoxische T-Zellen. Durch IFN-γ und den gleichzeitigen Einfluß von TNF-α können sich Makrophagen im Transplantat ansammeln, zytotoxische T-Zellen stimuliert und die Expression von MHC-Molekülen auf den Transplantatzellen erhöht werden. Die Abstoßungsreaktion wird somit durch zytotoxische T-Zellen sowie T_H1-Zellen vermittelt. Versuche mit IL-2 Knockout- Mäusen, deren IL-2 Gen funktionell zerstört worden war, lassen

jedoch vermuten, dass mehrere T-Zell-Aktivatoren für den Abstoßungsprozeß mitverantwortlich zu machen sind. Bei IL-2 Knockout-Mäusen kam es, obwohl diese kein IL-2 bilden können, zu Transplantatabstoßungen [Schorle et al., 1991]. Die Mäuse konnten zwar kein IL-2, wohl aber IL-4 bilden, was die Frage nach der Rolle dieses Zytokins im Rahmen der Transplantatabstoßung aufwirft. Es wurde zwar gezeigt, dass während der Toleranzinduktion T_H2-Zytokine gebildet und T_H1-Zytokine unterdrückt werden, ob T_H2-Zytokine die Toleranz und T_H1-Zytokine die Abstoßung eines Transplantats vermitteln ist jedoch unklar und scheint den komplexen Vorgang der Immunreaktion nur unvollständig zu erklären [Famulski et al., 2008, Karczewski et al., 2009]. Aufgrund der bisherigen Studienergebnisse, die die These unterstützen, dass Zytokine einen wichtigen Einfluß auf das Transplantatüberleben haben könnten, stellt sich die Frage welche Bedeutung die Bestimmung der Zytokin-Expression für die Erfolgskontrolle einer allogenen Organtransplantation sowie der damit verbundenen immunsuppressiven Therapie haben könnte.

1.6. Immunsuppressive Pharmakotherapie

Um Abstoßungsreaktionen zu verhindern, muß bei allen Allotransplantationen eine lebenslange immunsuppressive Therapie durchgeführt werden, die am Tag der Transplantation beginnt. Man unterscheidet die Basisimmunsuppression, die in der Regel aus einer Dreifachtherapie besteht, von der Behandlung der akuten Abstoßungsreaktion. Eine Kombination mehrerer Immunsuppressiva soll die Unterdrückung der Alloimmunreaktion optimieren und Nebenwirkungen, wie z. B. das größere Infektionsrisiko und die erhöhte Tumorinzidenz, minimieren [Ekberg, 2008].

Die Kombination aus Azathioprin bzw. Mycophenolat Mofetil, Glukokortikoiden und den Calcineurin-Inhibitoren Cyclosporin A (CsA) oder Tacrolimus ist die am häufigsten eingesetzte Basistherapie. Meist erfolgt schon innerhalb des ersten Jahres eine Reduktion auf eine CsA oder Tacrolimus Monotherapie. Die immunsuppressive Therapie akuter Abstoßungsreaktionen erfordert meist eine zusätzliche Hochdosisbehandlung mit Glukokortikoiden. Als weitere Medikamente stehen hierfür u.a. der monoklonale Lymphozytenantikörper (OKT3) sowie der Wechsel von dem Calcineurin-Inhibitor CsA zu dem Calcineurin-Inhibitor Tacrolimus zur Verfügung.

Nachfolgend sollen die wichtigsten Immunsuppressiva vorgestellt werden.

Glukokortikoide gehören heute zu den am häufigsten verwendeten Immunsuppressiva. Die immunsuppressive Wirkung der Steroidtherapie ist sehr komplex. Sie beruht u. a. auf einer verminderten Bildung und Wirkung von Zytokinen in Makrophagen (u. a. IL-1) und T-Lymphozyten [Rhen und Cidlowski, 2005] und einer verminderten Expression des IL-2 Rezeptors [Paliogianni et al., 1993]; dadurch wird die Antigen-Erkennung der Makrophagen sowie die Aktivierung von T-Lymphozyten gehemmt. Aufgrund der vielfältigen Nebenwirkungen einer Steroidtherapie sollte die Dosis und somit die toxischen Effekte auf ein Minimum reduziert werden.

Mycophenolat Mofetil hemmt die Inosinmonophosphatdehydrogenase, auf die vor allem B- und T-Lymphozyten bei der de-novo Synthese von Purinen angewiesen sind [Allison und Eugui, 2005]. Leukozytopenien und ein erhöhtes Risiko für lymphoproliferative Erkrankungen gehören hier zu den Nebenwirkungen.

Azathioprin gehört zu der Gruppe der Purinantagonisten. Es wird im Körper zur aktiven Verbindung 6-Mercaptopurin metabolisiert und zu Thioinosinmonophosphat phosphoryliert. Es hemmt in dieser Form zahlreiche Syntheseschritte für Purinnukleotide, DNA und RNA und führt dadurch zu einer Hemmung der T-Zell Proliferation. Zu den Nebenwirkungen gehören u. a. eine Knochenmarkdepression und eine erhöhte Inzidenz von Malignomen bei Langzeitmedikation [O'Donovan et al., 2005].

Cyclosporin A (CsA) ist ein Calcineurin-Inhibitor und spielt seit den 80-iger Jahren eine bedeutende Rolle in der Prophylaxe von Abstoßungsreaktionen. Es hemmt im Gegensatz zu Glukokortikoiden oder zytotoxischen Substanzen selektiv die Expression mehrer Zytokingene und blockiert dadurch die Proliferation der T-Zellen. CsA bindet an das intrazelluläre Immunophilin Cyclophilin. Es bindet als Komplex an Calcineurin und hemmt dessen Aktivität. Nachfolgend wird über mehrere Zwischenschritte die intrazelluläre Signalübertragung im Zellkern blockiert [Wiederrecht et al., 1993]. Nephrotoxische und neurotoxische Effekte sowie ein erhöhtes Malignomrisiko sind gefürchtete Nebenwirkungen einer CsA-Therapie.

Ein weiteres Medikament, das die Signalübermittlung in den T-Lymphozyten inhibiert, ist das Makrolid Rapamycin [Lee und Chapman, 2005].

1.6.1. Tacrolimus

Der Calcineurin-Inhibitor Tacrolimus wurde 1984 von der Firma Fujisawa aus Streptomyces tsukubaensis isoliert [Tanaka et al., 1987] und wird heute hauptsächlich zur Immunsuppression bei Nieren- und Lebertransplantation eingesetzt [Spencer et al., 1997, Bowmann und Brennan, 2008].

Topisch applizierbar kann Tacrolimus u.a. in der Behandlung des atopischen Ekzems [Ashcroft et al., 2005] eingesetzt werden, jedoch macht man sich den immunsuppressiven, antiinflammatorischen und antipruritischen Effekt [Pereira et al., 2010] auch bei einer Vielzahl weiterer Dermatosen zu Nutze.

Es dient als Basisimmunsuppressivum zur Prophylaxe von Abstoßungsreaktionen [Shapiro et al., 1995], wird bei Steroid- und Antikörper-Therapie resistenten Abstoßungsreaktionen [Jordan et al., 1997] und als Alternativmedikation bei Nichtansprechen [Flynn et al., 2001] oder bei Eintreten toxischer Komplikationen einer CsA-Therapie eingesetzt [Pratschke et al., 1997]. Tacrolimus scheint gegenüber CsA effektiver in der Prävention akuter Abstoßungsreaktionen zu sein [Margreiter et al., 2002, Webster et al., 2005].

Trotz der strukturellen Unterschiede zwischen Tacrolimus und CsA gehören beide zu den Calcineurin-Inhibitoren, sie hemmen die Transkription verschiedener Zytokingene (u. a. IL-2). Tacrolimus zeigt *in vitro* gegenüber CsA eine 10-100-fach stärkere immunsuppressive Wirkung [Andersson et al., 1992, Ho S. et al., 1996, Armstrong und Oellerich, 2001]. Auch scheinen sich beide hinsichtlich der Effekte auf die Expression der von T_H-2 Zellen gebildeten Zytokine zu unterscheiden [Weimer et al., 2000].

Um den Wirkmechanismus von Tacrolimus zu verstehen, muss man den Mechanismus der Signalübertragung in T-Zellen genauer betrachten. Die Bindung eines Antigens an den T-Zell-Rezeptor löst eine Reihe biochemischer Veränderungen aus. Es werden u. a. verschiedene cytoplasmatische Tyrosinkinasen aktiviert, die in einer Erhöhung der intrazellulären Ca^{2+}- Konzentration resultieren. Die erhöhte Ca^{2+}- Konzentration im Cytosol aktiviert die cytoplasmatische Proteinphosphatase Calcineurin, die von einem im Zytoplasma vorkommenden T-Zell spezifischen Faktor, NF-AT, eine Phosphatgruppe entfernt. In dieser Form kann NF-ATc nun in den Zellkern eindringen und an ein Protein aus der Familie der Transkriptionsfaktoren, nämlich AP1, binden. Dadurch entsteht der aktive NF-AT-Transkriptionsfaktor, der an die Promotorregion des IL-2

Gens bindet und die Transkription von IL-2 und weiterer, für die T-Zell-Antwort notwendiger Gene, induziert [Crabtree und Clipstone, 1994, Macian, 2005]. AP1 ist in vielen Zellen vorhanden, das cytoplasmatische Protein NF-AT kommt nur in T-Zellen vor. Die Blockade des Signalwegs, der zu NF-AT führt, ist deshalb ein spezifisches Mittel, um die T-Zell-Reaktion zu hemmen.

Tacrolimus greift in den beschriebenen Signalübertragungsweg ein. Es bindet an ein Immunophilin, das so genannte FK bindende Protein (FKBP), eine Peptidyl-Prolyl-cis-trans-Isomerase. Der Komplex aus Immunophilin und Medikament bindet an Calcineurin, hemmt dessen Aktivität und blockiert dessen Fähigkeit zur Aktivierung von NF-ATc. Dadurch wird die Translokation von NF-ATc vom Cytoplasma in den Zellkern verhindert [Flanagan et al., 1991]. Auf diesem Wege hemmt Tacrolimus die Transkription verschiedener Zytokingene, u. a. die Expression von IL-2, IL-4, IL-10, TNF-α und INF-γ [Wang et al., 1993] und somit die T-Zell-Aktivierung [Liu et al., 1991, O'Keefe et al., 1992, Rao, 1994]. Bevorzugt werden Zytokine der frühen Immunantwort [Tocci et al., 1989], sowie die von T_H-1 Lymphozyten gebildeten Zytokine [Thomson et al., 1995] gehemmt. Tacrolimus beeinflusst ebenfalls die humorale Immunantwort, wenn auch zu einem geringeren Maße als die zellvermittelte Immunantwort. Auch wird die T-Zell-vermittelte B-Zell-Aktivierung und Proliferation gehemmt.

Zu den Nebenwirkungen von Tacrolimus gehören seine neuro- sowie nephrotoxische Wirkung. Erhöhte Tacrolimus Blutspiegel gehen mit erhöhter Toxizität, erniedrigte Spiegel mit vermehrten Abstoßungsreaktionen einher. Da Abstoßungsreaktionen jedoch trotz im therapeutischen Bereich liegender Blutspiegel und Nebenwirkungen trotz niedriger Blutspiegel auftreten können [Kershner und Fitzsimmons, 1996], wäre eine individuelle und somit optimale Dosierung von Tacrolimus wünschenswert.

1.7. Monitoring der immunsuppressiven Therapie mit Tacrolimus

Tacrolimus wird in der Transplantationschirurgie nach Richtlinien dosiert, die das Körpergewicht des Patienten als Grundlage nehmen. In der klinischen Praxis wird zur Überwachung der Therapie die Bestimmung der Medikamentenkonzentration im peripheren Blut herangezogen. Da Tacrolimus an Erythrozyten bindet, wird die therapeutische Konzentration im Vollblut bestimmt. Im Blutplasma ist die Konzentration niedriger als die im Vollblut, hier ist ein Großteil des Medikamentes

an Plasmaproteine gebunden [Venkataramanan et al., 1995]. Die Steuerung der Therapie anhand von Blutspiegeln berücksichtigt die Pharmakokinetik. Auch wenn diese Informationen über Absorption, Verteilung und Metabolismus und in einigen Fällen Hinweise auf eine mögliche Korrelation zu (Neben-) Wirkungen liefern kann, so kann sie jedoch die Effekte auf die physiologisch relevanten Zellen der Immunantwort (Pharmakodynamik) nicht quantifizieren. Die gleiche Medikamentenkonzentration kann bei verschiedenen Patienten zu einem unterschiedlichen biologischen und klinischen Verlauf führen. Die meisten Patienten sind unter der empfohlenen Tacrolimus-Talspiegelkonzentrationen bei nierentransplantierten Patienten von 5-15 µg/l ausreichend immunsupprimiert, die Konzentration von Tacrolimus im Blut kann jedoch interindividuell unterschiedliches Ansprechen auf Tacrolimus nicht erfassen. Die Untersuchung der pharmakodynamischen Wirksamkeit der immunsuppressiven Therapie könnte deshalb von großer Bedeutung sein, um eventuell eine individuell ausgerichtete immunsuppressive Therapie einzurichten [Yatscoff et al., 1998, Barten et al., 2006].

Tacrolimus hemmt die Expression von Zytokin mRNA Expression und somit die T-Zell-Aktivierung und Proliferation. Da Zytokine eine zentrale Rolle bei der Transplantatabstoßung spielen, könnte der quantitative Nachweis von Zytokinen ein möglicher Parameter für die pharmakodynamische Wirksamkeit von Tacrolimus sein.

Untersuchungen der IL-2 Sekretion von T-Zellen nach mitogener Stimulation zeigten sowohl eine Reduktion unter Tacrolimus Therapie, als auch Assoziationen mit Abstoßungsreaktionen [Sindhi et al., 2003]. Ferner wurde in durchflusszytometrischen Studien beobachtet, dass der prozentuale Anteil IL-2 produzierender T-Lymphozyten unter Tacrolimus abnimmt [Batten et al., 1999, Rostaing et al., 1999]. In einer weiteren Studie wurde mittels semiquantitativer Polymerasekettenreaktion (PCR) die Expression von IL-2 mRNA in isolierten peripheren Lymphozyten gemessen. Nach Zugabe des Calcineurininhibitors CsA zu *in vitro* Kulturen fanden sich Hinweise auf eine mögliche individuelle Wirksamkeit [Zucker et al., 1996].

In den meisten Studien werden Mitogene zur Bestimmung der T-Zell-Aktivierung verwendet. Allerdings führen diese zu einer unspezifischen Stimulation von T-Lymphozyten, im Gegensatz dazu stellt die Stimulation mit monoklonalen Anti-

CD3/Anti-CD28 Antikörpern eine adäquatere T-Zell-Aktivierung dar. Ferner wurden T-Zellen bisher v. a. nach Dichtegradientenisolierung in PBMC Kulturen analysiert. Um jedoch eine unspezifische Aktivierung, wie sie bei Dichtegradientenuntersuchungen vorkommt, vermeiden zu können, bietet sich die Untersuchung in Vollblutkulturen an [Härtel et al., 2001]. Dies hat ferner den Vorteil, dass sämtliche zellulären und löslichen Bestandteile im Blut enthalten bleiben, die für die T-Zell-Aktivierung notwendig sind [Kirchner et al., 1982, Härtel et al., 1999].

Die Analyse von Zytokinen auf Proteinebene mittels ELISA benötigt Inkubationszeiten bis zu 48 Stunden. Die Quantifizierung von Zytokin mRNA erlaubt dagegen Messungen innerhalb von wenigen Stunden. Dies wäre für einen späteren klinischen Einsatz eine wichtige Vorraussetzung. Die TaqMan-PCR ermöglicht ferner nicht nur einen präziseren, sonder auch sensitiveren und spezifischeren Nachweis im Vergleich zu semiquantitativen PCR Verfahren [Heid et al., 1996, Gibbs et al., 2003].

1.8. Fragestellung

Tacrolimus ist ein meist in der Leber- und Nierentransplantation verwendetes Immunsuppressivum. Es gehört zu den Calcineurin-Inhibitoren und beeinflusst den Signaltransduktionsweg verschiedener Zytokingene, in erster Linie IL-2, und inhibiert dadurch die Aktivierung von T-Zellen. Für Patienten nach Organtransplantation stellen Über- und Unterdosierungen der immunsuppressiven Pharmakotherapie erhebliche Risiken hinsichtlich Nebenwirkungen oder Transplantatabstoßungen dar. Eine individuelle Steuerung der Immunsuppression ist derzeit nicht möglich. Die Dosierung von Tacrolimus nach Transplantation erfolgt initial anhand des Körpergewichtes. Zur Steuerung der Therapie wird im weiteren Verlauf die Medikamentenkonzentration im peripheren Blut herangezogen. Trotz Einstellung der Medikamentenkonzentration in den so genannten „therapeutischen Bereich“, werden allogene Transplantatabstoßungen beobachtet. Dies wirft die Frage nach einer individuell unterschiedlichen pharmakodynamischen Wirksamkeit auf.

Ziele der folgenden Studie sind:

(1) die pharmakodynamische Wirksamkeit von Tacrolimus unter möglichst *in vivo* nahen Bedingungen zu evaluieren, um anhand der quantitativen Untersuchung verschiedener T-Zellfunktionen unterschiedliche Ansprechraten auf Tacrolimus zu identifizieren.
Anhand von Vollblutkulturen gesunder Blutspender sollen potentielle pharmakodynamische Parameter der Immunsuppression auf unterschiedlichen Ebenen der T-Zell-Aktivierung wie die IL-2, IL-4 und TNF-α mRNA Expression, die IL-2 und IL-4 Proteinsekretion, die Expression von Oberflächenantigenen auf T-Zellen (CD25 und CD69) und die T-Zell-Proliferation *in vitro* quantitativ bestimmt werden.

(2) die Untersuchung immunologischer Parameter an einem Kollektiv von Empfängern einer Lebendnierenspende *ex vivo* vor Erstgabe von Tacrolimus sowie nach fünftägiger Tacrolimus-Monotherapie.
Zielsetzung ist die Etablierung eines möglichen pharmakodynamischen Monitoring-Parameters zur individuellen Steuerung der immunsuppressiven Therapie und die erstmalige Prüfung auf Zusammenhänge mit klinischen Verläufen.

2. Materialien

2.1. Geräte

- ABI Prism 7700 Sequence Detection System (Perkin Elmer Cetus, Norwalk, USA)
- Alublock (Hassa Laborbedarf, Lübeck)
- Analysewaage 2002MPI (Satorius, Göttingen)
- Biofuge 13 (Heraeus, Hamburg)
- Brutschrank (Labotect, Göttingen)
- Durchflusszytometer EPICS XL MCL (Coulter Electronics, Krefeld)
- ELISA-Reader (Anthos Labtec Instruments, Salzburg, AT)
- ELISA-Waschgerät (Biotest, Dreieich)
- Erythrozytenlysator Multi-Q-Prep (Coulter Electronics, Krefeld)
- Gefriertruhe, -80°C (Nuaire, Plymouth, MN, USA)
- PH-Meter pHM 83 Autocal (Radiometer, Kopenhagen, DK)
- Pipetten Finnpipetten 40-200µl, 200-1000µl (Labsystems, Helsinki. FIN)
- Pipetten Vario-Mikroliterpipetten 0.5-10µl, 10-100µl, 200-1000µl (Eppendorf, Hamburg)
- Pipettierhilfe Pipetus Akku (Hirschman Laborgeräte)
- Rüttler Sample Mixer, rotatorisch (Dynal, Hamburg)
- UV-Lampe 8W, 312 nm (Herolab, Wiesloch)
- Sterile Werkbank II, Al B3 (Nuaire, Plymouth, MN, USA)
- Vortexer Reax 2000 (Heidolph, Kelheim)
- Zentrifuge Omnifuge 2.0 RS (Heraeus, Hamburg)
- Zentriguge Varifuge 3.2 RS (Heraeus, Hamburg)

2.2. Laborbedarf

- Kulturflaschen für Zell - oder Vollblutkulturen, mit Filterverschluss, 25 cm^2 (Sarstedt, Nürmbrecht)
- Kulturschalen für Zell - oder Vollblutkulturen (Tissue Culture Plates, 6 Well,Cellstar, Greiner, Nürtingen)
- Latex-Einmalhandschuhe (Ansell, München)
- PCR-Mikroplatten, 96 Loch, 2 ml/Well (Sarstedt, Nürmbrecht)
- PCR-Reaktionsgefäß, Micro Amp Optical Tubes (Applied Biosystems, Norwalk, CN, USA)
- PCR-Reaktionsgefäß Verschluss, Micro Amp Optical Caps (Applied Biosystems, Norwalk, CN, USA)
- Pipettenspitzen, 1-10 µl, 10-100 µl, 100-1000 µl (Greiner, Nürtingen)
- Pipettenspitzen, Sterilfiltertips, gestopft 1-10 µl, 10-100 µl, 100-1000 µl (Biozym Diagnostik, Oldendorf)
- Reaktionsgefäße 1.5 ml, mit Schraubdeckel, steril (Sarstedt, Nürmbrecht)
- Stangenpipetten, steril, 10 ml (Greiner, Nürtingen)
- Transferpipette, unsteril, 1 ml (Sarstedt, Nürmbrecht)
- Zentrifugenröhrchen 50 ml, mit Schraubverschluss, konischer Boden, steril (Greiner, Nürtingen)

2.3. Reagenzien und Zellkulturmedien

- Borax (Sigma, Deisendorf)
- BrdUrd Stock, 10 mM (Fluka Biochemica; Buchs, CH)
- Dimethylsuberimidate, DMS (Sigma, Deisenhofen)
- Ficoll (Seromed Biochrom, Berlin)
- Kulturmedium IMDM (BioWhittaker, Verviers, B)
- L-Glutamin (Seromed Biochrom, Berlin)
- Penicillin 10000 E/ml-Streptomycin 10000 μg /ml (Seromed Biochrom, Berlin)
- Phosphate Buffered Saline, PBS (Gibco, Karlsruhe)
- Tacrolimus, 1 ml Infusionslösungskonzentrat (Prograf® 5mg/ml, Fujisawa, München),
- Glucoselösung 5%, G5, 100 ml (Baxter, Unterschleißheim)
- TRIS Tris-hydroxymethyl-aminomethan (Fluka Biochemica, Buchs, CH)
- Trypsin (BioWhittaker, Verviers, B)
- 7-Amino-Actinomycin, 7AAD (Sigma, Deisenhofen)

2.4. Antikörper und Stimulanzien

- Monoklonale Maus-Anti-Human-CD3 Antikörper (Klon CLB T3/4E, 1XE, Hiss Diagnostics, Amsterdam, NL)
- Monoklonale Maus-Anti-Human-CD28 Antikörper (Klon CLB-CD28/1, 15E8, Hiss Diagnostics, Amsterdam, NL)
- Monoklonale Maus-Anti-Human-Antikörper:
    - anti-CD4-FITC-konjugiert (Klon RPA-T4, BD PharMingen, Hamburg)
    - anti-CD4-PE-konjugiert (Klon RPA-T4, BD PharMingen, Hamburg)
    - anti-CD25-PE-konjugiert (Klon 1HT44H3, Beckman-Coulter Immunotech, Krefeld)
    - anti-CD69-PE-konjugiert (Klon L78, Becton Dickinson, San Jose, USA)
    - anti-IgG1κ-FITC-konjugiert (Klon MOPC-21, BD PharMingen, Hamburg)
    - anti- IgG2a-RD1-konjugiert (Klon U7.27, Beckman-Coulter Immunotech, Krefeld)
    - anti BrdU-FITC-konjugiert (Klon Bu20a, DAKO Cytomation, Hamburg)

2.5. Reagenzien für molekularbiologische Arbeiten

- AmpliTaq Gold-Polymerase 1,25U/μl (Applied Biosystems, Foster City, USA)
- dNTP's (dATP, dCTP, dGTP, dUTP) 10mM (Applied Biosystems, Foster City, USA
- Magnesiumchlorid 25mM (Applied Biosystems, Foster City, USA)
- MuLV (Murine Leukemia Virus) Reverse Transcriptase 50 U/μl (Applied Biosystems, Foster City, USA)
- Nuclease-Freies-Wasser 25ml (Promega, Heidelberg)

- Primer, sense und antisense, Sonden für: β-Actin, IL-2, IL4, TNF-α (TIB Molbiol, Berlin)
- RNAse-Inhibitor 20 U/μl (Applied Biosystems, Foster City, USA , Gibco BRL, Eggenstein)
- 10x TaqMan A Puffer (10xPCP Buffer, Applied Biosystems, Foster City, USA)

2.6. Testkits

- ELISA für humanes IL-2, IL-4 (Bender, Wien, AT)
- RNA-Isolierungs-Kit, Purescript RNA Isolation Kit (Gentra Systems, MN, USA)

3. Methoden und Patienten

3.1. Vollblutstimulationstest

Der Vollblutstimulationstest dient zur Analyse von T-Zellfunktionen durch Messung der T-Zellproliferation, der Expression von Oberflächenantigenen auf T-Zellen sowie zur Quantifizierung von Zytokinen und Zytokin-mRNA im Vollblut.

Die Grundlage für den Vollblutstimulationstest sind die Protokolle von Kirchner et al. (1982), Bloemena et al. (1989), sowie die Modifikation für die Quantifizierung von Zytokin-mRNA durch Härtel et al. (1999). Vollblut erscheint im Vergleich zur Kultur von mononukleären Zellen des peripheren Blutes (PBMC) als geeignetes Material, da die Separation der T-Zellen aus ihrer natürlichen Umgebung und somit eine eventuelle Vorstimulation entfallen und alle Faktoren, die für die T-Zell-Aktivierung von Bedeutung sind, in physiologischer Konzentration vorhanden sind.

Für den hier beschriebenen Vollblutstimulationstest wurde mit Lithium-Heparin versetztes peripher-venöses Blut verwendet (Ausnahme siehe Kapitel 3.5.1).

Das Vollblut wurde innerhalb von 2 Stunden nach Entnahme unter sterilen Bedingungen verarbeitet. In Gewebekulturschalen (6-Loch-Platte, ∅ = 35 mm) sowie Gewebekulturflaschen (25 cm^2) erfolgte jeweils im Doppelansatz die Verdünnung von 1 ml Vollblut mit 9 ml IMDM-Kulturmedium, das mit Penicillin, Streptomycin sowie L-Glutamin angereichert worden war (Tabelle 1).

Danach wurden die Ansätze 2 Stunden bei 37°C, 5% CO_2 und gesättigter Luftfeuchtigkeit mit Tacrolimus (Prograf® Infusionslösungskonzentrat 5mg/ml gelöst in 5 % Glucoselösung) vorinkubiert. Die Tacrolimuskonzentration in den Proben betrug je nach Maßgabe der Experimentieranordnung 12.5, 25 oder 100 ng/ml. Die Kontrolle der Medikamentenkonzentration im Vollblutansatz erfolgte mittels IMx Tacrolimus II Assay (Abbott Diagnostics), mit freundlicher Unterstützung von Herrn Prof. Dr. med. H. Iven, Institut für klinische und experimentelle Pharmakologie und Toxikologie der Universität Lübeck.

Die Vollblutproben wurden anschließend mit 1μg/ml Anti-CD3 sowie 1 μg/ml Anti-CD28 monoklonalen Antikörpern (Tabelle 2) stimuliert und bei einer Temperatur von 37°C, 5% CO_2 und gesättigter Luftfeuchtigkeit inkubiert. Je nach Maßgabe der Experimentieranordnung wurden die Kulturen nach 4 - 72 Stunden Inkubation gestoppt (Stimulationsdauer).

Für die Bestimmung der Zytokinsekretion mittels ELISA (3.2.) wurden nach 24 h Inkubationszeit Zellkulturüberstände (je 1,5 ml) gewonnen und bei –80°C bis zu sechs Monaten tiefgefroren.

Tabelle 1: Reagenzien für den Vollblutansatz

Reagenz	**Zusammensetzung**
Nährmedium	IMDM 500ml plus Penicillin (100 U /ml) plus Streptomycin (100 µl / ml) plus L-Glutamin (2 mmol / l)
Hämolysepuffer (pH 8.0)	NH_4Cl 16.52 g $KHCO_3$ 2,0 g EDTA 0.08 g Aqua dest. ad 2000 ml

Tabelle 2: Stimulanzien für den Vollblutansatz

Zusatz	**Konzentration im Kulturmedium**
Monoklonaler Maus-Antikörper (CLBT3/4E) Anti-human CD3 (2 µg / µl)	1 µg / ml (= 5µg / 10 ml Kultur)
Monoklonaler Maus-Antikörper (CLB-CD28/1) Anti-human CD28 (2 µg / µl)	1 µg / ml (= 5µg / 10 ml Kultur)

Für die RNA-Isolierung (3.3) und anschließende Quantifizierung der Zytokin mRNA Expression (3.4.2), die Untersuchung von Aktivierungsmarkern auf der Oberfläche von T-Lymphozyten mittels Durchflusszytometrie (3.5.1), sowie der Analyse der T-Zell-Proliferation mittels UVID (3.6) wurden die Ansätze sofort weiterverarbeitet. Im folgenden sind die Methoden erläutert, die im Anschluss an den Vollblustimulationstest verwendet wurden.

3.2. Enzyme-linked-immunosorbent-assay (ELISA)

Von den Vollblutansätzen wurden nach 24 h Costimulation Zellkulturüberstände (je 1.5 ml) gewonnen, in denen mittels ELISA die IL-2 sowie IL-4 Zytokinproduktion bestimmt werden sollte. In der Sandwich-ELISA-Technik wird eine Mikrotiterplatte mit einem spezifischen monoklonalen Primärantikörper beschichtet, an den das zu untersuchende Zytokin im Rahmen einer Antigen-Antikörper-Reaktion bindet. An die gebildeten Immunkomplexe lagert sich ein im

nachfolgenden Schritt zugefügter löslicher enzymgekoppelter Sekundärantikörper gegen das zu untersuchende Antigen an. Durch Zugabe eines chromogenen Substrats erfolgt die Katalyse einer Farbstoffreaktion, anhand derer die Immunkomplex gebundenen Enzym-Substrat-Komplexe sichtbar gemacht werden können. Mittels photometrischer Quantifizierung des Farbstoffumsatzes, wobei die Immunkomplex gebundenen Markerenzyme mit Standards bekannter Enzymaktivität verglichen werden, erfolgt die Bestimmung der gebundenen Zytokinmenge.
Die Durchführung der ELISA entsprach der Anleitung der Testkits.

3.3. RNA-Isolierung

Die Isolierung der RNA aus dem Vollblutansatz erfolgte nach Beendigung der Inkubation (4, 8 oder 24 Stunden) in zwei Schritten. Zunächst wurden die Erythrozyten lysiert, danach war es grundsätzlich möglich, das Leukozytenpellet nach Resuspension in IMDM bis zu 3 Monaten bei –80° tiefzufrieren oder sofort mit der RNA-Isolierung zu beginnen. Die eigentliche RNA-Isolierung erfolgte mittels eines kommerziellen Kits (Pureskript RNA Isolation Kit).

Protokoll Erythrozytenlyse

- Kulturvolumen des Vollblutansatzes möglichst vollständig aufnehmen und in ein Zentrifugenröhrchen (50 ml) überführen
- Mit 40 ml Hämolysepuffer versetzen
- Adhärente Zellen durch Zugabe von 1.5 ml Trypsin und 10 minütiger Inkubation bei 37° lösen
- Gelöste Zellen ebenfalls in das Zentrifugenröhrchen überführen
- Abzentrifugation der mononukleären Zellen (300 x g, 10 min, 4°)
- Verwerfen des Überstandes
- Leukozytenpellet aufspülen und in ein steriles 1.5 ml fassendes Reaktionsgefäß überführen
- Mit ca. 1 ml Hämolysepuffer versetzen
- 10 min inkubieren
- Zentrifugation bei 300 x g für 1 min
- Überstand mit Pipette entfernen
- Das Leukozytenpellet sollte weiß sein, da Hämoglobinverunreinigungen die weiteren Reaktionsschritte beeinträchtigen können
- Gegebenenfalls Pellet erneut mit 1 ml Hämolysepuffer für 5 min versetzen und Pellet 1 min zentrifugieren
- Zellen 100 µl IMDM resuspendieren

- Tieffrieren der resuspendierten Zellen bei –80° oder sofortiges Fortfahren mit der RNA-Isolierung

Die resuspendierten Leukozyten wurden im Anschluss mit Hilfe anionischer Detergentien lysiert, wodurch zelluläre Bestandteile in Lösung gebracht wurden. Im Anschluss wurden kontaminierende Proteine und DNA durch Salzpräzipitation ausgefällt. Die sich in der wässrigen Phase des Ansatzes befindende RNA konnte dann mit Isopropylalkohol präzipitiert werden. Die gesamte RNA wurde nach einem Waschvorgang mit 70% Ethanol in RNAse-freiem Wasser aufgelöst und bis zum Gebrauch bei –80° tiefgefroren oder sofort zur PCR eingesetzt.
Ribonukleasen sind ubiquitär vorkommende Enzyme, die in der Lage sind aus RNA Mono- oder Oligonukleotide abzuspalten. Bei Isolierung und Umgang mit RNA sind deshalb folgende Grundregeln zu beachten:

- Bei allen Arbeitsschritten sind Handschuhe zu tragen
- Es muss an einer sterilen Werkbank gearbeitet werden
- Es darf nur RNAse-freies Wasser verwendet werden

Protokoll RNA-Isolierung

- Resuspendierte Leukozyten in sterilem 1.5 ml Reaktionsgefäß mit 450 µl „Cell Lysis Solution“ versetzen
- Fünfmal auf- und abpipettieren (evtl. vorhandenes Zellpellet sollte sich weitgehend aufgelöst haben)
- Lysierte Zellen mit 150 µl „Protein-DNA Precipitation Solution“ versetzen
- Vorsichtig ca. 20 mal auf- und abschwenken und Reaktionsgefäß für mindestens 5 min auf Eis stellen
- Zentrifugation bei 13000 x g für 8 min
- Überstand in ein neues, steriles 1.5 ml Reaktionsgefäß geben, das 600 µl Isopropanol (100%) enthält
- Reaktionsgefäß vorsichtig ca. 50 mal hin- und herbewegen und mischen
- Bei einer Geschwindigkeit von 13000 x g für 8 min zentrifugieren
- Überstand verwerfen und kleines weißes RNA-Pellet mit 300 µl Ethanol (70%) waschen
- Zentrifugation bei 13000 x g für 1 min
- Überstand vorsichtig entfernen
- Pellet für ca. 10 min lufttrocknen lassen (bis sich kein Ethanol mehr im Gefäß befindet)
- RNA-Pellet in 300 µl RNAse freiem Wasser („Nuclease-Free-Water“) aufnehmen und für mind. 30 min auf Eis stellen
- Resuspendierte RNA bestenfalls sofort für PCR einsetzen oder bis zum Gebrauch bei –80° (nicht länger als 1 Monat) tieffrieren

3.4. Reverse-Transkriptions-Polymerasekettenreaktion (RT-PCR)

Grundlagen

1984 entwickelte Kary Mullis eine Methode zur Vervielfältigung spezifischer DNA-Sequenzen, die Polymerasekettenreaktion (PCR). Hier erfolgt mittels einer DNA-Polymerase eine *in-vitro*-Replikation von DNA-Sequenzen, die von zwei synthetischen Oligonukleotiden (sog. Primern) eingerahmt werden. Um eine annähernd exponentielle Amplifikation der Zielsequenz zu erreichen, werden folgende drei Schritte zyklisch wiederholt:

1. Strangtrennung: Hier werden die beiden Stränge des ursprünglichen DNA-Moleküls durch kurzzeitiges Erhitzen in Einzelstränge getrennt.
2. Anlagerung von Primern (‚Annealing'): Abkühlung zur Hybridisierung sequenzspezifischer Oligonukleotide (Primer) mit den jeweils komplementären DNA-Strängen. Sie dienen als Startmoleküle für die DNA-Synthese.
3. Primer-Extension: Die thermostabile Taq-Polymerase aus dem thermophilen Bakterium *Thermophilus aquaticus* verlängert den komplementären DNA-Strang ausgehend von den Primern in 5'-3' Richtung

Bei der Echtzeit- PCR werden zusätzlich spezielle Hybridisierungssonden eingesetzt. Diese aus Oligonukleotiden bestehenden Sonden sind mit Fluoreszenzfarbstoffen doppelt markiert. Während der Annealing-Phase hybridisiert die Sonde mit den Primern an den komplementären Sequenzen. In der Extensionsphase trifft die Taq-Polymerase auf die Sonde und generiert durch deren Hydrolyse ein Fluoreszenzsignal. Dieses Fluoreszenzsignal ist sequenzspezifisch, da nur 100%ig bindende Sonden hydrolysiert werden und steigt proportional mit der Anreicherung an Amplifikat an. Mit Hilfe des ABI Prism 7700 Sequence Detection Systems kann die Emission des Fluoreszenzsignals kontinuierlich alle sieben Sekunden während der Amplifikation für jeden PCR-Ansatz einzeln gemessen werden (Echtzeit).

Die PCR-Zyklenzahl, bei der das Fluoreszenzsignal die Hintergrundfluoreszenz überschreitet, wird als Schwellenzyklus (C_t) bezeichnet. Fluoreszenzsignale werden dann als positiv gewertet, wenn die Signalintensität um ein zehnfaches größer ist als die Standardabweichung der Grundfluoreszenz [Heid et al., 1996].

Mit Hilfe von Standardkurven kann durch Berechnung des Schwellenzyklus die Quantifizierung spezifischer Nukleinsäuremoleküle in der Probe erfolgen.
Die in den vorliegenden Untersuchungen verwendeten Sequenzen von Primern und Sonden für β-Aktin, IL-2, IL-4 und TNF-α sind in Tabelle 4 dargestellt.

3.4.1. Quantitative RT-RCR

Um mRNA mittels Polymerasekettenreaktion nachweisen zu können, erfolgt zunächst mit Hilfe einer RNA-abhängigen-DNA-Polymerase (Reverse Transkriptase) die Erzeugung eines komplementären DNA-Stranges (cDNA) aus der RNA-Zielsequenz. Der cDNA-Strang dient als Matrize, um in der anschließenden Polymerasekettenreaktion *in vitro* vervielfältigt zu werden. Reverse-Transkription und PCR finden unmittelbar aufeinander folgend in einem geschlossenen Reaktionsgefäß statt.
Das Protokoll für die quantitative Bestimmung von Zytokin mRNA mittels Echtzeit-PCR wurde 1999 von Härtel et al. beschrieben.
In der vorliegenden Studie folgte nach Isolierung der RNA aus dem jeweiligen Probenmaterial die Vorbereitung des RT-PCR-Ansatzes nach unten aufgeführtem Protokoll. Die vorbereiteten PCR-Mehrfachansätze (Mastermix), diese enthielten alle Reagenzien mit Ausnahme der RNA-Proben, wurden in optische Reaktionsgefäße (MicroAmp Optical Tubes and Optical Caps, Applied Biosystems, Foster City, USA) pipettiert. Im Anschluss wurden Negativkontrollen, verdünnte Standards bzw. Proben-RNA jeweils in zweifachem Ansatz in die Reaktionsgefäße gegeben und amplifiziert. Die PCR-Reaktionen fanden alle auf einem 96-Proben-Mikroplattenformat statt. Die quantitative Erfassung von mRNA-Kopien erfolgte mit Hilfe des ABI PRISM 7700Sequence Detection Systems.

Protokoll

- Isolierung von totaler RNA (3.3)
- RT-PCR-Ansatz (50 µl) auf Eis:

Tabelle 3: RT-RCR-Ansatz

Reagenz	**Ausgangsmenge**
10 x TaqMan-A-Puffer	5 µl
$MgCl_2$ (25 mM)	7 µl
dATP, dCTP, dGTP (je 10 mM)	je 1.5 µl

dUTP (20 mM)	1.5 µl
spezifischer sense Primer (10 µM)	0.5 µl
spezifischer antisense Primer (10 µM)	0.5 µl
spezifische fluorogene Sonde (10 µM)	0.5 µl
RNAse-Inhibitor (20 U)	0.66 µl
MuLV Reverse Transkriptase (25 U)	0.5 µl
AmpliTaqGold Polymerase (1.25 U)	0.25 µl
RNA-Probe, Standard oder Negativkontrolle Aqua dest., nukleasefrei	20 µl ad 50 µl

- Durchführung des PCR-Programms auf dem Fluoreszenz-Detektor:
  - 48°C für 30 min reverse Transkription
  - 95°C für 10 min Aktivierung der Taq-Polymerase
  - 40 PCR-Zyklen bestehend aus:
  - 95°C für 15 sec denaturieren
  - 60°C für 1min 30 sec Annealing und Extension
  - anschließend Temperatur auf 25°C halten
- Auswertung der PCR-Kinetik mit Bestimmung der Schwellenzyklen für die Fluoreszenzemission
- Quantifizierung der mRNA

3.4.2. Quantifizierung der Zytokin mRNA-Expression

Die Quantifizierung von RNA in unbekannten Proben benötigt die Berechnung des Schwellen-Zyklus C_t durch die System-Software sowie die Erstellung von Standardgleichungen, aus denen die Startkopienzahl ermittelt werden kann.

Für die Herstellung der Standards wurden cDNA-Fragmente mit Hilfe des Original TA Cloning Kits (Invitrogen, San Diego, USA) kloniert, die β-Aktin, IL-2, IL-4 und TNF-α kodieren.

Aus Standardpräparationen mit definierten Mengen an Standard Molekülen der oben genannten Zytokine sowie β-Aktin wurden Verdünnungen ($1x10^7$, $1x\ 10^6$, $1x10^5$, $1x10^4$ $1x10^3$, $1x10^2$ – hier wurden Moleküle einer Stocklösung mit bekannter Konzentration mit Wasser verdünnt) im Dreifachansatz vorbereitet und amplifiziert. Die Standardkurven wurden im Anschluss anhand der Standard-Amplifikation generiert. Die Erstellung von Zytokin-Standardkurven und die Ableitung von Standardgleichungen ermöglicht die absolute Quantifizierung unbekannter Zytokin-Konzentrationen bzw. Startkopienzahlen.

Die Gensequenz von β-Aktin, einem Gen das für ein Zytoskelett-Protein kodiert und konstant exprimiert wird (sog. Housekeeping Gene) [Kruse et al., 1997] wird als RT-PCR Kontrolle simultan quantifiziert. Die mRNA-Expression von β-Aktin

wurde jeweils als Normalisierungsfaktor für Variationen in der Zellzahl, der Probenpräparation und der Amplifikationseffizienz bestimmt [Härtel et al., 1999].
In den vorliegenden Untersuchungen wurde unter Verwendung der β-Aktin-Standardkurve und dem β-Aktin-C_t-Wert der unbekannten Probe, die bestimmte Zytokin-Kopienzahl der unbekannten Probe auf 10^6 β-Aktin mRNA Kopien bezogen (normalisiert).

Standardgleichungen

x = Zytokin-Startkopienzahl
y = Schwellenzyklus C_t
β-Aktin y = -4.04 log x + 46.6
IL-2 y = -4.29 log x + 49.5
IL-4 y = -4.28 log x + 48.5
TNF-α y = -3.60 log x + 36.0

Normalisierungsfaktor (NF)

NF = 10^6 : β-Aktin-Kopienzahl
NF x Kopienzahl = Kopienzahl / 10^6 β- Aktin-Kopien

Tabelle 4: Sequenzen der Primer und Sonden für die quantitative RT-PCR

Oligonukleotid	**Sequenz (5'→ 3')**
ß-Aktin sense	TCA CCC ACA CTG TGC CCA TCT ACG A
ß-Aktin Sonde	ATG CCC TCC CCC ATG CCA TCC TGC
ß-Aktin antisense	CAG CGG AAC CGC TCA TTG CCA ATG G
IL-2 sense	GAA TGG AAT TAA TAA TTA CAA GAA TCC C
IL-2 Sonde	AGG ATG CTC ACA TTT AAG TTT TAC ATG CCC
IL-2 antisense	GAC ACT GAA GAT GTT TCA GTT CTG T
IL-4 sense	AAC AGC CTC ACA GAG CAG AAG ACT
IL-4 Sonde	TGC TGC CTC CAA GAA CAC AAC TGA
IL-4 antisense	GCC CTG CAG AAG GTT TCC TT

TNF-α sense	AGG CGG TGC TTG TTC CTC A
TNF-α Sonde	CCA GAG GGA AGA GTT CCC CAG GGA C
TNF-α antisense	GTT CGA GAA GAT GAT ATG ACT GCC

3.5. Durchflusszytometrie

Grundlagen

Die Durchflusszytometrie erlaubt eine große Anzahl von Zellen in kurzer Zeit auf physikalische sowie fluoreszierende Eigenschaften hin zu analysieren.
Im Durchflusszytometer (fluorescence activated cell sorter: FACS) werden suspendierte Zellen in einer Flusszelle (flow cell) durch einen umgebenden Flüssigkeitsstrom hydrodynamisch fokussiert, um einen Laserstrahl einzeln und nacheinander passieren zu können. Durch physikalische Eigenschaften der Zellen wird Streulicht erzeugt, anhand dessen Zellen mit Hilfe von Photodetektoren entsprechend ihrer Größe (Vorwärtsstreulicht 3°-10°) und ihrer "Granularität" (Seitwärtsstreulicht 90°) registriert werden können.
Zur Untersuchung weiterer Merkmale, z.B. der Analyse von Oberflächenmolekülen, können die Zellen zusätzlich mit Fluoreszenzfarbstoff gekoppelten, monoklonalen Antikörpern markiert werden. Die Fluorochrome werden im FACS durch einen Laserstrahl angeregt und die Lichtsignale entsprechend ihrer Intensität mit Hilfe von Photodetektoren in elektrische Impulse umgewandelt. Das Durchflusszytometer wertet die jeweilige mittlere Fluoreszenzintensität des Fluoreszenzsignals und die jeweilige Farbstoff-konzentration bzw. Antikörperkonzentration aus. Gemessen wird in Protokollen, die eine Darstellung der verschiedenen untersuchten Parameter gegeneinander in Histogrammen erlauben. Bestimmte Zellpopulationen können herausgegriffen und in den folgenden Untersuchungen separat analysiert werden („Gating").
Durch Kombination verschiedenfarbig markierter Antikörper läßt sich eine Zellpopulation, für die ein bestimmter Antikörper spezifisch ist, mit Hilfe des zweiten weiter unterteilen.
Die folgenden Untersuchungen wurden alle an einem EPICS XL MCL (Beckman-Coulter) Durchflusszytometer, ausgestattet mit einem einzelnen, gekühlten

Argonlaser mit einer Wellenlänge von 488 nm, durchgeführt. Die in der vorliegenden Arbeit verwendeten Fluorochrome waren Fluoresceinisothiocyanat (FITC), Phycoerythrin (PE) sowie der DNA-Farbstoff 7 AAD, wobei der grüne Wellenlängenbereich (FITC) mit einem Band-Pass Filter bei 525 nm, das orangene Farbspektrum (PE) mit einem Band-Pass-Filter bei 575 nm und der tiefrote Wellenlängenbereich (7 AAD) mit einem Band-Pass Filter bei 675 nm gemessen wurde.
Alle Messungen wurden bei niedrigem Probendruck durchgeführt und mindestens 10000 Zellen gemessen.

3.5.1. Analyse von Aktivierungsmarkern (CD25/CD69 Expression) auf der Oberfläche von T-Lymphozyten mittels Durchflusszytometrie

Für die Bestimmung der CD25 und CD69 Expression auf der Zelloberfläche wurde mit EDTA versetztes Vollblut, nach unter 3.1 beschriebenem Protokoll, jeweils im Doppelansatz für 24 Stunden inkubiert. Im Anschluss sollte mittels Durchflusszytometrie der Prozentsatz $CD4^+$-T-Zellen die entweder CD25 oder CD69 auf ihrer Oberfläche präsentieren, verglichen werden. Aufgrund der Autofluoreszenz von Zellen und möglicher unspezifischer Bindungen der Antikörper wurden isotypische Immunglobuline als Leerwert (Negativkontrolle) mitgeführt.

Protokoll

- 100 µl Vollblut in ein Reaktionsgefäß geben, Antikörper nach unten aufgeführtem Schema hinzugeben und mischen
- 10 min bei RT inkubieren
- Im Erythrozytenlysator (Coulter-Multi-Q-Prep) Erythrozyten lysieren und Leukozyten fixieren
- Messung der Rezeptorexpression im Durchflusszytometer

Tabelle 5: Antikörperkonzentration

Ansatz 1	MsIgG1 FITC / MsIgG2a RD1	20 µl / 10 µl
Ansatz 2	CD 4 FITC / CD 25 PE	20 µl / 5 µl
Ansatz 3	CD 4 FITC / CD 69 PE	20 µl / 20 µl

Tabelle 6: Monoklonale Maus-Anti-Human-Antikörper

Antigen	Klon	Isotyp	Konjugat
CD4	RPA-T4	Maus IgG1 κ	FITC
CD 25	1HT44H3	Maus IgG 2a	PE
CD 69	L78	Maus IgG1 κ	PE
Isotyp Maus IgG 1 κ	MOPC-21	Maus IgG 1 κ	FITC
Isotyp Maus IgG2a	U7.27	Maus IgG2a	RD1

3.6. UV-induzierte Detektion (UVID)

Grundlagen

Das Prinzip der UVID Technologie (UV-induzierte Detektion) wurde 2000 von Hammers et al. beschrieben.

Die UVID Methode erlaubt eine Detektion von halogenierten Pyrimidinen in DNA synthetisierenden Zellen (S-Phase Zellen) unter Erhaltung antigener Strukturen. Dieses durchflusszytometrische Verfahren erlaubt somit die Abschätzung proliferativer Aktivität unterschiedlicher Zellpopulationen [Hammers et al., 2002]. Das UVID Verfahren besteht grundsätzlich aus drei Schritten:

1. Inkubation mit dem Thymidin-Analogon 5-Bromo-2-Deoxyuridine (BrdUrd) und anschließender UV-Bestrahlung mit partieller Photolyse von BrdU. Hier wird BrdUrd in DNA synthetisierende Zellen aufgenommen und in die neu entstehenden DNA-Stränge eingebaut. Der Nachweis von BrdU in unbehandelten Zellen ist nicht möglich. Mit Hilfe von UV B-Bestrahlung der zu untersuchenden Zellen kommt es zu einer partiellen Photolyse des halogenierten Pyrimidins. Die dabei entstehenden Radikale führen in der Nachbarschaft des photolysierten BrdU zur Schädigung der DNA.
2. Fixierung und somit Stabilisierung der Zellen
3. Hypotone Behandlung und Detektion von BrdUrd. Die vorbehandelten Zellen bzw. Zellkerne werden einem hypotonen Puffer ausgesetzt. Dies ermöglicht die Bindung monoklonaler Antikörper (Anti-BrdU, FITC markiert) an das verbliebene Analogon und erlaubt somit eine Identifizierung DNA synthetisierender Zellen. Die zusätzliche Färbung mit dem DNA-Vitalfarbstoff 7AAD ermöglicht zusätzlich zur Abgrenzung von $G_{0/1}$-Phase Zellen (einfacher DNA-Gehalt) und G_2/M Phase Zellen (doppelter DNA-Gehalt) den Ausschluß von aggregierten Zellen.

Zusätzlich ist durch Zugabe konjugierter, monoklonaler Antikörper die Analyse bestimmter Oberflächenmoleküle und somit eine Charakterisierung der Zellen möglich. Die folgenden Messungen am Durchflusszytometer erfolgten in der 3-Farb-Fluoreszenz.
Zur Untersuchung der T-Zell-Proliferation (% der S-Phase-Zellen) nach 72h Stimulation mit Anti-CD3/Anti-CD28 mAb (3.1) wurde eine modifizierte Form des oben beschriebenen Assays verwendet.

Protokoll

- Lithium-heparinisiertesVollblut jeweils im Doppelansatz in Zellkulturflaschen überführen, mit Medium versetzten (siehe 3.1.), vorinkubieren und wie beschrieben mit Anti-CD3/Anti-CD28 mAb für 72 h stimulieren

BrdUrd Inkubation / Zellen ernten

- Zellkultur mit 30 µl BrdU Stocklösung / 10 ml Zellsuspension (= 30 µM) versetzen
- 60 min bei 37° und 5% CO_2 inkubieren (direkte Lichtexposition vermeiden)
- 10 ml Zellsuspension sorgfältig in ein Zentrifugenröhrchen (15 ml) auf Ficoll-Gradienten schichten (Biocoll : verdünntes Blut, 1:2)
- Isolierung der mononukleären Zellen über Ficoll-Gradienten-Zentrifugation für 20 min bei 300 x g
- Interphasering mit mononukleären Zellen mittels Pipette vorsichtig absaugen
- Mit 10 ml PBS waschen und für 10 min bei 300 x g zentrifugieren
- Überstand verwerfen, Zellen in 1 ml PBS resuspendieren und in ein Eppendorf Röhrchen überführen

UV-Bestrahlung

- 5 min mittels UV-Lampe bestrahlen, hierbei die Lampe aufrecht stellen und die Röhrchen direkt auf die Filterfläche aufbringen
- Bei 300 x g für 10 min zentrifugieren
- Überstand abnehmen und Zellen mit 100 µl PBS resuspendieren

Immunphänotypisierung

- Zugabe von 20 µl anti-CD4 PE (Klon RPA-T4), aufmischen und 20 min im Dunkeln inkubieren
- Zellen mit 1000 µl PBS waschen und für 3 min bei 3000 rpm zentrifugieren
- Überstand abnehmen

- Zellen in 100 µl PBS aufnehmen

Fixierung

- Fixierungslösung frisch aus 100 µl DMS-Stammlösung und 1000 µl DMS-Puffer (600 mg TRIS + 100 mg Na-SO_4 in 100 µl Aqua dest.) herstellen, mischen, 1000 µl auf Zellen geben und erneut aufmischen
- 5 min bei RT inkubieren
- Zellen 3 min bei 3000 rpm herunterzentrifugieren
- Überstand abnehmen und Zellen in 100 µl PBS resuspendieren
- Zellen in FACS Röhrchen überführen

Hypotone Behandlung / Fluoreszenz

- 1000 µl Aqua dest hinzugeben
- 50 µl 0.1 M Borax pH 8,0 hinzugeben
- 20 µl anti BrdUrd FITC (Klon Bu20a) hinzugeben
- 20 µl 7AAD Stocklösung hinzugeben
- Röhrchen kurz mischen
- Mindestens 60 min bei RT im Dunkeln inkubieren

Im Anschluss durchflusszytometrische Messung am EPICS XL MCL (Beckman-Coulter) Durchflusszytometer, hierbei mindestens 10000 Zellen der Zielpopulation unter „low sample pressure“ akquirieren.

3.7. Studiendesign

3.7.1. Probanden und Patienten

Für die Untersuchung der pharmakodynamischen Wirksamkeit von Tacrolimus *in vitro,* setzte sich die Gruppe gesunder Probanden aus 11 freiwilligen Blutspendern, 8 Frauen und 3 Männern, des Instituts für Immunologie und Transfusionsmedizin des Universitätsklinikums Schleswig-Holstein, Campus Lübeck (damaliger Direktor: Prof. Dr. med. H. Kirchner) zusammen. Die Probanden waren zwischen 25 und 40 Jahre alt und Nichtraucher. Sie zeigten während des Untersuchungszeitraums keinerlei Hinweise auf eine vorausgegangene Infektion.

Für die nachfolgende *ex vivo* Studie dienten 4 Empfänger einer Lebendnierenspende am Transplantationzentrum des Universitätsklinikums Schleswig-Holstein, Campus Lübeck (damaliger Leiter: Prof. Dr. med. L. Fricke). Das

Patientenkollektiv bestand aus zwei Männern und zwei Frauen im Alter zwischen 30 und 74 Jahren. Während des Untersuchungszeitraumes zeigte keiner der Patienten Anzeichen einer bakteriellen oder viralen Infektion, einer der untersuchten Patienten zeigte nach Transplantation Anzeichen einer akuten allogenen Transplantatabstoßung. Als Ausschlusskriterien galten akute Infektionen oder maligne Erkrankungen. Details zu den einzelnen Patienten sind in Tabelle 7 wiedergegeben.
Die von uns rekrutierten Patienten erhielten vor Transplantation über einen Zeitraum von 96 Stunden eine Tacrolimus Monotherapie, die ab dem Transplantationstag durch Azathioprin und Methylprednisolon ergänzt wurde. Die initiale Dosierung der Tacrolimus Monotherapie erfolgte anhand des Körpergewichtes (KG) des jeweiligen Patienten (0,15 mg/kg KG/Tag verteilt auf 2 Medikamentendosen in 12 Stunden Intervallen); die anschließende Steuerung erfolgte nach Blutspiegeln.

Die Studie wurde von der Ethikkommission des Universitätsklinikums Schleswig-Holstein, Campus Lübeck genehmigt, Aktenzeichen 00-105, vom 24.10.2000.

3.7.2. *In-vitro*-Studie mit gesunden Probanden

Um die individuelle pharmakodynamische Wirksamkeit von Tacrolimus *in vitro* zu untersuchen wurden Vollblutansätze gesunder Probanden (n=11) verwendet. Die Blutentnahmen fanden um 8:00 Uhr morgens statt, um tageszeitliche Schwankungen als mögliche Fehlerquelle zu minimieren. Das Vollblut wurde innerhalb von 2 Stunden nach Entnahme verdünnt (3.1) und für 2 Stunden nach Zugabe von Tacrolimus in unterschiedlichen Konzentrationen (0, 12.5, 25 oder 100 ng/ml) vorinkubiert (3.1). Im Anschluß erfolgte die T-Zell-spezifische Stimulation mit Anti-CD3/Anti-CD28 mAb bzw. nur mit Anti-CD3 mAb (3.1). Die anschließende Inkubationszeit betrug je nach Maßgabe der Experimentierordnung 4, 8, 24 oder 72 Stunden (3.2-3.6).
Die *in vitro* Effekte von Tacrolimus wurden gegenüber wirkstoffreien Kontrollen charakterisiert.

3.7.3. *In-vitro*- vs. *Ex-vivo*- Studie mit Patienten unter immunsuppressiver Therapie

Um individuelle pharmakodynamische Effekte von Tacrolimus *in vitro* untersuchen und *ex vivo* Effekten gegenüber stellen zu können, wurde Vollblut von vier Empfängern einer Lebendnierenspende verwendet (Tabelle 7). Bei diesen Patienten wurde 96 Stunden vor Transplantation mit einer peroralen Tacrolimusgabe (Prograf®, Fujisawa, München) begonnen.

Für die *in-vitro*-Studie wurde peripher-venöses Blut vor Tacrolimus (Prograf) Erstgabe entnommen. Das Vollblut wurde verdünnt (3.1) und für 2 Stunden ohne Tacrolimus (Tacrolimus-freie Kontrolle) sowie mit einer Tacrolimuskonzentration von 25 ng/ml inkubiert. Anschließend erfolgte die Stimulation mit Anti-CD3/Anti-CD28 mAb (3.1) für 4 und 24 Stunden.

Für die *ex vivo* Studie wurde Vollblut nach einer 96-stündigen Tacrolimus Monotherapie, die die Patienten vor Transplantation erhielten, entnommen. Die Blutentnahmen erfolgten am Tag 5 der Tacrolimus Monotherapie (nach 96 Stunden Monotherapie) vor der morgendlichen Tacrolimus Einnahme (Talspiegel, 0 h n.E.), 2 h nach Einnahme (2 h n.E.), sowie 4 h nach Medikamenteneinnahme (4 h n.E.). Parallel wurde die Medikamentenkonzentration mittels Fluoreszenzpolarisation [Wallemacq et al., 1997] (mit freundlicher Unterstützung von Herrn Prof. Dr. med H. Iven, Institut für klinische und experimentelle Pharmakologie und Toxikologie der Universität Lübeck) bestimmt. Das Vollblut wurde wie unter 3.1 beschrieben weiterbehandelt und nach Zugabe von Anti-CD3/Anti-CD28 mAb für 4 und 24 Stunden stimuliert.

Zur anschließenden Untersuchung der IL-2 mRNA Expression wurden die Vollblutkulturdoppelansätze wie unter 3.2 und 3.3 beschrieben weiterbehandelt.

Tabelle 7: Patientendaten unter Tacrolimusmonotherapie

Patient	*Alter*	*Geschlecht*	*Erkrankung*	*Ab*	*Mismatch*	*CMV*	*Rej*	*0h n.E.*	*2h n.E.*	*4h n.E.*
I	39	w	PN	2%	1-2-2	+/+	Nein	5,7	13,0	9,0
II	64	m	PN	Nein	1-2-1	-/+	Ja	30,8	63,9	71,6
III	30	m	degNP	Nein	1-1-1	-/+	Nein	16,9	38,4	26,8
IV	38	w	RN	Nein	1-1-1	-/-	Nein	9,5	24,3	12,3

Alter: in Jahren;
Geschlecht: m = männlich, w = weiblich;
Erkrankung: PN = chronische Pyelonephritis; degNP = degenerative Nephropathie; RN = Refluxnephropathie;
Ab: präformierte HLA-Antikörper;
Mismatch: HLA-mismatch in HLA A - HLA B - HLA DR;
CMV: Cytomegalievirus, Status von Empfänger/Spender;
Rej: akute Abstoßung Ja/Nein;
0h n.E.: 0 Stunden (h) nach Tacrolimuseinnahme (n.E.), Tacrolimus Talspiegel (ng/ml);
2h n.E.: Tacrolimus Spiegel (ng/ml) 2 Stunden nach Medikamenteneinnahme;
4h n.E.: Tacrolimus Spiegel (ng/nl) 4 Stunden nach Medikamenteneinnahme

3.8. Statistische Verfahren

Die statistische Auswertung erfolgte mit Hilfe des computergestützten Programmes SPSS für Windows (Version 16.0, SPSS GmbH, München, Deutschland). Angewendet wurden der Mann-Whitney U-Test und der Wilcoxon Rangsummentest für den verteilungsunabhängigen Vergleich zweier unabhängiger Stichproben.

Der verteilungsunabhängige Vergleich zweier verbundener Stichproben erfolgte mit Hilfe des Wilcoxon-Tests.

Für den verteilungsunabängigen Vergleich mehrerer verbundener Stichproben wurde der Friedman-Test durchgeführt. Wurde hier ein signifikanter Unterschied gefunden, wurde dieser im Anschlußtest von Wilcoxon-Wilcox näher differenziert.

Zweiseitige p- Werte <0.05 wurden als statistisch signifikant angesehen. Signifikante Unterschiede wurden wie folgt dargestellt: * $p < 0.05$.

Die Dosisabhängigkeit der kumulierten Expression (Abb. 5) wurde mittels Jonckheere-Terpstra-Test überprüft. Ein $p<0.05$ nach Bonferroni-Korrektur für multiples Testen wurde als signifikant gewertet. Die Statistik wurde mit Gnu-R (URL: www.r-project.org) durchgeführt.

4. Ergebnisse

4.1. *In-vitro*-Charakterisierung der individuellen Tacrolimus-Sensitivität

In der *in-vitro*-Untersuchung wurde der Einfluss von Tacrolimus auf Parameter der T-Zell-Aktivierung an gesunden Probanden untersucht. Vollblutproben wurden mit einer Antikörperkonzentration von je 1 µg/ml Anti-CD3 und Anti-CD28 stimuliert. Die Analyse der Proben erfolgte ohne (Kontrolle) und mit Tacrolimus. Der Einfluss von Tacrolimus auf Parameter der T-Zell-Aktivierung wurde im Vergleich zur Tacrolimus-freien Kontrolle charakterisiert.

4.1.1. Effekte von Tacrolimus auf die Zytokin mRNA Expression

Die Wirkung von Tacrolimus auf die IL-2 und IL-4 mRNA Expression wurde bei 11 Probanden untersucht. Die Tacrolimuskonzentration in den Proben war 25 ng/ml, die Stimulationsdauer betrug 24 Stunden.

Die quantitative Bestimmung der Zytokin-mRNA der Proben erfolgte mittels Echtzeit-PCR. Um schwankende Lymphozytenkonzentrationen oder eine variierende Effizienz bei RNA-Isolation, reverser Transkription und PCR-Amplifikation auszugleichen, wurde die gemessene Zytokin-Kopienzahl auf 10^6 β-Aktin mRNA Kopien bezogen (Normalisierung).

Die quantitative Bestimmung der Zytokin mRNA Expression erfolgte für jeden Probanden in 4 Proben, die innerhalb von 8 Monaten entnommen wurden. Die individuelle Wirkung von Tacrolimus war für jeden Probanden in 4 Messungen wiederholbar. Probanden, die mit einer Suppression der Zytokin mRNA Expression reagierten, zeigten dies reproduzierbar in allen 4 Analysen. Probanden, die unter Tacrolimus eine Erhöhung der Zytokin mRNA Expression aufwiesen, zeigten in allen 4 Messungen einen Anstieg der Kopienzahlen. Für jeden Probanden wurde die Zytokin mRNA Expression als Mittelwert ± Standardabweichung (SD) angegeben (Abb.1 und Abb. 2).

IL-2 mRNA Expression

Die IL-2 mRNA Expression der 11 untersuchten Probanden zeigte nach 24 Stunden Stimulation mit Anti-CD3/Anti-CD28 mAb in den wirkstofffreien Kontrollen ein inhomogenes Expressionsmuster (Abb. 1). Die höchsten Kopienzahlen wurde

bei Proband V gemessen, die niedrigsten bei Proband VIII (Proband V: 242959 ± 70518 IL-2 mRNA Kopien vs. Proband VIII 40063 ± 19967 IL-2 mRNA Kopien/10^6 Kopien β-Aktin, Mittelwert ± SD).

Unter Tacrolimus wurde die höchste IL-2 mRNA Expression ebenfalls bei Proband V gemessen, die niedrigsten Kopienzahlen wurde für Proband XI ermittelt (Proband V: 594427 ± 172455 IL-2 mRNA Kopien vs. Proband XI: 35678 ± 18191 IL-2 mRNA Kopien/10^6 Kopien β-Aktin, Mittelwert ± SD).

Die Untersuchung zeigte bei einer Tacrolimuskonzentration von 25 ng/ml und 24 Stunden Costimulation eine individuell unterschiedliche Wirkung von Tacrolimus auf die IL-2 mRNA Expression der 11 Probanden. Bei 3 der 11 Probanden (II, X, XI) kam es zu einer Reduktion der IL-2 mRNA Expression um mehr als 50 %. Bei 2 der 11 Probanden (VI, VIII) war die Suppression geringer als 50 %. Bei 6 von 11 Probanden lagen die Kopienzahlen über denen der Tacrolimus-freien Kontrolle (> 50 % Zunahme der IL-2 mRNA Expression gegenüber der Kontrolle bei Probanden I, V und VIII, < 50 % Zunahme der IL-2 mRNA Expression bei

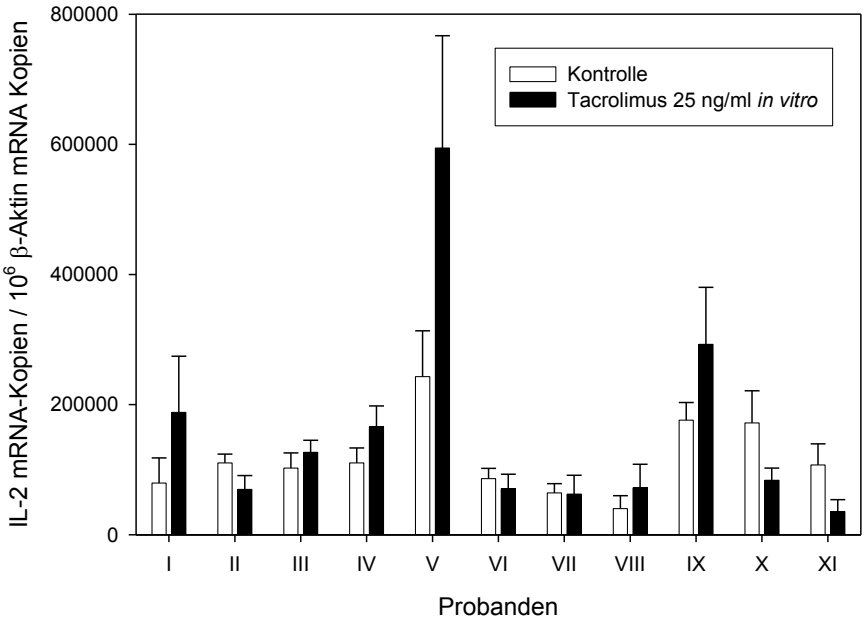


Abbildung 1: Individuelle Wirkung von Tacrolimus auf die IL-2 mRNA Expression gesunder Probanden unter Anti-CD3/Anti-CD28 mAb Costimulation

IL-2 mRNA Expression 11 gesunder Probanden (I-XI) nach 24 h Costimulation mit Anti-CD3/Anti-CD28 mAb. Tacrolimus freie Kontrolle □ , sowie unter *in vitro* Zugabe von Tacrolimus (25 ng/ml) ■. Mittelwerte ± Standardabweichungen (SD, n=4), der IL-2 mRNA-Expression (Kopienzahl normalisiert auf 10^6 β-Aktin mRNA-Kopien). Die Mittelwerte beziehen sich auf 4 Messungen / Proband in 8 Monaten.

Probanden III, IV und IX). Für jede Probe wurdejeweils die IL-2 mRNA Expression in einem unstimulierten Ansatz gemessen (339 ± 407 IL-2 mRNA Kopien / 10^6 β-Aktin mRNA-Kopien, Mittelwert ± SD).

IL-4 mRNA Expression

Für die IL-4 mRNA Expression wurden in den Kontrollen bei Proband I die höchsten Kopienzahlen gemessen (Abb. 2), die niedrigsten Werte hatte Proband III (Proband I: 19498 ± 6984 vs. Proband III: 2609 ± 1872 IL-4 mRNA Kopien / 10^6 β-Aktin mRNA-Kopien, Mittelwert ± SD). Unter Tacrolimus waren die Kopienzahlen ebenfalls bei Proband I am höchsten, die niedrigste IL-4 mRNA Expression wurde für Proband VII ermittelt (Proband I: 13433 ± 1984 vs. Proband VII 1179 ± 830 IL-4 mRNA Kopien / 10^6 β-Aktin mRNA-Kopien, Mittelwert ± SD).
Die IL-4 mRNA Expression war nach 24 Stunden Stimulation und einer Tacrolimuskonzentration von 25 ng/ml bei allen 11 Probanden reduziert (Abb. 2).

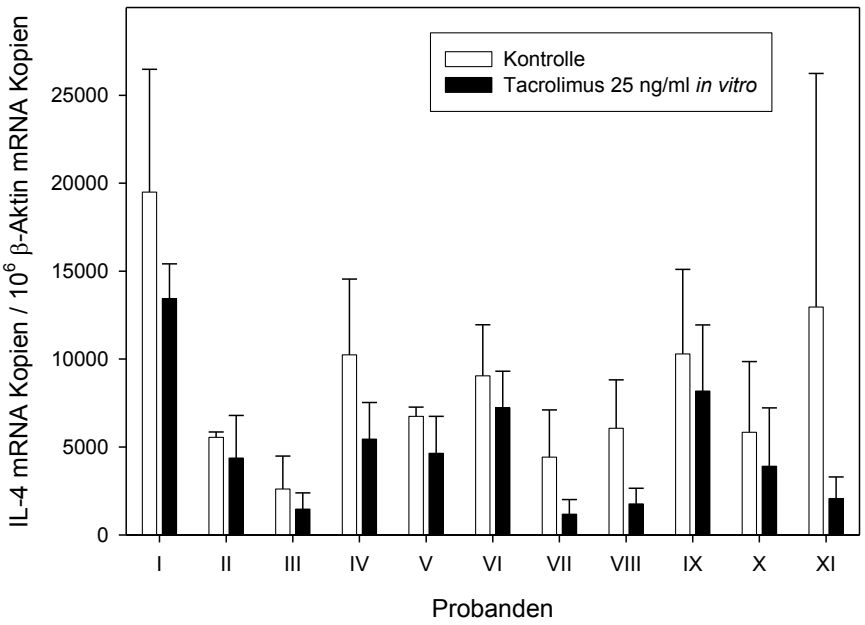


Abbildung 2: Suppressiver Effekt von Tacrolimus auf die IL-4 mRNA Expression gesunder Probanden unter Anti-CD3/Anti-CD28 mAb Costimulation

IL-4 mRNA Expression 11 gesunder Probanden (I-XI) nach 24 h Stimulation mit Anti-CD3/Anti-CD28 mAb. Tacrolimus freie Kontrolle □ und unter *in vitro* Zugabe von Tacrolimus (25 ng/ml) ■. Mittelwerte ± Standardabweichungen (SD, n=4) der IL-4 mRNA Expression (Kopienzahl normalisiert auf 10^6 β-Aktin mRNA-Kopien). Die Mittelwerte beziehen sich auf 4 Messungen / Proband in 8 Monaten.

Die Suppression lag zwischen 20 % (Proband VI) und 84 % (Proband XI) und wies im Probandenkollektiv (n=11) statistische Signifikanz auf (p = 0.003).
Um eine Vorstimulation der Vollblutkulturen auszuschließen, wurde die IL-4 mRNA Expression jeweils in Ansätzen ohne Anti-CD3/Anti-CD28 mAb Stimulation gemessen (43 ± 17 mittlere IL-4 mRNA Kopienzahl ± SD).

4.1.2. Effekte von Tacrolimus auf weitere Parameter der T-Zell-Aktivierung

Im Folgenden wurde die Wirkung von Tacrolimus (25 ng/ml) auf weitere Parameter der T-Zell-Aktivierung, wie IL-2 und IL-4 Proteinsekretion, die Expression der Oberflächenmarker CD25 und CD69 und die T-Zell-Proliferation analysiert (Abb. 3).

IL-2 und IL-4 Proteinsekretion

IL-2 und IL-4 Proteinsekretion wurden nach 24 Stunden Stimulation aus Überständen der Vollblutkulturansätze mittels ELISA untersucht. Die IL-2 Proteinsekretion war nach 24 Stunden Stimulation unter Zugabe von Tacrolimus bei allen untersuchten Probanden gegenüber der Tacrolimus-freien Kontrolle erniedrigt. Sie betrug in den Kontrollen im Mittel 288 ± 263 pg/ml, unter Tacrolimus 158 ± 163 pg/ml (Mittelwert ± SD, p = 0.003, n=11) (Abb. 3a). Die IL-4 Proteinsekretion betrug nach 24 Stunden Stimulation in den Kontrollen im Mittel 9 pg/ml ± 6 pg/ml (Mittelwert ± SD, n=11), unter Tacrolimus war die IL-4 Proteinsekretion nicht mehr nachweisbar.

Expression der Aktivierungsmarker CD25/CD69

Die Expression von Aktivierungsmarkern (CD25/CD69) auf der Oberfläche von T-Lymphozyten (Aktivierungsmarkerexpression in % $CD4^+$ T-Zellen, die CD25 oder CD69 auf ihrer Oberfläche exprimieren) wurde nach 24 Stunden Stimulation mittels Durchflusszytometrie analysiert.
Die CD25 Expression war im Vergleich zu den wirkstofffreien Kontrollen bei allen Probanden unter Tacrolimus reduziert (48.6 ± 9.6 % vs. 41.9 ± 9.7 % Mittelwert ± SD, p = 0.01, n=11). Auch die Expression von CD69 war bei allen Probanden

vermindert (41.4 ± 10.5 % vs. 31.9 ± 11.9 %, Mittelwert ± SD, p= 0.003, n=11) (Abb. 3 b).

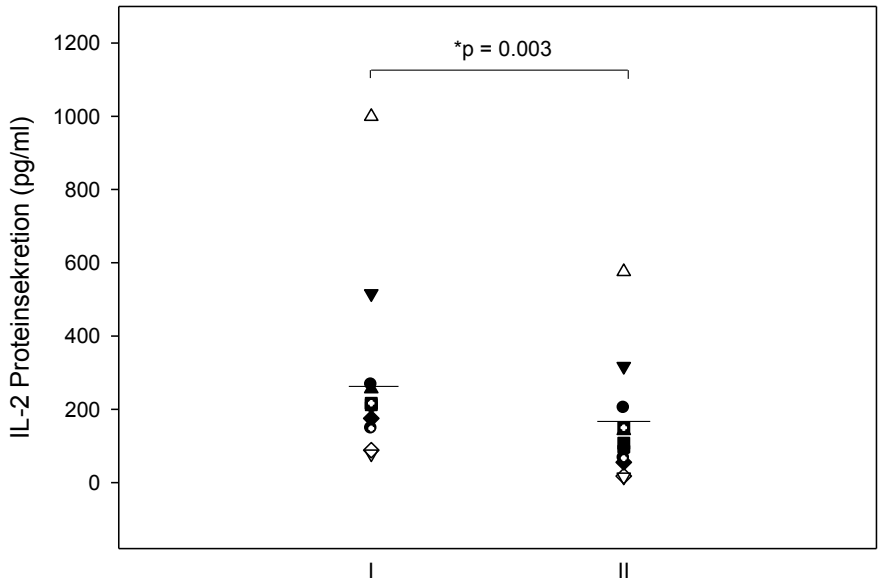
T-Zell-Proliferation

Die T-Zell-Proliferation ($CD4^+$ und $CD4^-$ Zellen) wurde nach 72 Stunden Stimulation mittels UVID (in % der Bromodeoxyuridin-inkorporierenden Zellen in der S-Phase) gemessen.

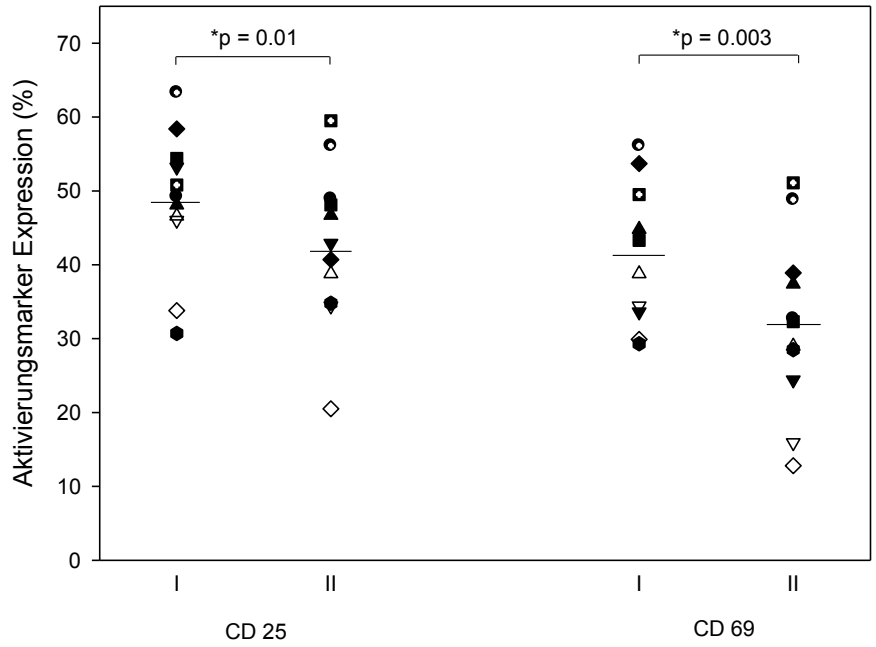
Die Proliferationsrate $CD4^+$ Zellen betrug in den Kontrollen im Mittel 53 ± 5.3 %, sie war unter Tacrolimus bei allen Probanden reduziert (38.2 ± 5 % Mittelwert ± SD, p = 0.003, n=11) (Abb.3 c). Die Proliferationsrate $CD4^-$ Zellen war im Vergleich zu den Kontrollen unter Tacrolimus ebenfalls bei allen Probanden herabgesetzt (36 ± 6.9 % vs. 18.7 ± 6 % Mittelwert ± SD, p = 0.003, n=11) (Abb. 3c).

Im Unterschied zur IL-2 mRNA Expression zeigte Tacrolimus bei einer Konzentration von 25 ng/ml bei allen Probanden *in vitro* einen gleichsinnigen Effekt, und führte zu einer Reduktion der IL-2 Proteinsekretion, der Expression der Oberflächenmarker (CD25 und CD69) sowie der Proliferationsrate von $CD4^+$ und $CD4^-$ T-Zellen.

a)



b)



c)

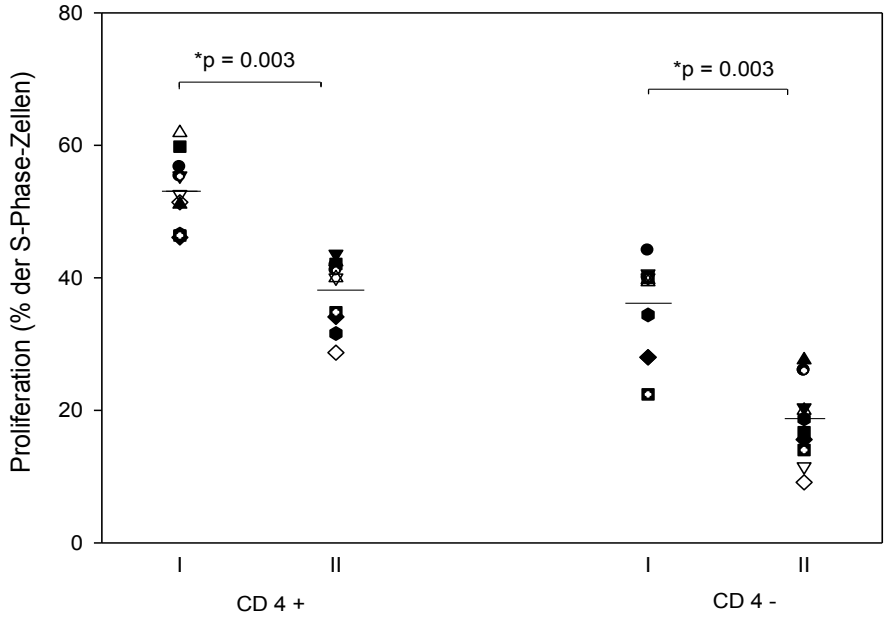


Abbildung 3: Effekte von Tacrolimus auf weitere Parameter der T-Zell-Aktivierung

Vollblutkulturen von 11 Probanden wurden 24 Stunden (IL-2 Protein Sekretion, CD25/CD69 Expression auf der Oberfläche CD4+ Zellen) bzw. 72 Stunden (Proliferation CD4+ und CD4- T-Zellen) mit 1 µg/ml Anti-CD3/Anti-CD28 mAb stimuliert. Dargestellt sind die Ergebnisse der Tacrolimus freien Kontrolle (I), sowie die Ergebnisse unter Zugabe von 25 ng/ml Tacrolimus (II). a) IL-2 Proteinsekretion in pg/ml, b) Aktivierungsmarkerexpression in Prozent der CD4+ T-Zellen, die CD25 oder CD69 auf ihrer Oberfläche exprimieren, c) T-Zell-Proliferation in Prozent der CD4 +/CD4- S-Phase-Zellen (BrdU inkorporierende Zellen). Jedes Symbol steht für die experimentellen Daten eines individuellen Probanden, — markiert die Mittelwerte. $p<0.05$ wurde als signifikant angesehen.

4.1.3. Kinetik der Anti-CD3/Anti-CD28-mAb- induzierten Zytokin mRNA-Expression bei unterschiedlichen Tacrolimuskonzentrationen

Aufgrund der unterschiedlichen Effekte von Tacrolimus auf die Zytokin mRNA Expression nach 24 Stunden Stimulation mit Anti-CD3/Anti-CD28 bei einer Tacrolimuskonzentration von 25 ng/ml wurde in weiteren Untersuchungen der Einfluss der Stimulationsdauer und die Auswirkung unterschiedlicher Tacrolimus-konzentrationen auf die Zytokin mRNA analysiert (Abb. 4).

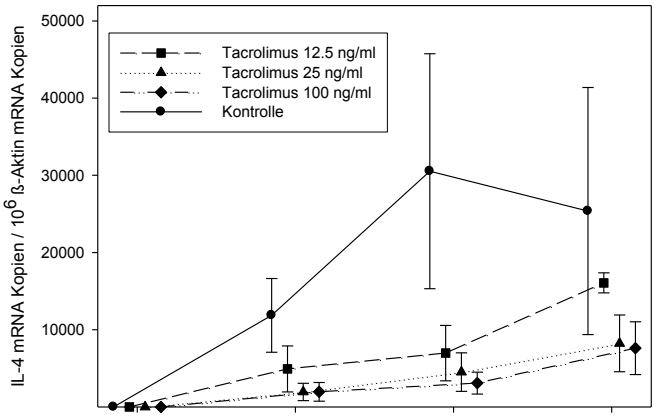
Die IL-2, IL-4 und TNF-α mRNA Expression wurde nach 4, 8 und 24 Stunden Stimulation mit Anti-CD3/Anti-CD28 mAb bei 4 Probanden gemessen. Um den klinisch relevanten Bereich zu erfassen, wurden die Expressionskinetiken mit Tacrolimuskonzentrationen von 0 (Kontrolle), 12.5, 25 und 100 ng/ml erstellt.

In den Kontrollen erreichte die IL-4 mRNA Expression nach 8 Stunden Stimulation ihr Expressionsmaximum. Unter Tacrolimus zeigte sich für die IL-4 mRNA Expression zu allen Messzeitpunkten (4, 8 und 24 Stunden) eine Suppression, die nach 4, 8 und 24 Stunden Costimulation dosisabhängig war (Abb. 5a). Die höchsten Kopienzahlen wurden unter Tacrolimus für die IL-4 mRNA Expression nach 24 Stunden Costimulation gemessen (Abb. 4a).

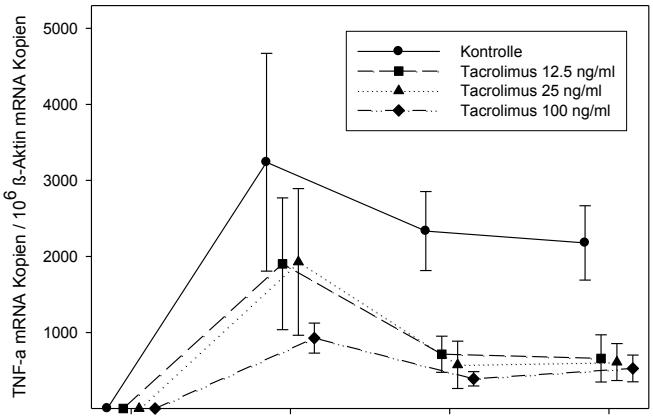
Für TNF-α wurden die höchsten Kopienzahlen in den Kontrollen nach 4 Stunden gemessen. Unter Tacrolimus zeigte sich für die TNF-α mRNA Expression zu allen Messzeitpunkten (4, 8 und 24 Stunden) eine Suppression, die nach 8 und 24 Stunden Costimulation dosisabhängig war (Abb. 5b). Die höchsten Kopienzahlen wurden unter Tacrolimus für die TNF-α nach 4 Stunden Costimulation gemessen (Abb. 4b).

Die IL-2 mRNA Expression zeigte in den Kontrollen nach 4 Stunden ihre niedrigsten Werte. Maximale Kopienzahlen wurden in den Kontrollen nach 8 Stunden erreicht, die nach 24 Stunden wieder abfielen. Unter Tacrolimus fand sich nach 4 und 8 Stunden Stimulation eine dosisabhängige Suppression. Nach 24 Stunden ließ sich eine gleichsinnige Wirkung von Tacrolimus, d.h. eine dosisabhängige Suppression nicht mehr bei allen Probanden nachweisen (Abb. 5c). Die IL-2 mRNA Expression lag nach 24 Stunden Costimulation über den Kontrollen mit Expressionsmaxima bis zu 140 % (Abb. 4c). Der Zeitpunkt, an dem die IL-2 mRNA Expression maximale Kopienzahlen erreichte, verschob sich unter Tacrolimus im Vergleich zu den Kontrollen von 8 auf 24 Stunden Stimulationsdauer.

a)



b)



c)

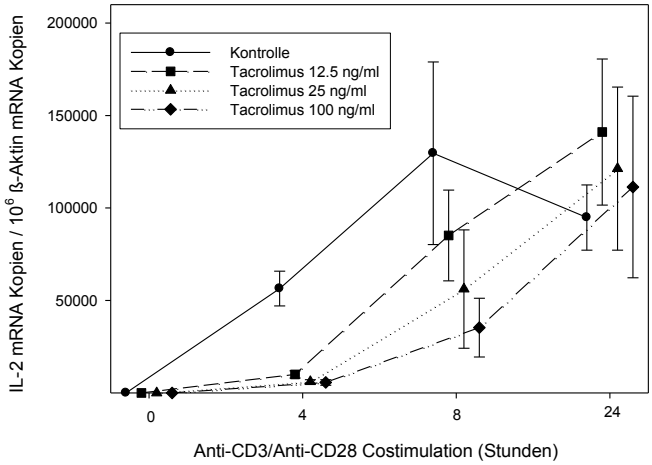


Abbildung 4: Einfluss von Tacrolimus auf Zytokin mRNA Expressionskinetiken unter Anti-CD3/Anti-CD28 Costimulation

IL-4, TNF-α und IL-2 mRNA Expression (Kopienzahl/10^6 β-Aktin mRNA-Kopien) 4 gesunder Probanden nach 4, 8 und 24 Stunden Stimulation mit Anti-CD3/Anti-CD28 mAb, ohne (Kontrolle) sowie unter *in vitro* Zugabe von Tacrolimus (12.5, 25, 100 ng/ml). Mittelwerte ± Standardabweichung (SD, n=4), p-Werte < 0.05 wurden als signifikant angesehen.

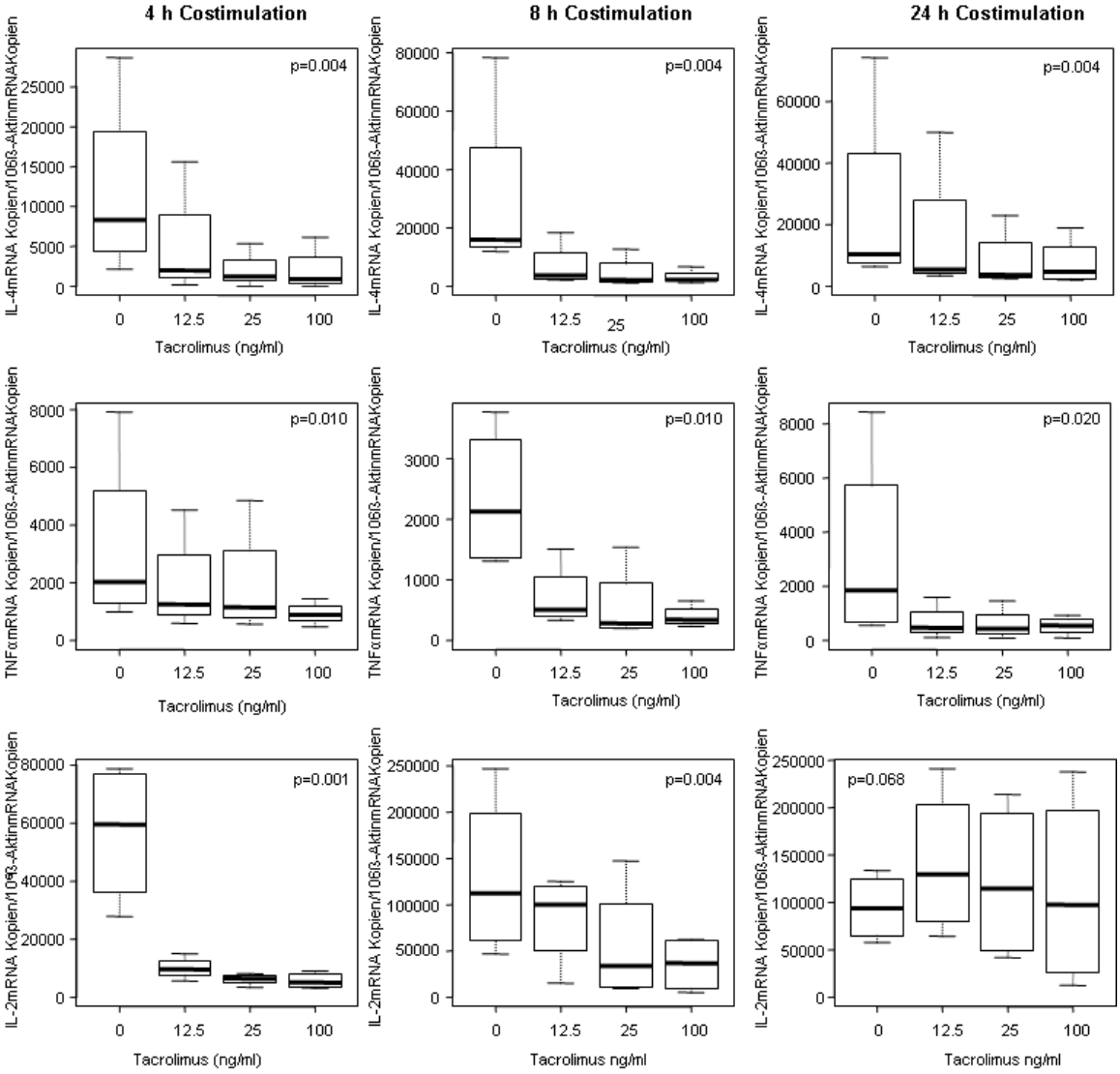


Abbildung 5: Dosisabhängige Suppression der Zytokin mRNA-Expression unter Anti-CD3/Anti-CD28 Costimulation

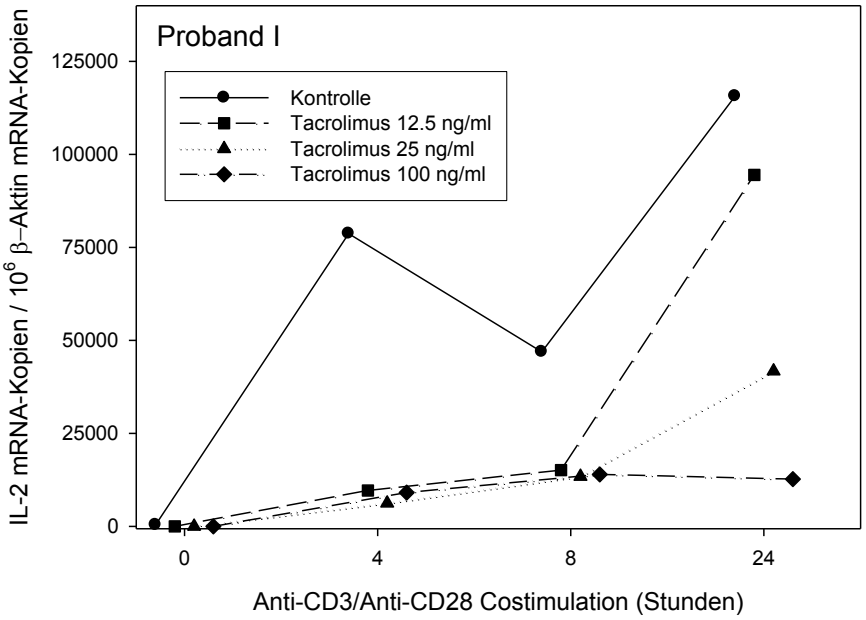
IL-4, TNF-α und IL-2 mRNA Expression 4 gesunder Probanden nach 4, 8 und 24 Stunden Costimulation mit Anti-CD3/Anti-CD28 mAb unter *in vitro* Zugabe von Tacrolimus (12.5, 25, 100 ng/ml). Die area under the curve (AUC) wurde jeweils für jeden Probanden und jede Tacrolimusdosis berechnet und auf die AUC der Kontrollen ohne Tacrolimus normalisiert. Die resultierenden Werte sind hier als Boxplots dargestellt, p-Werte<0.05 wurden als signifikant angesehen.

Unter Tacrolimus konnte somit für die IL-2 mRNA Expression eine Verschiebung der Expressionskinetiken beobachtet werden.

Die Analyse der Einzelverläufe der IL-2 mRNA Expressionskinetiken ergab nach 24 Stunden Anti-CD3/Anti-CD-28 Costimulation entgegengesetzte Effekte von Tacrolimus, die sich, bezogen auf die Kontrolle, individuell entweder in einer

Reduktion (Abb. 6) oder in einem Anstieg (Abb. 6) der IL-2 mRNA Expression manifestierten.

a)



b)

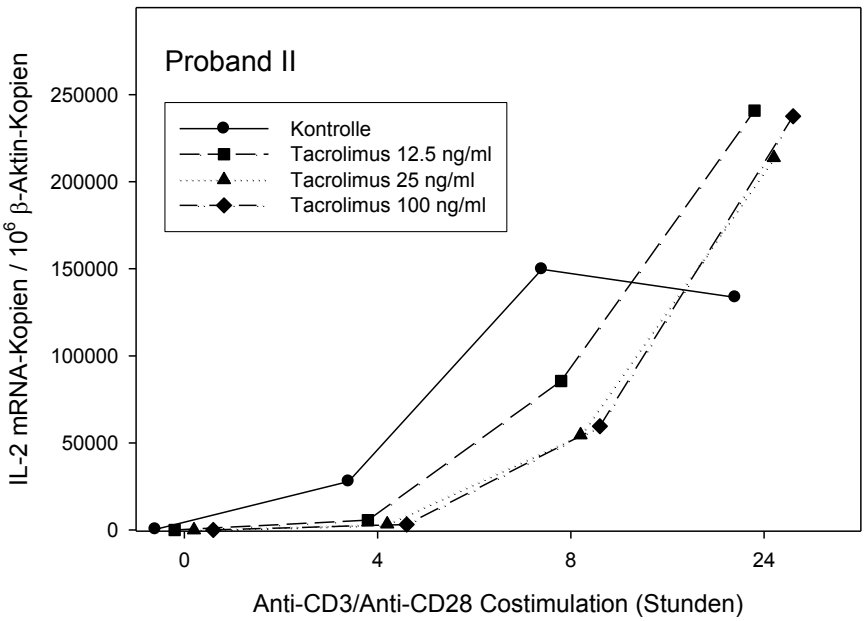


Abbildung 6: Individuelle IL-2 mRNA Expressionskinetiken bei unterschiedlicher Tacrolimussensitivität

Kinetischer Verlauf der IL-2 mRNA Expression (Kopien/10^6 β-Aktin mRNA-Kopien) der Probanden I und II nach 0, 4, 8 und 24 Stunden Anti-CD3/Anti-CD 28 Costimulation ohne (Kontrolle) und nach *in vitro* Zugabe von Tacrolimus (0, 12.5, 25, 100 ng/ml). Einzelverläufe zweier Probanden mit unterschiedlicher Tacrolimussensitivität hinsichtlich einer Suppression a) bzw. eines Anstiegs b) der IL-2 mRNA Expression nach 24 Stunden Stimulation.

4.1.4. Einfluss der Tacrolimuskonzentration auf die Zytokin Proteinsekretion

IL-2 und IL-4 Proteinsekretion wurden mit Tacrolimuskonzentrationen von 12.5, 25 und 100 ng/ml nach 24 Stunden Costimulation bei 8 gesunden Probanden quantitativ bestimmt. Die IL-2 Proteinsekretion war unter Tacrolimus bei 12.5, 25 und 100 ng/ml supprimiert. Die Reduktion war im Vergleich zur wirkstofffreien Kontrolle bei 25 ng/ml ($p < 0.001$, $n=8$) und 100 ng/ml ($p<0.001$, $n=8$) signifikant (Abb. 7).

Die IL-4 Proteinsekretion betrug in der Kontrolle 10 ± 3 pg/ml (Mittelwert ± SD). Unter Tacrolimus lag die IL-4 Proteinsekretion bei allen Konzentrationen unterhalb der Nachweisgrenze.

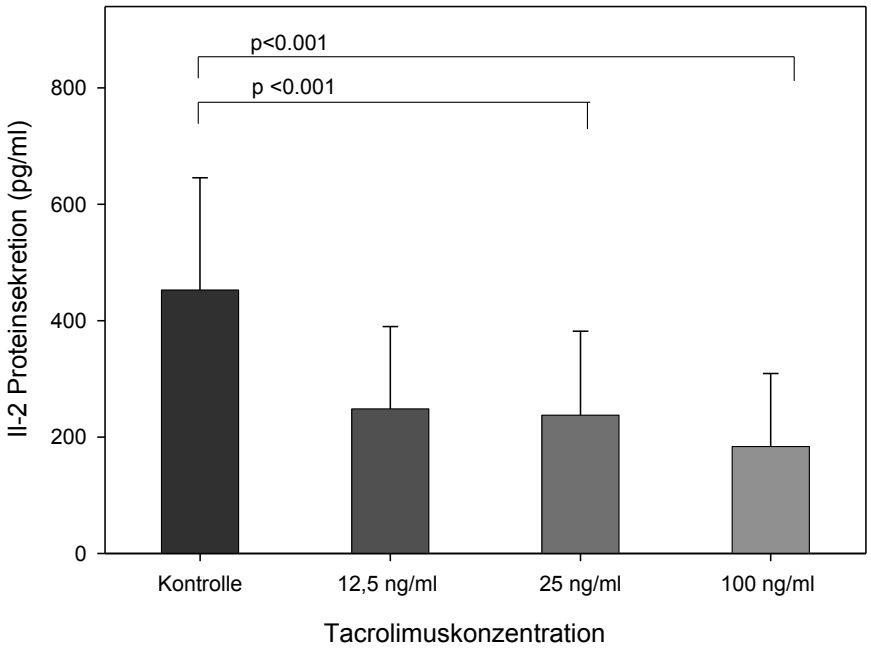


Abbildung 7: Dosisabhängige Effekte von Tacrolimus auf die IL-2 Proteinsekretion

IL-2 Proteinsekretion in Abhängigkeit von steigenden Tacrolimus Konzentrationen (12.5, 25 und 100 ng/ml) nach 24 Stunden Costimulation mit Anti-CD3/Anti-CD28 mAb. Mittelwerte ± Standardabweichungen (SD) der IL-2 Proteinsekretion in pg/ml, n=8. p-Werte < 0.05 wurde als statistisch signifikant angesehen.

4.1.5. Zytokin mRNA-Expressionskinetiken nach Anti-CD3 mAb Stimulation unter Zugabe unterschiedlicher Tacrolimuskonzentrationen

Im folgenden Versuch sollte der Effekt von Tacrolimus auf die Zytokin mRNA Expression unter alleiniger Stimulation mit Anti-CD3 mAb untersucht werden und

mit Zytokin mRNA Expressionskinetiken nach Anti-CD3/Anti-CD28 mAb Costimulation verglichen werden.

Dies erfolgte anhand von Kinetiken nach 0, 4, 8 und 24 Stunden Anti-CD3 Stimulation unter Zugabe von Tacrolimus (12.5 ng/ml, 25 ng/ml und 100 ng/ml) bei 4 der bereits untersuchten Probanden (Abb. 8).

Im Vergleich zu einer Costimulation mit Anti-CD3/Anti-CD28 mAb, zeigte eine alleinige Stimulation mit Anti-CD3 mAb eine deutlich verminderte de-novo Synthese der Zytokin mRNA-Expression nach 4 Stunden Stimulation sowie 24 Stunden Stimulation, weniger deutlich waren die Unterschiede in der Zytokin mRNA Expression nach 8 Stunden Stimulation (Tabelle 8).

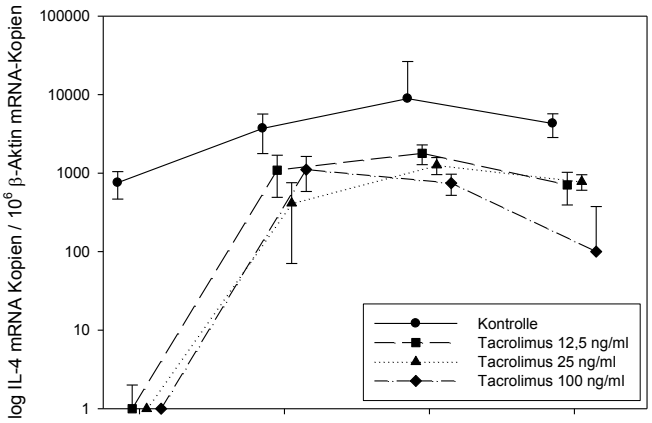
Zu allen Messzeitpunkten der Anti-CD3 Stimulation zeigte die IL-4 sowie TNF-α mRNA Expression unter Zugabe unterschiedlicher Tacrolimuskonzentrationen eine dosisabhängige Suppression im Vergleich zur wirstofffreien Kontrolle. Auch die IL-2 mRNA Expression war bei alleiniger Stimulation mit Anti-CD3 mAb zu allen Messzeitpunkten unter Tacrolimuszugabe supprimiert.

Tabelle 8: Zytokin mRNA Expression nach Stimulation mit Anti-CD3 und Anti-CD3/Anti-CD28 mAb

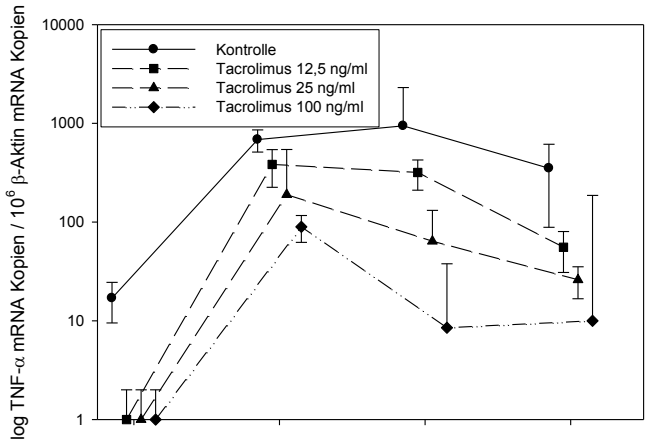
Stimulation	**Stimulationsdauer (Stunden)**		
	4	**8**	**24**
IL-2 mRNA Expression/ 10^6 β-Aktin mRNA-Kopien			
Anti-CD3 mAb	13627 ± 3767	87108 ± 51320	8698 ± 9701
Anti-CD3/CD28 mAb	56427 ± 24502	129599 ± 89372	94847 ± 35647
IL-4 mRNA Expression/ 10^6 β-Aktin mRNA-Kopien			
Anti-CD3 mAb	4308 ± 3885	24270 ± 3142	4419 ± 2861
Anti-CD3/CD28 mAb	11860 ± 11673	30534 ± 31946	25379 ± 32693
TNF-α mRNA Expression			
Anti-CD3 mAb	680 ± 346	2140 ± 2726	465 ± 524
Anti-CD3/CD28 mAb	3240 ± 3177	2335 ± 1187	3179 ± 3674

Mittlere Zytokin mRNA-Kopienzahlen ± SD nach 4, 8 und 24 Stunden Costimulation mit Anti-CD3/Anti-CD28 mAb, sowie nach alleiniger Stimulation mit Anti-CD3 mAb, n=4.

a)



b)



c)

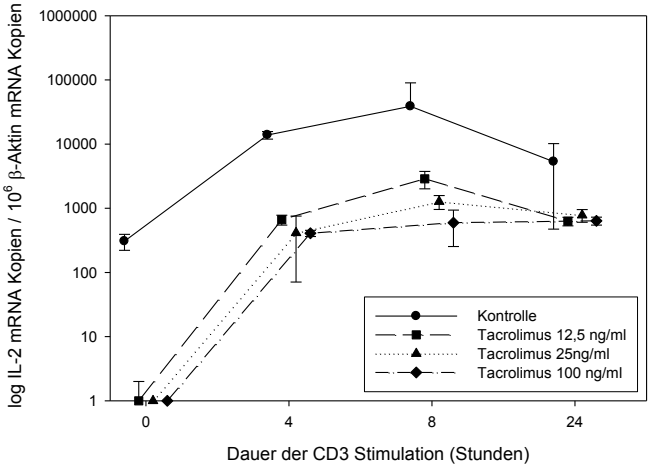


Abbildung 8: Einfluss unterschiedlicher Tacrolimuskonzentrationen auf Zytokin mRNA Expressionskinetiken unter Anti-CD3 mAb Stimulation

IL-4, TNF-α sowie IL-2 mRNA Expression (Kopien/10^6 β-Aktin mRNA-Kopien) nach 0, 4, 8, 24 Stunden Stimulation mit Anti-CD3 mAb unter Zugabe von 0, 12.5, 25 sowie 100 ng/ml Tacrolimus. Logarithmisch dargestellt sind die Mittelwerte ± Standardabweichung (SD, n=4).

4.1.6. Einfluss von Tacrolimus und Cyclosporin A auf die IL-2 mRNA Expression im Vergleich

In vitro zeigte sich bei einer Tacrolimuskonzentration von 25 ng/ml und 24 Stunden Costimulation bei 11 gesunden Probanden eine individuell unterschiedliche Wirksamkeit von Tacrolimus auf die IL-2 mRNA Expression (4.1.1). Bei diesen Probanden wurde unter gleichen Bedingungen (24 Stunden Stimulation mit Anti-CD3/Anti-CD28 mAb) die IL-2 mRNA Expression nach Inkubation mit CsA (1000 ng/ml) gemessen. CsA, wie Tacrolimus ein Calcineurin-Inhibitor, wird therapeutisch alternativ zu Tacrolimus eingesetzt.

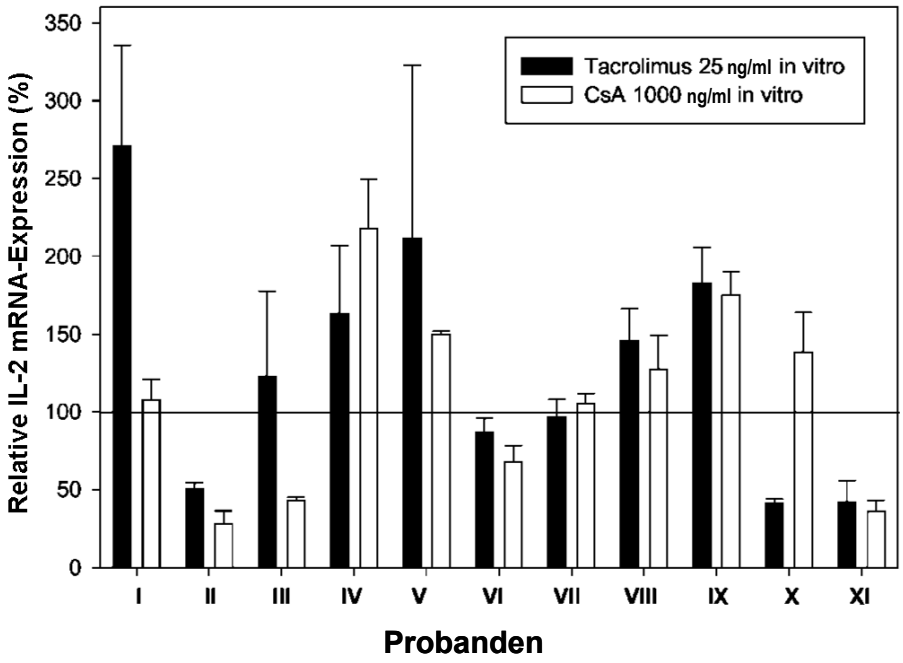


Abbildung 9: Vergleich der IL-2 mRNA Expression gesunder Probanden unter Zugabe von Tacrolimus bzw. CsA

Relative Veränderung der IL-2 mRNA Expression [%] von 11 Probanden (I-XI) nach 24 Stunden Anti-CD3/Anti-CD28 Costimulation unter Zugabe von Tacrolimus ■ (25 ng/ml) bzw. CsA □ (1000ng/ml) bezogen auf die wirkstofffreien Kontrollen (hier mit 100% dargestellt). Mittelwerte ± Standardabweichungen (SD).

Der Vergleich der experimentellen Daten beider Untersuchungen zeigte bei 9 der 11 Probanden eine gleichsinnige Veränderung der IL-2mRNA Expression unter Tacrolimus und unter CsA-Zugabe. Bei einem Probanden (Proband III) war die IL-2 mRNA Expression unter CsA supprimiert, unter Tacrolimus jedoch erhöht. Umgekehrt war die IL-2 mRNA Expression bei einem Probanden (Proband X) unter Tacrolimus-Zugabe erniedrigt, während sie unter CsA erhöht war (Abb. 9).

4.2. *Ex-Vivo-* Studie

Nach Identifizierung individuell unterschiedlicher Tacrolimussensitivität gesunder Probanden *in vitro*, wurde in der *ex vivo* Untersuchung der Einfluss von Tacrolimus bei Patienten unter Tacrolimusmonotherapie untersucht. Effekte von Tacrolimus wurden durch die quantitative Bestimmung der IL-2 mRNA Expression gemessen. Die Untersuchung wurde bei 4 Patienten (Tabelle 7) unter Tacrolimusmonotherapie vor Transplantation einer Lebendniere durchgeführt.

4.2.1. Effekte von Tacrolimus auf die IL-2 Expression bei Patienten unter Tacrolimusmonotherapie

Um die Wirkung von Tacrolimus auf die IL-2 mRNA Expression zu untersuchen, wurde die erste Blutentnahme vor Tacrolimuserstgabe durchgeführt. Diese Proben wurden ohne Tacrolimus (Kontrolle) und unter *in vitro* Zugabe von Tacrolimus (25 ng/ml) untersucht. Für die *ex vivo* Untersuchung wurde die erste Blutentnahme nach 96 Stunden Tacrolimusmonotherapie vor der morgendlichen Tacrolimuseinnahme (Talspiegel= 0h n.E.) durchgeführt. Weitere Proben wurden 2 und 4 Stunden nach Einnahme (2h n.E und 4h n.E.) entnommen. Die anschließende Stimulation erfolgte mit Anti-CD3/Anti-CD28 mAb für 4 und 24 Stunden (Abb. 10).

In vitro Untersuchung der Blutproben vor erstmaliger Einnahme von Tacrolimus

In vitro zeigte sich bei allen Patienten nach 4 Stunden Costimulation eine Suppression der IL-2 mRNA Expression (> 50% Suppression) gegenüber den Tacrolimus-freien Kontrollen. Nach 24 Stunden Stimulation konnte bei Patient I und IV unter *in vitro* Zugabe von Tacrolimus eine deutliche Suppression nachgewiesen werden (Suppression um 51.6 % bei Patient I und 47.0 % bei Patient IV). Patient II und III zeigten *in vitro* nach 24 Stunden Stimulation eine vergleichsweise geringe Reduktion der IL-2 mRNA Kopienzahl (Suppression um 7.0 % bei Patient II und 24.4 % bei Patient III).

Ex vivo Untersuchung nach 96 Stunden Tacrolimusmonotherapie

Patient I und IV zeigten nach 4 und 24 Stunden Stimulation nicht nur *in vitro* sondern auch *ex vivo* zu allen Messzeitpunkten eine Suppression der IL-2 mRNA Expression. Bei Patient III ließ sich nach 4 Stunden Stimulation *ex vivo* kein suppressiver Effekt mehr nachweisen, wohl aber *in vitro*. Nach 24 Stunden Stimulation war die IL-2 mRNA Expression *ex* vivo zu allen Messzeitpunkten supprimiert. Bei Patient II, bei dem nach Transplantation eine akute Abstoßungsreaktion auftrat, konnte *ex vivo* und *in vitro* nach 24 Stunden

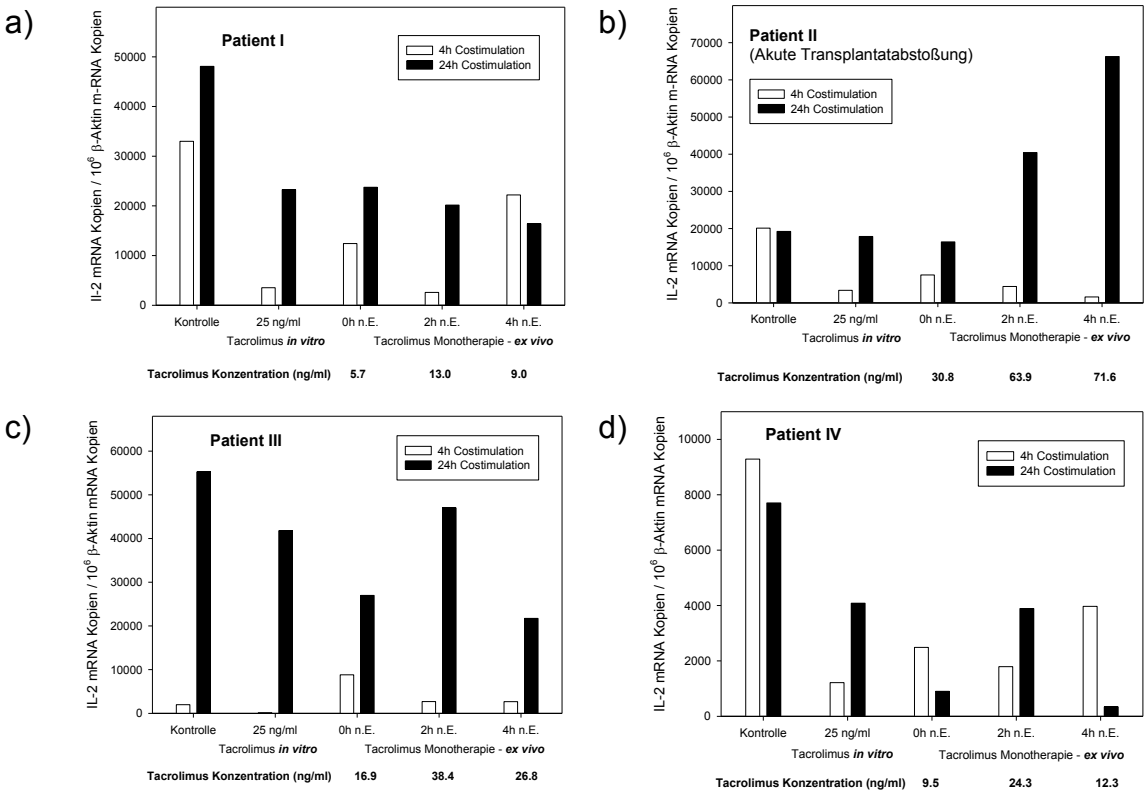


Abbildung 10: *Ex-vivo* Studie: Effekte von Tacrolimus auf die Anti-CD3/Anti-CD28 induzierten IL-2 Expressionskinetiken von Patienten unter Tacrolimus Monotherapie

IL-2 mRNA Expression in Vollblutproben von Patienten (I-IV, a-d) nach 4 (□) und 24 (■) Stunden Costimulation mit Anti-CD3/Anti-CD28 mAb. Analysen erfolgten zu folgenden Zeitpunkten: vor erstmaliger Tacrolimus-Einnahme (Kontrolle) sowie unter *in vitro* Zugabe von Tacrolimus (25 ng/ml). Nach 96 Stunden oraler Tacrolimusmonotherapie (*ex vivo*) zu den Zeitpunkten: 0 (0 h n. E.), 2 (2 h n. E.) und 4 (4 h n. E.) nach Tacrolimuseinnahme. Dargestellt sind die IL-2 Expression (Kopien/10^6 β-Aktin mRNA-Kopien) und die Tacrolimuskonzentration (ng/ml) gemessen im Blut der Patienten (I-IV) zum jeweiligen Abnahmezeitpunkt.

Stimulation zu allen Messzeitpunkten kein suppressiver Effekt mehr nachgewiesen werden. In der *ex vivo* Untersuchung war die IL-2 mRNA Expression nach 24 Stunden Costimulation, 2 und 4 Stunden nach Medikamenteneinnahme gegenüber der Kontrolle sogar erhöht. Nach 4 Stunden Stimulation war die IL-2 mRNA Kopienzahl *in vitro* und *ex vivo* reduziert.

Ein Zusammenhang zwischen IL-2 mRNA Expression und der Tacrolimuskonzentration im Blut der Patienten unter Tacrolimustherapie ließ sich nicht feststellen.

5. Diskussion

Abstoßungsreaktionen und Nebenwirkungen immunsuppressiver Pharmakotherapie stellen ein häufiges Problem nach Organtransplantationen dar [Kahan et al., 2002, Sindhi et al., 2003, Naesens et al., 2009]. Trotz Einstellung der immunsuppressiven Therapie in den therapeutischen Bereich, werden Abstoßungsreaktionen und der vorzeitige Verlust des Transplantats beobachtet. Eine einzige akute Abstoßungsreaktion in den ersten 6 Monaten nach Transplantation kann das Langzeittransplantatüberleben gefährden [Wu et al., 2009]. Die Unterdrückung einer akuten Abstoßungsreaktion stellt eine wichtige Maßnahme gegen die Entwicklung einer chronischen Abstoßungsreaktion dar [Matas, 1998]. Chronische Abstoßungsreaktionen gehören zu den Hauptursachen für eine begrenzte Langzeitüberlebensrate transplantierter Organe [Basadonna et al., 1993]. Auch haben Nebenwirkungen einer immunsuppressiven Therapie einen wichtigen Einfluß auf den Erfolg einer Transplantation. Ein Teil der Patienten ist zwar ausreichend immunsupprimiert oder gar überdosiert, leidet jedoch an den Nebenwirkungen der immunsuppressiven Pharmakotherapie wie opportunistischen Infektionen, Nephrotoxizität und erhöhter Tumorinzidenz [Magee und Pascual, 2004]. Die Einstellung der immunsuppressiven Therapie erfolgt derzeit anhand des Körpergewichtes des jeweiligen Patienten.

Zur Überwachung der Therapie dient vornehmlich die Bestimmung des Blutspiegels des jeweiligen Medikamentes. Eine individuelle und somit optimale Immuntherapie für den einzelnen Patienten kann anhand der Standardtherapie mit einem Immunsuppressivum wie dem Calcineurin-Inhibitor Tacrolimus allerdings nicht gewährleistet werden. Durch Messung der Blutspiegel können die Wechselwirkungen zwischen Organismus und Pharmakon (Pharmakokinetik) nur begrenzt beurteilt werden, diese ist jedoch nicht alleine für die pharmakologische Wirkung ausschlaggebend [Dambrin et al., 2000, Oellerich et al., 2006]. Es könnte deshalb von großer Bedeutung sein, den funktionellen Effekt immunsuppressiver Pharmaka (Pharmakodynamik) zu charakterisieren um anhand der pharmakodynamischen Wirksamkeit individuelle Ansprechraten auf Immunsuppressiva zu identifizieren. Die Untersuchung der individuellen pharmakodynamischen Wirksamkeit von Tacrolimus hat das Potential, bislang übliche

Bestimmungen der Pharmakokinetik zu ergänzen und somit eine verbesserte Steuerung der immunsuppressiven Therapie zu ermöglichen.

Prinzipiell gibt es zwei Möglichkeiten des pharmakodynamischen Monitoring, einerseits besteht die Möglichkeit die Funktion des Zielenzyms zu prüfen. Hierbei könnte z.B. das Ausmaß der Dephosphorylierung phosphorylierter Peptide durch Calcineurin für die Wirksamkeit der Calcineurininhibitoren CsA oder Tacrolimus herangezogen werden [Jørgensen et al., 2003]. Ein Nachteil der Messung der Aktivität des Zielenzyms scheint jedoch der fehlende Nachweis auf einen möglichen, weiteren Einfluß auf die Immunantwort zu sein, sie ist lediglich ein indirektes Maß der Immunfunktion.
Eine weitere Möglichkeit des pharmakodynamischen Monitoring besteht in der molekularbiologischen Immunfunktionsdiagnostik [Van Rossum et al., 2010].
Um die pharmakodynamische Wirksamkeit von Tacrolimus unter möglichst *in vivo* nahen Bedingungen zu untersuchen, wurde ein Vollblutstimulationstest etabliert, in dem alle Faktoren, die für eine T-Zell-Aktivierung von Bedeutung sind, in physiologischer Konzentration vorhanden sind [Kirchner et al., 1982]. Vollblut scheint ein geeignetes Medium, in dem der *in vivo* Effekt von Immunsuppressiva wie Tacrolimus quantifiziert werden kann [Härtel et al., 1999, Klupp et al., 2001], da im Gegensatz zur Kultur von mononukleären Zellen des peripheren Blutes (PBMC) eine Separation von T-Zellen aus ihrer natürlichen Umgebung und damit eine möglichen Vorstimulation entfällt [Härtel et al., 2001]. In unterschiedlichen Studien wurden Verfahren zur Herstellung von Lymphozytenkulturen verwendet [Tocci et al., 1989, Sakuma et al., 2000, Magee et al., 2004]. Diese könnten jedoch eine Depletion intrazellulärer Tacrolimuskonzentrationen und somit eine veränderte Konzentration und Wirksamkeit in den Lymphozyten sowie eine unspezifische Aktivierung zur Folge haben. Dazu kommt, dass Tacrolimus auf eine Proteinmatrix im peripheren Blut angewiesen ist. Erythrozyten stellen hierfür ein wichtiges Reservoir außerhalb der Lymphozyten dar. Eine weitere Studie konnte zeigen, dass die immunsuppressiven Effekte des Calcineurin-Inhibitors CsA schnell reversibel sind und die Ergebnisse aus Vollblutkulturen und die aus PBMC- oder isolierten Lymphozyten-Kulturen kaum miteinander vergleichbar sind [De Groote et al., 1992, Batiuk et al., 1995, Ahmed et al., 2001].

In Studien werden oft Mitogene zur Untersuchung der T-Zell-Aktivierung verwendet. Mitogene stimulieren jedoch T-Lymphozyten unter Umgehung des TCR und ohne costimulatorisches Signal, was zu einer unspezifischen T-Zell-Aktivierung führt.
Die von uns verwendete Costimulation mit Anti-CD3/Anti-CD28 mAb ermöglicht eine spezifische Stimulation, da die volle Aktivierung die Beteiligung des TCR/CD3 Komplexes und ein zweites costimulatorisches Signal, induziert durch z. B. B7/CD28 Interaktion, benötigt [Robey und Allison, 1995]. Die CD28 Aktivierung scheint außerdem eine wichtige Rolle in einer Vielzahl immunmodulierter Erkrankungen wie Zöliakie [Popat et al., 2002], Thyreoiditis [Salmaso et al., 2002] und Transplantatabstoßung [Salomon und Bluestone, 2001] zu spielen. Die verwendete Costimulation könnte verschiedene Krankheitsstadien besser reflektieren als die Stimulation mit Mitogenen wie PHA oder LPS. Außerdem könnte das standardisierte Vorgehen bei der Stimulation als Voraussetzung für Longitudinaluntersuchungen des Tacrolimus-Effektes auf einzelne Patienten von Bedeutung sein.
Es existieren widersprüchliche Aussagen über die Tacrolimussensitivität nach Costimulation mit CD28. Verschiedene Autoren berichten von einer generellen Tacrolimus Resistenz der *in vitro* IL-2 Expression in PBMC nach Costimulation des B7/CD28 Aktivierungsweges, sogar nach Zugabe bis zu 100 µg/l Tacrolimus [Kay und Benzie, 1989, Bierer et al., 1991, Lin et al., 1991]. Im Gegensatz dazu berichten Sakuma et al. [2000], dass die IL-2 mRNA Expression nach Anti-CD3/Anti-CD28 Costimulation nach Zugabe niedriger Tacrolimuskonzentrationen (0,12 µg/l) signifikant erniedrigt war.

Die meisten bisherigen Vollbluttests zur Untersuchung der T-Lymphozytenfunktion basieren auf Untersuchungen der T-Zellproliferation, diese ist jedoch nur ein möglicher Parameter der T-Zell-Aktivierung. Untersuchungen, die auf dem Nachweis der Zytokinproduktion basieren, beinhalten oft Messungen auf Proteinebene. Da der Angriffspunkt der meisten Immunsuppressiva jedoch auf Transkriptionsebene der Zytokin-Gene liegt und diese als frühe Aktivierungsmarker von Immunzellen bei der Transplantatabstoßung eine wichtige Rolle spielen, könnte die Quantifizierung der Zytokin mRNA Expression ein geeigneter Parameter zur Bestimmung der pharmakodynamischen Wirksamkeit von Immunsuppressiva sein.

Die von uns verwendete Quantifizierung der Zytokin mRNA mittels RT PCR erlaubt Untersuchungen auf einer frühen Ebene der T-Zell-Aktivierung und ermöglicht schnelle und zuverlässige Messungen ohne lange Inkubationszeiten im Vergleich z.B. zur Analyse auf Proteinebene mittels ELISA oder Messungen der T-Zell-Proliferation mittels UVID.

In der vorliegenden Arbeit wurde die pharmakodynamische Wirksamkeit von Tacrolimus unter *in vitro* sowie in ersten Voruntersuchungen unter *ex vivo* Bedingungen evaluiert, um anhand unterschiedlicher für den Wirkmechanismus von Tacrolimus relevanter T-Zellfunktionen mögliche individuelle Ansprechraten zu analysieren.

Zunächst wurde der Effekt von Tacrolimus auf Vollblut gesunder Probanden *in vitro* untersucht. Dabei wurden nach 24 h Costimulation von Vollblutkulturen 11 gesunder Blutspender mit Anti-CD3/Anti-CD28 mAb deutliche interindividuelle Unterschiede in der Höhe der IL-2 sowie IL-4 mRNA Expression sichtbar. Auch unter Zugabe von 25 ng/ml Tacrolimus zeigten sich deutliche interindividuelle Unterschiede der absoluten mRNA-Kopienzahlen. Während die IL-4 mRNA Expression nach 24 h unter Tacrolimuszugabe bei allen gesunden Testpersonen deutlich supprimiert war, zeigten nur 3 der 11 Testpersonen eine relevante (>50%) Suppression der IL-2 mRNA Expression. Bei 8 der 11 untersuchten Testpersonen schien die IL-2 mRNA Expression unter Tacrolimuszugabe nach 24 h Costimulation unbeeinflusst oder sogar erhöht zu sein. Anhand der IL-2 mRNA Expressionsmuster haben wir Individuen als solche mit *hoher* (>50% Suppression) sowie *niedriger* (<50% Suppression) Ansprechrate nach 24h Costimulation unter Tacrolimus charakterisiert.

Um den Einfluss von Tacrolimus auf weitere Parameter der T-Zell-Aktivierung zu untersuchen, wurde zusätzlich die IL-2 und IL-4 Proteinsekretion, außerdem die IL-2 Rezeptorexpression (CD25) auf der Zelloberfläche, die Expression des Aktivierungsmarkers CD69 und die Proliferationsrate $CD4^+$ und $CD4^-$ T-Zellen nach Stimulation mit Anti-CD3/Anti-CD28 mAb evaluiert.
CD69 gehört zu den frühen Aktivierungsmarkern und wird auf aktivierten T-Zellen exprimiert [Mardiney et al., 1996]. Posselt et al. konnten 2003 bei

nierentransplantierten Patienten mit einer akuten Abstoßungsreaktion eine erhöhte CD69 Expression auf $CD8^+$ nicht jedoch auf $CD4^+$ T-Zellen nachweisen.

Interessanterweise zeigten alle weiteren von uns untersuchten potentiellen pharmakodynamischen Parameter eine deutliche Suppression durch Tacrolimus *in vitro*. Anhand der IL-2 Proteinsekretion war eine dosisabhängige Suppression durch Tacrolimus sichtbar, hier zeigte sich eine deutliche Diskrepanz zwischen unbeeinflusster oder sogar erhöhter IL-2 mRNA Expression nach 24 h Costimulation und erniedrigter IL-2 Proteinsekretion unter Tacrolimus.
Diese Daten machen deutlich, dass eine nach CD3/CD28 Costimulation durch Tacrolimus unbeeinflusste IL-2 mRNA Expression einiger der von uns untersuchten gesunden Testpersonen (8 von 11), nicht notwendigerweise mit einer von Tacrolimus unbeeinflussten Proteinsekretion, Expression des IL2-Rezeptors auf der Zelloberfläche sowie T-Zellproliferation einhergeht. Eine Akkumulation der IL-2 mRNA bei gleichzeitiger Suppression der T-Zellproliferation könnte aus einer Stabilisierung der IL-2 mRNA nach CD3/CD28 Costimulation resultieren, da der CD28 Aktivierungsweg in erster Linie die Stabilität der mRNA und die posttranskriptionelle Regulation der IL-2 mRNA Expression beeinflusst [June et al., 1989, Lindstein et al., 1989, Ragheb et al., 1999]. Diese Ergebnisse werfen außerdem die Frage auf, ob Calcineurin-Inhibitoren einen Einfluss auf die posttranskriptionelle Modifikation sowie Translation der IL-2 mRNA zum Protein haben könnten. Sie unterstützen außerdem die Daten von Applemann et al. [2000], der eine IL-2 unabhängige Regulation der T-Zellproliferation nach CD3/CD28 Costimulation nicht ausschließt.

Aufgrund der individuell unterschiedlichen Ansprechraten der IL-2 mRNA Expression der einzelnen Testpersonen nach 24 h Costimulation unter Zugabe von Tacrolimus wurde im Anschluss der Einfluss von (a) der Stimulationsbedingungen (alleinige Stimulation mit Anti CD3 mAb versus Costimulation mit Anti CD3/Anti CD28 mAb), (b) der Stimulationsdauer (4 h, 8 h und 24 h) sowie (c) der Tacrolimus Dosis (12.5 ng/ml, 25 ng/ml und 100 ng/ml) auf die IL-2, IL-4, TNF-α mRNA Expression anhand von Expressionskinetiken *in vitro* untersucht.

Unter Costimulation mit Anti-CD3/Anti-CD28 mAb wurden IL-2 sowie IL-4 mRNA Expressionsmaxima nach 8 h gemessen, während bei TNF-α nach alleiniger Stimulation mit CD3 Expressionsmaxima nach 8 h, nach Costimulation mit Anti-CD3/Anti-CD28 mAb jedoch bereits nach 4 h Costimulation nachweisbar waren. Im Vergleich zur alleinigen Stimulation mit CD3 war die Zytokin mRNA Kopienzahl unter CD3/CD28 Costimulation nach 4 und 24 h deutlich erhöht.

Die IL-4 mRNA Expression zeigte zu allen Messzeitpunkten eine dosisabhängige Suppression nach Anti-CD3 und Anti-CD3/Anti-CD28 Costimulation. Im Einklang mit den Daten von Sakuma et al. (2000), der eine potentielle Suppression der TNF-α Expression in Lymphozyten und Monozyten durch Tacrolimus zeigen konnte, wurde in unseren Studien zu allen Zeitpunkten eine dosisabhängige Suppression der TNF-α mRNA Kopienzahlen gemessen. Die IL-2 mRNA Kopienzahl war nach CD3 Stimulation ebenfalls zu allen Messzeitpunkten supprimiert.

Im Gegensatz dazu, ließ sich eine dosisabhängige Suppression der IL-2 mRNA Expression nach CD3/CD28 Costimulation bei Probanden mit *niedriger Ansprechrate* nur nach 4 sowie 8 h Costimulation nachweisen. Bei steigenden Konzentrationen von Tacrolimus *in vitro* kam es zu einer schrittweisen Reduktion der IL-2 mRNA Kopienzahlen nach 4 und 8 h Costimulation. Nach 24 h Costimulation war dieser dosisabhängige Effekt jedoch nicht mehr nachweisbar, die Werte lagen hier über denen der Tacrolimus-freien Kontrollen. Aufgrund der Zytokin mRNA Expression im Vollbluttest konnten wir somit eine generelle Tacrolimus Resistenz, wie sie zuvor postuliert worden war [Galvin et al., 1993, Lin et al., 1997, Anderson et al., 1999, Batten et al., 1999], nicht bestätigen. Im Gegenteil, unsere Daten belegen sogar eine dosisabhängige Suppression in Abhängigkeit von der Stimulationsdauer. Anhand der quantitativen Analyse der IL-2 mRNA Expression war es uns somit möglich, Individuen mit unterschiedlichen Ansprechraten auf Tacrolimus zu identifizieren. Hier zeigte sich, dass während der T-Zell-spezifischen Stimulation jedes Individuum durch ein bestimmtes Zeitintervall charakterisiert ist, in dem der immunsuppressive Effekt erkennbar ist. Die Untersuchung lässt erkennen, dass es irreführend sein könnte, den Tacrolimus Effekt auf die IL-2 mRNA Expression nur in einem bestimmten Zeitpunkt zu untersuchen, viel eher scheint es sinnvoll, die mRNA zu mindestens 2

unterschiedlichen Zeitpunkten innerhalb einer mRNA Kinetik zu bestimmen, um eine Aussage über den Tacrolimus Effekt zu machen.

Tacrolimus und CsA gehören zu der Gruppe der Calcineurin-Inhibitoren. Trotz chemischer Heterogenität, beeinflussen beide über die Hemmung der Phosphatase Calcineurin die Produktion einer Vielzahl von Zytokinen. In klinischen Studien konnte gezeigt werden, dass eine Tacrolimustherapie im Vergleich zu CsA eine verminderte Rate akuter Abstoßungsreaktionen zur Folge hat [Webster et al., 2005]. Es wurde beschrieben, dass akute Abstoßungsreaktionen unter Tacrolimus weniger schwerwiegend sind als solche, die unter CsA auftreten [Pirsch et al., 1997] und eine auf Tacrolimus basierende Therapie zu einem verbesserten Langzeittransplantatüberleben führen kann [Vincenti, 2004]. Bei Eintreten toxischer Nebenwirkungen einer CsA-Therapie [Pratschke et al., 1997] oder beginnender Abstoßungsreaktion [Cantarovich et al., 2005] kann Tacrolimus alternativ eingesetzt werden. Aufgrund der Unterschiede in der Effektivität, wurde in einer weiteren Studie der *in vitro* Effekt von Tacrolimus, dem von CsA der 11 untersuchten gesunden Probanden gegenübergestellt. Bei 9 der 11 untersuchten Probanden war der Einfluss von Tacrolimus auf die IL-2 mRNA Expression gleichsinnig zu CsA. Bei 2 Probanden war eine Suppression der IL-2 mRNA Expression allerdings jeweils ausschließlich bei Tacrolimus bzw. CsA zu beobachten. In einer früheren Studie konnte unsere Arbeitsgruppe zeigen, dass die IL-4 mRNA Expression unter CsA Zugabe *in vitro* nach 24 h unbeeinflusst oder sogar erhöht war [Härtel et al., 2003]. Im Gegensatz dazu, war die IL-4 mRNA Expression unter Tacrolimus supprimiert. Tacrolimus reduziert in klinischen Untersuchungen die Rate akuter Abstoßungsreaktionen nierentransplantierter Patienten, außerdem führt es nicht zu einer Erhöhung von TGF-β im Vergleich zu CsA [Jain et al., 2000, Mohamed et al. 2000], was eventuell einen Einfluss auf die Prävention chronischer Abstoßungsreaktionen haben könnte [Mayer et al., 1997, Pirsch et al., 1997]. Die Unterschiede in der Effektivität zwischen den beiden Calcineurin-Inhibitoren könnten mit Unterschieden in der Hemmung verschiedener Zytokine zusammenhängen [Jiang et al., 2000, Golling et al., 2009]. Unsere Daten deuten an, dass die beiden Calcineurin-Inhibitoren möglicherweise einen unterschiedlichen Einfluß auf die IL-2 mRNA Expression ausüben.

Die Suppression der IL-2 Produktion wird als zentraler Wirkmechanismus von Tacrolimus angesehen [Ho et al., 1996]. Eine fehlende IL-2 Hemmung könnte mit einer erhöhten Wahrscheinlichkeit einer Abstoßungsreaktion assoziiert sein [Yoshimura und Kahan, 1985, Simpson et al., 1991, Koutouby et al., 1993, El-Safa et al., 2006]. Weitere Hinweise für den klinischen Einfluss der IL-2 Produktion konnten Studien durch Blockade des IL-2 Rezeptors liefern, in denen es zu einer verminderten Rate akuter Abstoßungsreaktionen nierentransplantierter Patienten kam [Vincenti et al., 1998]. Folglich könnte die Bewertung der Tacrolimus induzierten IL-2 Expressionsprofile einen relevanten Medikamenteneffekt darstellen, der die Entwicklung eines pharmakodynamischen Parameters zur Untersuchung individueller Ansprechraten auf die Tacrolimustherapie ermöglicht. Die Analyse von IL-2 mRNA Expressionskinetiken könnte zusätzliche Einblicke in den Grad der T-Zell-Aktivierung in individuellen Patienten liefern.

Anhand erster klinischer Untersuchungen sollten mögliche individuelle Ansprechraten auf Tacrolimus bei 4 Empfängern einer Lebendnierenspende identifiziert werden. Neben der Untersuchung von *in vitro* Effekten nach Zugabe von Tacrolimus (25 ng/ml) zu Vollblutkulturen vor Tacrolimus Erstgabe, sollte in einem weiteren Schritt eine mögliche Übertragbarkeit auf *ex vivo* Bedingungen untersucht werden. Zwar kann eine Zugabe von Tacrolimus zu *in vitro* Kulturen wertvolle Hinweise auf eine individuelle Tacrolimus Sensitivität liefern, Aussagen zur *in vivo* Wirksamkeit lassen sich jedoch nur nach Einnahme von Tacrolimus machen. Dazu wurden 4 Empfänger der langfristig planbaren Lebendnieren-spende über einen Zeitraum von 96 Stunden vor Transplantation mit einer Tacrolimus Monotherapie behandelt. Bei diesen Patienten ließen sich dadurch isolierte Tacrolimus Effekte ohne Einflüsse durch weitere Immunsuppressiva untersuchen. Hier zeigten 2 von 4 Patienten eine relevante Hemmung der IL-2 mRNA Expression um mehr als 50% im Vollblut *in vitro* sowie *ex vivo* sowohl nach 4 als auch nach 24 h Costimulation. Bei einem weiteren Patienten konnte nach 4 h Costimulation lediglich eine Suppression der IL-2 mRNA Expression in vitro nicht jedoch ex vivo, nach 24 h Inkubation lediglich eine Suppression ex vivo jedoch nicht in vitro nachgewiesen werden. Ähnlich wie bei der *in vitro* Studie zeigte ein Patient IL-2 mRNA Konzentrationen nach 24 h Costimulation die sowohl 0, 2 als auch 4 h nach Einnahme von Tacrolimus unbeeinflusst oder sogar erhöht

schienen. Bei diesem Patienten kam es nach Transplantation zu einer akuten Abstoßungsreaktion.

Die von uns durchgeführten Untersuchungen zur pharmakodynamischen Wirksamkeit von Tacrolimus zeigen a) interindividuelle Unterschiede der mRNA Expression nach Zugabe von Tacrolimus zu Vollblutkulturen (*in vitro*) und unter Tacrolimus Monotherapie (*ex vivo*) und b) eine Verzögerung der Zytokin mRNA-Expressionskinetiken als möglichen charakteristischen Effekt der immunsuppressiven Wirkung. Demgegenüber steht eine einheitliche Suppression der IL-2 Proteinproduktion, der IL-2 Rezeptorexpression und der T-Zellproliferation ohne individuelle Variabilität.

Es gibt unterschiedliche mögliche Erklärungen für die beschriebenen Ergebnisse. Zum einen wurde der CD3/CD28 Aktivierungsweg in verschiedenen Studien als resistent gegen Tacrolimus beschrieben. Unbeeinflusste oder sogar erhöhte IL-2 mRNA Konzentrationen könnten auf diese Unempfindlichkeit von Tacrolimus oder aber durch einen intrazellulären Verlust der Medikamentenkonzentration zurückzuführen sein. Die klinische Erfahrung spricht jedoch gegen eine generelle Tacrolimus Resistenz, viel mehr für eine individuelle Variabilität. Der immunsuppressive Effekt müsste somit nicht notwendigerweise durch eine reduzierte maximale IL-2 mRNA Konzentration, sondern könnte durch eine individuell veränderte Halbwertszeit der IL-2 mRNA oder aber durch eine verzögerte IL-2 mRNA Expressionskinetik nachweisbar sein.

Zweitens wird das Versagen der Immunsuppression und die anschließende Transplantatabstoßung als multifaktorielles Geschehen betrachtet. Aus diesem Grund sollte die Rolle weiterer Zytokine in diesem Netzwerk in Betracht gezogen werden. In diesem Zusammenhang könnte eine erhöhte IL-2 mRNA Expression durch den Einfluss der Calcineurin-Inhibitoren auf die Expression weiterer negativregulierender Signale wie z.B. IL-10 zu erklären sein [Rafiq et al., 2001]. Eine Suppression von IL-10 könnte eine vermehrte IL-2 mRNA Expression zur Folge haben. Ob der Effekt von Tacrolimus auf die IL-2 sowie IL-10 Expression invers korrelieren, muss allerdings in künftigen Studien geklärt werden. Eine weitere Rolle könnte das Zytokin IL-7 spielen, es könnte die IL-2 mRNA Expression durch eine verbesserte Bindungsaktivität der in die IL-2 Gen Regulation involvierten Transkriptionsfaktoren NF-AT und AP-1 an die IL-2 Promotor Region [Gringhuis et al., 1997] beeinflussen. Die IL-7 Expression ist nach CD3/CD28 Costimulation

erhöht, sie wird jedoch nicht durch den Calcineurin-Inhibitor CsA supprimiert [Motta et al., 1991]. Auch könnten weitere akzessorische Moleküle auf der T-Zelloberfläche, wie das intracellular adhesion molekule-1 (ICAM-1) oder die leukotactic faktor activity-1, die keiner Suppression durch Calcineurin-Inhibitoren unterliegen, die IL-2 mRNA Expression nach CD3/CD28 Costimulation beeinflussen. Ferner haben costimulatorische Moleküle einen Einfluss auf qualitativ unterschiedliche Signalwege z.B. benötigt LFA-1, nicht jedoch CD28, das auf Aktin basierende Zytoskelett für die Stabilisierung der IL-2 mRNA, was eine unbeeinflusste IL-2 mRNA Expression trotz Anwesenheit von Calcineurin-Inhibitoren wie Tacrolimus erklären könnte [Geginat et al., 2000]. Schließlich ist auch eine IL-2 unabhängige Beeinflussung der T-Zellproliferation durch Calcineurin-Inhibitoren nicht auszuschließen.

Die Identifizierung einer individuellen Tacrolimus Wirksamkeit anhand funktioneller pharmakodynamischer Messungen, könnte klinische Relevanz für zukünftige immunsuppressive Strategien haben, die effektiver, sicherer und individueller sein sollten. Neuere Immunsuppressiva, die nicht zur Gruppe der Calcineurin-Inhibitoren gehören, wie z.B. Rapamycin, sind zusätzlich verfügbar oder in klinischer Testung. Eine viel versprechende Alternative könnte aus einer Kombinationstherapie bestehen, wie z.B. Sirolimus und niedrigdosiertes Tacrolimus oder der IL2 Rezeptor-Blocker Daclizumab und niedrigdosiertes Tacrolimus, das ein gutes Transplantatüberleben sowie eine niedrige Rate möglicher Nebenwirkungen zur Verfügung stellt [McAlister et al., 2000, Ekberg et al., 2007, Webster et al., 2010]. Die Fortschritte in der immunsuppressiven Therapie heben die Notwendigkeit fortwährender Untersuchungen für eine bessere Überwachung der pharmakodynamischen Effekte der verwendeten Immunsuppressiva hervor [Burkhart et al., 2004]. Die hier beschriebenen Untersuchungen könnten zur Entwicklung prädiktiver Parameter einer verminderten oder erhöhten Ansprechbarkeit einer immunsuppressiven Therapie beitragen. Dies könnte die Identifikation von Patienten erlauben, deren immunsuppressive Strategien geändert werden müssten oder deren Medikamentenkonzentration ohne Risiko einer erhöhten Transplantatabstoßung erniedrigt werden könnte. Anhand der Daten der untersuchten Patienten, die vor Nierentransplantation eine 5-tägige Tacrolimus Monotherapie erhielten, ist eine generelle

Tacrolimus Resistenz nach CD3/CD28 Costimulation unwahrscheinlich, viel mehr haben sie gezeigt, dass die pharmakodynamische Untersuchung mehr als einen Parameter für die Bestimmung der Medikamentensensitivität eines individuellen Patienten benötigt [Sindhi et al., 2003]. In der vorliegenden Arbeit sind bisher noch keine weiteren patientenbezogenen Parameter, die einen Einfluss auf die pharmakodynamische Wirksamkeit von Tacrolimus haben könnten, mit berücksichtigt worden. Eine sorgfältige Evaluation zusätzlicher Kriterien wie z.B. (a) der Immunstatus des Patienten vor Einleitung einer immunsuppressiven Therapie, sowie (b) die zugrunde liegende Erkrankung und Zweiterkrankungen, (c) die Begleitmedikation, (d) der Einfluss zusätzlicher Behandlungen wie chirurgische Eingriffe oder Hämodialysebehandlungen [Müller-Steinhardt et al., 2001], (e) Zytokin mRNA Konzentrationen im transplantierten Organ und (f) der funktionelle Einfluss von Genpolymorphismen wie z.B. der IL-6 Promotorpolymorphismus -597,-572,-174 [Müller-Steinhardt et al. 2004, Müller-Steinhardt et al., 2007] sowie Genmutationen [Mourad et al., 2008, Katsakiori et al., 2010], die einen modulatorischen Effekt auf die Immunvorgänge der Transplantation haben könnten [Hoffmann et al., 2001, Müller-Steinhardt et al., 2002], sind notwendig, bevor Schlüsse aus den Untersuchungsdaten wie z.B. einer erhöhten IL-2 mRNA Expression, gezogen werden können.

Zurzeit kann noch kein einzelner Parameter zur Untersuchung des Medikamenteneffektes in der Transplantationstherapie als Messwert für die Medikamentensensitivität dienen [Barten et al., 2007]. Ein möglicher Parameter könnte die quantitative Bestimmung der IL-2 mRNA Expression sein. Hier kann der pharmakodynamische Effekt von Tacrolimus auf die Zytokin mRNA Expression jedoch nur durch die Analyse von Kinetiken erfasst werden. Die isolierte Betrachtung nur eines Zeitpunktes liefert keine zuverlässigen Aussagen, vielmehr scheint der individuelle Verlauf der Expressionskurve über die Zeit entscheidend zu sein. Die quantitative Bestimmung der Zytokin mRNA sollte somit zu mindestens 2 Zeitpunkten z.B. nach 4 und 24 h Costimulation erfolgen. Die daraus gewonnenen Aussagen könnten Kontrolldaten, die durch Schwellenwerte wie den ED50 (Dosis die zu einer Reaktion führt, die 50% der Maximaldosis beträgt) gewonnen werden, potentiell ergänzen. Treten beispielsweise Abstoßungsreaktionen trotz Medikamentenkonzentrationen am oder über dem

ED50 auf, könnten die IL-2 mRNA Kinetiken dies anhand des relativen Nichtansprechens von IL-2 des einzelnen Patienten erklären [Pou et al,. 1998, Sakuma et al., 2000]. Aufgrund unserer ersten klinischen Untersuchungen anhand der Vollblutkulturen vor Medikamenteneinnahme sowie nach Einnahme (2 h und 4 h) scheint die Bestimmung 2 h nach Einnahme. sinnvoll um die Calcineurin-Inhibitor-Sensitivität zu testen. Die ersten Untersuchungen von Lebendnieren-transplantierten zeigten, bei allen Einschränkungen, die man aufgrund der geringen Anzahl untersuchter Patienten machen muss, einen ersten möglichen Anhalt dafür, dass eine Suppression der IL-2 mRNA Expression um mehr als 50% unter *in vitro* als auch *ex vivo* Bedingungen, möglicherweise mit einem günstigeren Verlauf assoziiert sein könnte. Wir fanden in unseren Untersuchungen keinen Zusammenhang zwischen Tacrolimus Blutspiegeln und der Zytokin mRNA Expression. Dies unterstützt bisherige Ergebnisse, die andeuten, dass Blutspiegel nicht notwendigerweise mit der funktionellen Wirksamkeit im einzelnen Patienten korrelieren [Koutouby et al., 1993, Hodge et al., 2005].

Trotz des vielversprechenden Potentials ist die Aussagekraft unserer Studien dadurch limitiert, dass *in-vitro* und *ex-vivo* Daten nicht spiegelbildlich übertragbar sind. Die *in-vivo*-Situation ist deutlich komplexer als ein *in-vitro*-Modell, zumal in unserer *ex-vivo*-Studie nur eine kleine Fallzahl an Patienten evaluiert wurde. Der Wert der vorliegenden Arbeit ist im Sinne einer „Machbarkeits-Studie“ zu sehen und prospektive Studien mit ausreichender Fallzahl sind nötig um festzustellen, ob die individuelle Ansprechrate im Vollblut mit Medikamentenkonzentrationen korrelieren und ob diese mit einem niedrigen oder erhöhten Risiko einer Transplantatabstoßung assoziiert sind. Die von uns erstellten Zytokinprofile sowie deren Modifikation im Verlauf der immunsuppressiven Behandlung nach einer Transplantation, müssen zunächst an einer Anzahl geeigneter Patienten bestätigt und in Zusammenhang mit dem Langzeittransplantatüberleben analysiert werden.

6. Zusammenfassung

Die allogene Nierentransplantation ist die Therapie der Wahl bei terminaler Niereninsuffizienz. Um allogene Transplantatabstoßungen zu vermeiden, ist eine lebenslange immunsuppressive Pharmakotherapie notwendig. Trotz ausreichender Medikamentenkonzentration im peripheren Blut (Blutspiegel) sind T-Zell vermittelte Abstoßungsreaktionen aber auch Nebenwirkungen der immunsuppressiven Pharmakotherapie ein großes Problem für erfolgreiche Organtransplantationen. Eine Verbesserung des Transplantatüberlebens sowie eine individuelle und somit optimale Immunsuppression stellen daher ein vordringliches Ziel dar. Tacrolimus ist ein meist in der Nieren- und Lebertransplantation verwendetes Immunsuppressivum, welches den Signaltransduktionsweg verschiedener Zytokingene beeinflusst und dadurch die Aktivierung von T-Lymphozyten inhibiert. Die Steuerung der immunsuppressiven Pharmakotherapie erfolgt derzeit lediglich anhand von Serumkonzentrationen im peripheren Blut. Eine Bestimmung des funktionellen Effekts (Pharmakodynamik) von Tacrolimus beim Individuum könnte bislang übliche Bestimmungen der Pharmakokinetik ergänzen und somit für eine individuell ausgerichtete Pharmakotherapie einen großen Stellenwert erlangen. In der vorliegenden Studie sollte die pharmakodynamische Wirksamkeit von Tacrolimus unter *in vivo* nahen Bedingungen untersucht werden. Hierfür wurde ein Vollblutstimulationstest etabliert, der nach T-Zell spezifischer CD3/CD28 Costimulation eine quantitative Analyse verschiedener potentieller pharmakodynamischer Parameter der Immunsuppression auf unterschiedlichen Ebenen der T-Zell Aktivierung erlaubt. Nach Zugabe von Tacrolimus zu Vollblutkulturen gesunder Probanden *in vitro* zeigten sich individuell unterschiedliche Verläufe. Während die IL-4 sowie TNF-α mRNA Expression bei den Probanden zu allen Messzeitpunkten eine deutliche, dosisabhängige Suppression zeigten, fand sich nach 24 h Costimulation nur in Einzelfällen ein suppressiver Einfluss auf die IL-2 mRNA Expression. Anhand der quantitativen Analyse von IL-2 mRNA Expressionskinetiken war es möglich, Individuen mit unterschiedlichen Ansprechraten zu identifizieren. Hier zeigte sich, dass jedes Individuum während der T-Zell Stimulation durch ein bestimmtes Zeitintervall charakterisiert ist, in dem der immunsuppressive Effekt von Tacrolimus erkennbar ist. Die individuelle Tacrolimus Sensitivität war abhängig von der Kinetik (Messzeitpunkt) sowie der

Tacrolimuskonzentration. Eine isolierte Betrachtung nur eines Messzeitpunktes lieferte keine zuverlässigen Aussagen, vielmehr schien der individuelle Verlauf der Expressionskurve über die Zeit entscheidend zu sein. Die Untersuchung weiterer möglicher Parameter, wie der IL-2 und IL-4 Proteinsekretion, der Expression von Oberflächenmarkern auf T-Zellen (CD69), der IL-2 Rezeptorexpression auf T-Zellen (CD25) und der T-Zell-Proliferation, zeigte eine einheitliche Suppression ohne Hinweis auf eine individuelle Variabilität. Diese Ergebnisse belegen, dass eine fehlende Suppression der IL-2 mRNA Expression nach 24 h *in vitro* nicht mit einer Reduktion der IL-2 Sekretion, IL-2 Rezeptorexpression und T-Zell-Proliferation einhergeht und sprechen gegen eine generelle Tacrolimus Resistenz nach CD3/CD28 Costimulation. Erste klinische Untersuchungen anhand von Patienten unter Tacrolimus-Monotherapie vor Lebendnierentransplantation zeigten ebenfalls individuell unterschiedliche IL-2 mRNA Expressionskinetiken *ex vivo* und könnten erste Hinweise auf einen möglichen Zusammenhang zu klinischen Verläufen sein. Die in der vorliegenden Arbeit erstellten IL-2 Expressionsprofile sowie deren Modifikation im Verlauf einer immunsuppressiven Behandlung nach allogener Transplantation zeigen die „Machbarkeit“ eines pharmakodynamischen Monitorings mit Hilfe molekularbiologischer Immunfunktionsdiagnostik auf, müssen jedoch in prospektiven Studien bestätigt und in Zusammenhang mit klinischen Verläufen analysiert werden. Die Evaluation von IL-2 mRNA Expressionkinetiken mittels Echt-Zeit PCR ermöglicht Untersuchungen auf einer frühen Ebene der T-Zell Aktivierung, sie bietet die Möglichkeit schneller und zuverlässiger Messungen und könnte als möglicher Parameter einer individuellen pharmakodynamischen Wirksamkeit von Tacrolimus wichtige Grundlagen für eine verbesserte Steuerung der immunsuppressiven Pharmakotherapie liefern.

7. Literaturverzeichnis

Acuto O, Michel F: CD28-mediated co-stimulation: a quantitative support for TCR signalling. *Nat Rev Immunol* 3 (12): 939-951 (2003)

Ahmed M, Venkataraman R, Logar AJ, Rao AS, Bartley GP, Robert K, Dodson FS, Shapiro R, Fung JJ, Zeevi A: Quantitation of immunosuppression by tacrolimus using flow cytometric analysis of interleukin-2 and interferon-gamma inhibition in CD8(-) and CD8(+) peripheral blood T cells. *Ther Drug Monit* 23 (4): 354-362 (2001)

Allison AC, Eugui EM: Mechanisms of action of mycophenolate mofetil in preventing acute and chronic allograft rejection. *Transplantation* 80 (2 Suppl): S181-190 (2005)

Anderson DE, Sharpe AH, Hafler DA: The B7-CD28/CTLA-4 costimulatory pathways in autoimmune disease of the central nervous system. *Curr Opin Immunol* 11 (6): 677-683 (1999)

Andersson J, Nagy S, Groth CG, Andersson U: Effects of FK506 and cyclosporine A on cytokine production studied in vitro at a single-cell level. *Immunology* 75 (1): 136-142 (1992)

Appleman LJ, Berezovskaya A, Grass I, Boussiotis VA: CD28 costimulation mediates T cell expansion via IL-2-independent and IL-2-dependent regulation of cell cycle progression. *J Immunol* 164 (1): 144-151 (2000)

Armstrong VW, Oellerich M: New developments in the immunosuppressive drug monitoring of cyclosporine, tacrolimus, and azathioprine. *Clin Biochem* 34 (1): 9-16 (2001)

Ashcroft DM, Dimmock P, Garside R, Stein K, Williams HC: Efficacy and tolerability of topical pimecrolimus and tacrolimus in the treatment of atopic dermatitis : meta-analysis of randomised controlled trials. *BMJ* 330 (7490):516 (2005)

Balkwill FR, Burke F: The cytokine network. *Immunol Today* 10 (9): 299-304 (1989)

Barry M, Bleackley RC: Cytotoxic T lymphocytes: all roads lead to death. *Nat Rev Immunol* 2 (6): 401-409 (2002)

Barten MJ, Rahmel A, Bocsi J, Boldt A, Garbade J, Dhein S, Mohr FW, Gummert JF: Cytokine analysis to predict immunosuppression. *Cytometry A* 69(3): 155-157 (2006)

Barten MJ, Tarnok A, Garbade J, Bittner HB, Dhein S, Mohr FW, Gummert JF: Pharmacodynamics of T-cell function for monitoring immunosuppression. *Cell Prolif* 40 (1):50-63 (2007)

Basadonna GP, Matas AJ, Gillingham KJ, Payne WD, Dunn DL, Sutherland DE, Gores PF, Gruessner RW, Najarian JS: Early versus late acute rejection: impact on chronic rejection. *Transplantation* 55 (5): 993-995 (1993)

Batiuk TD, Pazderka F, Enns J, DeCastro L, Halloran PF: Cyclosporine inhibition of calcineurin activity in human leukocytes in vivo is rapidly reversible. *J Clin Invest* 96 (3): 1254-1260 (1995)

Batten P, McCormack AM, Page CS, Yacoub MH, Rose ML: Human T cell responses to human and porcine endothelial cells are highly sensitive to cyclosporine A and FK506 in vitro. *Transplantation* 68 (10):1552-1560 (1999)

Bierer BE, Schreiber SL, Burakoff SJ: The effect of the immunosuppressant FK-506 on alternate pathways of T cell activation. *Eur J Immunol* 21 (2): 439-445 (1991)

Bloemena E, Roos MT, Van Heijst JL, Vossen JM, Schellekens PT: Whole-blood lymphocyte cultures. *J Immunol Methods* 122 (2): 161-167 (1989)

Bowman LJ, Brennan DC: The role of tacrolimus in renal transplantation. *Expert Opin Pharmacother* 9 (4):635-643 (2008)

Burkhart C, Heusser C, Morris RE, Raulf F, Weckbecker G, Weitz-Schmidt G, Welzenbach K: Pharmacodynamics in the development of new immunosuppressive drugs. *Ther Drug Monit* 26 (6): 588-592 (2004)

Cantarovich D, Renou M, Megnigbeto A, Giral-Classe M, Hourmant M, Dantal J, Blancho G, Karam G, Soulillou JP: Switching from cyclosporine to tacrolimus in patients with chronic transplant dysfunction or cyclosporine-induced adverse events. *Transplantation* 79(1) : 72-78 (2005)

Colvin RB: The renal allograft biopsy. *Kidney Int*. 50 (3):1069-1082 (1996)

Crabtree GR, Clipstone NA: Signal transmission between the plasma membrane and nucleus of T lymphocytes. *Annu Rev Biochem* 63 : 1045-1083 (1994)

Dallmann MJ, Clark GJ: Cytokines and their receptors in transplantation. *Curr Opin Immunol* 3 (5): 729-734 (1991)

Dambin C, Klupp J, Morris RE: Pharmacodynamics of immunosuppressive drugs. *Curr Opin Immunol* 12(5): 557-562 (2000)

De Groote D, Zangerle PF, Gevaert Y, Fassotte MF, Beguin Y, Noizat-Pirenne F, Pirenne J, Gathy R, Lopez M, Dehart I, Igot D, Boudrihaye M, Delacroix D, Franchimont P: Direct stimulation of cytokines (IL-1 beta, TNF-alpha, IL-6, IL-2, IFN-gamma and GM-CSF) in whole blood. I. Comparison with isolated PBMC stimulation. *Cytokine*: 239-248 (1992)

Depper JM, Leonhard WJ, Drogula C, Krönke M, Waldmann TA, Greene WC: Interleukin 2 (IL-2) augments transcription of the IL-2 receptor gene. *Proc Natl Acad Sci USA* 82 (12): 4230-4234 (1985)

De Waal Malefyt R, Abrams J, Bennett B, Figdor CG, de Vries JE: Interleukin 10 (IL-10) inhibits cytokine synthesis by human monocytes: an autoregulatory role of IL-10 produced by monocytes. *J Exp Med* 174 (5): 1209-1220 (1991)

Ekberg H: Calcineurin inhibitor sparing in renal transplantation. *Transplantation* 86(6):761-767 (2008)

Ekberg H, Tedesco-Silva H, Demirbas A, Vitko S, Nashan B, Gürkan A, Margreiter R, Hugo C, Grinyó JM, Frei U, Vanrenterghem Y, Daloze P, Halloran PF, for the ELITE-Symphony Study: Reduced exposure to calcineurin inhibitors in renal transplantation. *N Engl J Med* 357 (25): 2562-2575 (2007)

El-Safa EA, Fredericks S, MacPhee I, Holt DW, Johnston A: Paradoxical response to tacrolimus assessed by interleukin-2 gene expression. *Transplant Proc* 38(10): 3327-3330 (2006)

Famulski KS, Sis B, Billesberger L, Halloran PF: Interferon-gamma and donor MHC class I control alternative macrophage activation and activin expression in rejecting kidney allografts: a shift in the Th1-Th2 paradigm. *Am J Transplant* 8 (3): 547-556 (2008)

Flanagan WM, Corthésy B, Bram RJ, Crabtree GR: Nuclear association of a T cell transcription factor blocked by FK-506 and cyclosporine A. *Nature* 352 (6338): 803-807 (1991)

Flynn JT, Bunchman TE, Sherbotie JR: Indications, results, and complications of Tacrolimus conversion in pediatric renal transplantation. *Pediatr Transplant* 5 (6): 439-446 (2001)

Fraser JD, Irving BA, Crabtree GR, Weiss A: Regulation of interleukin-2 gene-enhancer activity by the T cell accessory molecule CD28. *Science* 251 (4991): 313-316 (1991)

Galvin F, Freeman GJ, Razi-Wolf Z, Benacerraf B, Nadler L, Reiser H: Effects of cyclosporine A, FK 506, and mycalamide A on the activation of murine CD4+ T cells by the murine B7 antigen. *Eur J Immunol* 23 (1): 283-286 (1993)

Geginat J, Clissi B, Moro M, Dellabona P, Bender JR, Pardi R: CD28 and LFA-1 contribute to cyclosporine A-resistant T cell growth by stabilizing the IL-2 mRNA trough distinct signaling pathways. *Eur J Immunol* 30 (4): 1136-1144 (2000)

Gibbs PJ, Tan LC, Sadek DA, Howell WM: Comparative evaluation of 'TaqMan' RT-PCR and RT-PCR ELISA for immunological monitoring of renal transplant recipients. *Transpl Immunol* 11(1): 65-72 (2003)

Golling M, Sadeghi M, Zipperle S, Fonouni H, Golriz M, Mehrabi A: In vitro cytokine responses in liver transplant recipients treated with cyclosporine A and tacrolimus. *Clin Transplant* 23 (Suppl 21) :83-91 (2009)

Gringhuis SI, de Leij LF, Verschuren EW, Borger P, Vellenga E: Interleukin-7 upregulates the interleukin-2-gene expression in activated human T lymphocytes at the transcriptional level by enhancing the DNA binding activities of both nuclear factor of activated T cells and activator protein-1. *Blood* 90 (7): 2690-2700 (1997)

Hammers HJ, Kirchner H, Schlenke P: Ultraviolet-induced detection of halogenated pyrimidines: simultaneous analysis of DNA replication and cellular markers. *Cytometry* 40 (4): 327-335 (2000)

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* 264 (1-2): 89-93 (2002)

Härtel C, Bein G, Kirchner H, Klüter H: A human whole-blood assay for analysis of T-cell function by quantification of cytokine mRNA. *Scand J Immunol* 49 (6): 649-654 (1999)

Härtel C, Bein G, Müller-Steinhardt M, Klüter H: Ex vivo induction of cytokine mRNA expression in human blood samples. *J Immunol Methods* 249 (1-2): 63-71 (2001)

Heid CA, Stevens J, Livak KJ, Williams PM: Real time quantitative PCR. *Genome Res* 6 (10): 986-994 (1996)

Ho S, Clipstone N, Timmermann L, Northrop J, Graef I, Fiorentino D, Nourse J, Crabtree CR: The mechanism of action of cyclosporine A and FK506. *Clin Immunol Immunopathol* 80 (3 Pt 2): S40-S45 (1996)

Hodge G, Hodge S, Reynolds P, Holmes M: Intracellular cytokines in blood T cells in lung transplant patients- a more relevant indicator of immunosuppression than drug levels. *Clin Exp Immunol* 139 (1): 159-164 (2005)

Hoffmann SC, Stanley EM, Darrin Cox E, Craighead N, DiMercurio BS, Koziol DE, Harlan DM, Kirk AD, Blair PJ: Association of cytokine production in anti-CD3/CD28-stimulated peripheral blood lymphocytes. *Transplantation* 72 (8): 1444-1450 (2001)

Jain S, Bicknell GR, Nicholson ML: Molecular changes in extracellular matrix turnover after renal ischaemia-reperfusion injury. *Br J Surg* 87 (9): 1188-1192 (2000)

Jiang H, Yang X, Soriano RN, Fujimura T, Krishnan K, Kobayashi M: Distinct patterns of cytokine gene suppression by the equivalent effective doses of cyclosporine and tacrolimus in rat heart allografts. *Immunobiology* 202 (3): 280-292 (2000)

Jordan ML, Naraghi R, Shapiro R, Smith R, Vivas CA, Scantlebury VP, Gritsch HA, McCauley J, Randhawa P, Demetris AJ, McMichael J, Fung JJ, Starzl TE: Tacrolimus rescue therapy for renal allograft rejection- five-year experience. *Transplantation* 63 (2): 223-228 (1997)

Jørgensen KA, Koefoed-Nielsen PB, Karamperis N: Calcineurin phosphatase activity and immunosuppression. A review on the role of calcineurin phosphatase activity and the immunosuppressive effect of cyclosporin A and tacrolimus. *Scand J Immunol* 57(2): 93-98 (2003)

June CH, Ledbetter JA, Lindsten T, Thompson CB: Evidence for the involvement of three distinct signals in the induction of IL-2 gene expression in human T lymphocytes. *J Immunol* 143 (1): 153-161 (1989)

Kahan BD, Keown P, Levy GA, Johnston A: Therapeutic drug monitoring of immunosuppressant drugs in clinical practice. *Clin Ther* 24 (3): 330-350 (2002)

Karczewski M, Karczewski J, Poniedzialek B, Wiktorowicz K, Smietanska M, Glyda M: Distinct cytokine patterns in different states of kidney allocraft function. *Transplant Proc* 41(10):4147-4149 (2009)

Katsakiori PF, Papapetrou EP, Sakellaropoulos GC, Goumenos DS, Nikiforidis GC, Flordellis CS: Factors effecting the long-term response to Tacrolimus in renal transplant patients: pharmacokinetic and pharmakogenetic approach. *Int J Med Sci* 7(2):94-100 (2010)

Kay JE, Benzie CR: T lymphocyte activation though the CD28 pathway is insensitive to inhibition by the immunosuppressive drug FK-506. *Immunol Lett* 23 (2): 155-159 (1989)

Kay JE, Doe SE, Benzie CR:The mechanism of action of the immunsuppressive drug FK-506. *Cell Immunol* 124 (1): 175-181 (1989)

Kershner RP, Fitzsimmons WE: Relationship of FK506 whole blood concentrations and efficacy and toxicity after liver and kidney transplantation. *Transplantation* 62 (7): 920-926 (1996)

Kirchner H, Kleinicke C, Digel W: A whole-blood technique for testing production of human interferon by leukocytes. *J Immunol Methods* 48 (2): 213-219 (1982)

Klupp J, Dambrin C, Regieli J, van Gelder T, Shorthouse RA, Morris RE: New approach in drug development : whole blood pharmacodynamic assays reflect biological activities of tacrolimus. *Transplant Proc* 33 (3): 2172 (2001)

Koutouby R, Zucker C, Zucker K, Burke G, Nery J, Roth D, Esquenazi V, Miller J: Molecular monitoring of the immunosuppressive effects of cyclosporine in renal transplant patients by using a quantitative polymerase chain reaction. *Hum Immunol* 36 (4): 227-234 (1993)

Kruse N, Pette M, Toyka K, Rieckmann P: Quantification of cytokine mRNA expression by RT PCR in samples of previously frozen blood. *J Immunol Methods* 210 (2): 195-203 (1997)

Lee VW, Chapman JR: Sirolimus: Its role in nephrology. *Nephrology* 10 (6): 606-614 (2005)

Lin CS, Boltz RC, Siekierka JJ, Sigal NH: FK-506 and cyclosporin A inhibit highly similar signal transduction pathways in human T lymphocytes. *Cell Immunol* 133 (2): 269-284 (1991)

Lin Y, Goebels J, Rutgeerts O, Kasran A, Van Gool S, Ceuppens J, Schönharting M, Waer M: Use of the methylxanthine derivative A802715 in transplantation immunology: I. Strong in vitro inhibitory effects on CD28-costimulated T cell activities. *Transplantation* 63 (12): 1813-1818 (1997)

Lindstein T, June CH, Ledbetter JA, Stella G, Thompson CB: Regulation of lymphokine messenger RNA stability by a surface-mediated T cell activation pathway. *Science* 244 : 339-343 (1989)

Liu J, Farmer JD Jr, Lane WS, Friedman J, Weissman I, Schreiber SL: Calcineurin is a common target of cyclophilin-cyclosporine A and FKBP-FK506 complexes. *Cell* 66 (4): 807-815 (1991)

Macian F: NFAT proteins: key regulators of T-cell development and function. *Nat Rev Immunol* 5 (6):472-484 (2005)

Magee CC, Pascual M: Update in renal transplantation. *Arch Intern Med* 164 (13):1373-1388 (2004)

Magee CC; Denton MD, Womer KL, Khoury SJ, Sayegh MH: Assessment by flow cytometry of intracellular cytokine production in the peripheral blood cells of renal transplant recipients. *Clin Transplant* 18 (4): 395-401 (2004)

Malek K, Bayer AL: Tolerance, not immunity, crucially depends on IL-2. *Nat Immunol Rev* 4 (9) :665-670 (2004)

Mardiney M 3rd, Brown MR, Fleisher TA: Measurement of T-cell CD69 expression: a rapid and efficient means to assess mitogen- or antigen- induced proliferative capacity in normals. *Cytometry* 26 (4): 305-310 (1996)

Margreiter R, European Tacrolimus vs Ciclosporin Microemulsion Renal Transplantation Study Group: Efficacy and safety of tacrolimus compared with ciclosporin microemulsion in renal renal transplantation: a randomised multicentre study. *Lancet* 359 (9308) : 741-746 (2002)

Martin-Fontecha A, Thomsen LL, Brett S, Gerard C, Lipp M, Lanzavecchia A, Sallusto F: Induced recruitment of NK cells to lymph nodes provides IFN-gamma for T(H)1 priming. *Nat Immunol* 5 (12):1260-1265 (2004)

Matas AJ: Acute rejection is a major risk factor for chronic rejection. *Transplant Proc* 30 (5): 1766-1768 (1998)

Mayer AD, Dmitrewski J, Squifflet JP, Besse T, Grabensee B, Klein B, Eigler FW, Heemann U, Pichlmayr R, Behrend M, Vanrenterghem Y, Donck J, van Hooff J, Christiaans M, Morales JM, Andres A, Johnson RW, Short C, Buchholz B, Rehmert N, Land W, Schleibner S, Forsythe JL, Talbot D, Pohanka E: Multicenter randomized trial comparing Tacrolimus (FK506) and cyclosporine in the prevention of renal allograft rejection : a report of the European Tacrolimus Multicenter Renal Study Group. *Transplantation* 64 (3): 436-443 (1997)

McAlister VC, Gao Z, Peltekian K, Domingues J, Mahalati K, MacDonald AS: Sirolimus-tacrolimus combination immunosuppression. *Lancet* 355 (9201): 376-377 (2000)

Mohamed MA, Robertson H, Booth TA, Balupuri S, Kirby JA, Talbot D: TGF-beta expression in renal transplant biopsies: a comparative study between cyclosporin-A and tacrolimus: *Transplantation* 69 (5): 1002-1005 (2000)

Moore KW, O' Garra A, de Waal Malefyt R, Vieira P, Mosmann TR: Interleukin-10. *Annu Rev Immunol* 11: 165-190 (1993)

Moore KW, de Waal Malefyt R, Coffmann RL, O'Garra A: Interleukin-10 and the interleukin 10 receptor. *Annu Rev Immunol* 19: 683-765 (2001)

Mosmann TR, Moore KW: The role of IL-10 crossregulation of TH1 and TH2 responses. *Immunol Today* 12 (3) : A 49-53 (1991)

Motta I, Colle JH, Shidani B, Truffa-Bachi P: Interleukin 2/interleukin 4- independent T helper cell generation during an in vitro antigenic stimulation of mouse spleen cells in the presence of cyclosporine A. *Eur J Immunol* 21 (3): 551-557 (1991)

Mourad M, Wallemacq P, De Meyer M, Malaise J, De Pauw L, Eddour DC, Goffin E, Lerut J, Haufroid V: Biotransformation enzymes and drug transporters pharmacogenetics in relation to immunosuppressive drugs: impact on pharmakokinetics and clinical outcome. *Transplantation* 85 (7 Suppl): S19-24 (2008)

Müller-Steinhardt M, Kock N, Härtel C, Kirchner H, Steinhoff J: Production of monokines in patients under polysulphone haemodiafiltration is influenced by the ultrafiltration flow rate. *Nephrol Dial Transplant* 16 (9): 1830-1837 (2001)

Müller-Steinhardt M, Härtel C, Müller B, Kirchner H, Fricke L: The interleukin-6 –174 promotor polymorphism is associated with long-term kidney allograft survival. *Kidney Int* 62 (5): 1824-1827 (2002)

Müller-Steinhardt M, Fricke L, Müller B, Ebel B, Kirchner H, Härtel C: Cooperative influence of the interleukin-6 promotor polymorphisms -597, -572 and -174 on long-term kidney allograft survival. *Am J Transplant* 4(3): 402-406 (2004)

Müller-Steinhardt M, Ebel B, Härtel C: The impact of interleukin-6 promotor -597/-572/-174 genotype on interleukin-6 production after lipopolysaccharide stimulation. *Clin Exp Immunol* 147 (2) : 339-345 (2007)

Naesens M, Lerut E, Sarwal M, Van Damme B, Vanrenterghem Y, Kuypers DR: Balancing efficacy and toxicity of kidney transplant immunosuppression. *Transplant Proc* 41 (8):3393-3395 (2009)

Nakamura T, Kamogawa Y, Bottomly K, Flavell RA: Polarization of IL-4- and IFN-gamma-producing CD4+ T cells following activation of naïve CD4+ T cells. *J Immunol* 158 (3): 1085-1094 (1997)

Nickerson P, Steurer W, Steiger J, Zheng X, Steele AW, Strom TB: Cytokines and the Th1/Th2 paradigm in transplantation. *Curr Opin Immunol* 6 (5): 757-764 (1994)

O'Donovan P, Perrett CM, Zhang X, Montaner B, Xu YZ, Harwood CA, McGregor JM, Walker SL, Hanaoka F, Karran P: Azathioprine and UVA light generate mutagenic oxidative DNA damage. *Science* 309 (5742):1871-1874 (2005)

Oellerich M, Barten MJ, Armstrong VW: Biomarkers- the link between therapeutic drug monitoring and pharmacodynamics. *Ther Drug Monit* 28 (1): 35-38 (2006)

O'Garra A, Vieira P: T(H)1 cells control themselves by producing interleukin-10. *Nat Rev Immunol* 7 (6):425-428 (2007)

O'Keefe SJ, Tamura J, Kincaid RL, Tocci MJ, O'Neill EA: FK-506-and CsA-sensitive activation of the interleukin-2 promotor by calcineurin. *Nature* 357 (6380): 692-694 (1992)

Opelz G, Döhler B: Effect of human leukocyte antigen compatibility on kidney graft survival: comparative analysis of two decades. *Transplantation* 84 (2): 137-143 (2007)

Paliogianni F, Raptis A, Ahuja SS, Najjar SM, Boumpas DT: Negative transcriptional regulation of human interleukin 2 (IL-2) gene by glucocorticoids through interference with nuclear transcription factors AP-1 and NF-AT. *J Clin Invest* 91 (4): 1481-1489 (1993)

Pereira U, Boulais N, Lebonvallet N, Pennec JP, Dorange G, Misery L: Mechanisms of the sensory effects of tacrolimus on the skin. *Br J Dermatol* 163(1) : 70-77 (2010)

Pirsch JD, Miller J, Deierhoi MH, Vincenti F, Filo RS: A comparison of tacrolimus (FK506) and cyclosporine for immunosuppression after cadaveric renal transplantation. FK 506 Kidney Transplant Study Group. *Transplantation* 63 (7): 977-983 (1997)

Popat S, Hearle N, Hogberg L, Braegger CP, O'Donoghue D, Falth-Magnusson K, Holmes GK, Howdle PD, Jenkins H, Johnston S, Kennedy NP, Kumar PJ, Logan RF, Marsh MN, Mulder CJ, Torinsson Naluai A, Sjoberg K, Stenhammar L, Walters JR, Jewell DP, Houlston RS: Variation in the CTLA4/CD28 gene region confers an increased risk of coeliac disease. *Ann Hum Genet* 66 (Pt 2): 125-137 (2002)

Posselt AM, Vincenti F, Bedolli M, Lantz M, Roberts JP, Horose R: CD69 expression on peripheral CD8 T cells correlates with acute rejection in renal transplant recipients. *Transplantation* 76 (1): 190-195 (2003)

Pou L, Brunet M, Bilbao I, Andreu H, Andres I, Lopez R, Margarit C, Rimola A, Corbella J: Therapeutic drug monitoring of tacrolimus in liver transplantation, phase III FK506 multicenter Spanish Study Group: a two-year follow-up. *Ther Drug Monit* 20 (6): 602-606 (1998)

Pratschke J, Neuhaus R, Tullius SG, Haller GW, Jonas S, Steinmueller T, Bechstein WO, Neuhaus P: Treatment of cyclosporine-related adverse effects by conversion to tacrolimus after liver transplantation. *Transplantation* 64 (6): 938-940 (1997)

Rafiq K, Charitidou L, Bullens DM, Kasran A, Lorré K, Ceuppens J, van Gool SW: Regulation of the IL-10 production by human T cells. *Scand J Immunol* 53 (2): 139-147 (2001)

Ragheb JA, Deen M, Schwartz RH: CD28.Mediated regulation of mRNA stability requires sequences within the coding region of the IL-2 mRNA. *J Immunol* 163 (1):120-129 (1999)

Rao A: NF-ATp: a transcription factor required for the co-ordinate induction of several cytokine genes. *Immunol Today* 15 (6): 274-281 (1994)

Rhen T, Cidlowski JA: Antiinflammatory action of glucocorticoids - new mechanisms for old drugs. *N Engl J Med* 353 (16): 1711-1723 (2005)

Robey E, Allison JP: T-cell activation: integration of signals from the antigen receptor and costimulatory molecules. *Immunol Today* 16 (7): 306-310 (1995)

Roncarolo MG, Bacchetta R, Bordignon C, Narula S, Levings MK: Type 1 regulatory cells. *Immunol Rev* 182 : 68-79 (2001)

Rostaing L, Puyoo O, Tkaczuk J, Peres C, Rouzaud A, Cisterne JM, de Preval C, Ohayon E, Durand D, Abbal M: Differences in type 1 and type 2 intracytoplasmic cytokines, detected by flow cytometry, according to immunosuppression (cyclosporine A vs. tacrolimus) in stable renal allograft recipients. *Clin Transplant* 13 (5) : 400-409 (1999)

Sakuma S, Kato Y, Nishigaki F, Sasakawa T, Magari K, Miyata S, Ohkubo Y, Goto T: FK506 potently inhibits T cell activation induced TNF-α and IL-1beta production in vitro by human peripheral blood mononuclear cells. *Br J Pharmacol* 130 (7): 1655-1663 (2000)

Salmaso C, Olive D, Pesce G, Bagnasco M: Costimulatory molecules and autoimmune thyroid diseases. *Autoimmunity* 35 (3):159-167 (2002)

Salomon B, Bluestone JA: Complexities of CD28/B7: CTLA-4 costimulatory pathways in autoimmunity and transplantation. *Annu Rev Immunol* 19 : 225-252 (2001)

Schorle H, Holtschke T, Hünig T, Schimpl A, Horak I: Development and function of T cells in mice rendered interleukin-2 deficient by gene targeting. *Nature* 352 (6336): 621-623 (1991)

Schreuder GM, Hurley CK, Marsh SG, Lau M, Fernandez-Vina MA, Noreen HJ, Setterholm M, Maiers M: HLA dictionary 2004:summary of HLA-A, -B, -C, -DRB1/3/4/5, -DQB1 alleles and their association with serologically defined HLA-A, -B,-C,-DR, and DQ antigens. *Hum Immunol* 66 (2): 170-210 (2005)

Shapiro R, Jordan ML, Scantlebury VP, Vivas C, Fung JJ, McCauley J, Randhawa P, Demetris AJ, Irish W, Mitchell S: A prospective randomized trial of FK506-based immunosuppression after renal transplantation. *Transplantation* 59 (4): 485-90 (1995)

Simpson MA, Young-Fadok TM, Madras PN, Freeman RB, Dempsey RA, Shaffer D, Lewis D, Jenkins RL, Monaco AP: Sequential interleukin 2 and interleukin 2 receptor

levels distinguish rejection from cyclosporine toxicity in liver allograft recipients. *Arch Surg* 126 (6): 717-719 (1991)

Sindhi R, Allaert J, Gladding D, Haaland P, Koppelman B, Dunne J, Sehgal S: Modeling individual variation in biomarker response to combination immunosuppression with stimulated lymphocyte responses-potential clinical implications. *J Immunol Methods* 272 (1-2) : 257-272 (2003)

Spencer CM, Goa KL, Gilles JC: Tacrolimus. An update of its pharmacology and clinical efficacy in the management of organ transplantation. *Drugs* 54 (6): 925-975 (1997)

Street NE, Mosmann TR: Functional diversity of T-lymphocytes due to secretion of different cytokine patterns. *FASEB J* 5 (2): 171-177 (1991)

Tanaka H, Kuroda A, Marusawa H, Hashimoto M, Hatanaka H, Kino T, Goto T, Okuhara M: Physicochemical properties of FK-506, a novel immunosuppressant isolated from Steptomyces tsukubaensis. *Transplant Proc* 19 (5 Suppl): 11-16 (1987)

Thompson CB, Lindsten T, Ledbetter JA, Kunkel SL, Young HA, Emerson SG, Leiden JM, June CH: CD28 activation pathway regulates the production of multiple T-cell-derived lymphokines/cytokines. *Proc Natl Acad Sci USA* 86 (4): 1333-1337 (1989)

Thomson AW, Bonham CA, Zeevi A: Mode of action of tacrolimus (FK506): molecular and cellular mechanisms. *Ther Drug Monit* 17 (6): 584-591 (1995)

Tocci MJ, Matkovich DA, Collier KA, Kwok P, Dumont F, Lin S, Degudicibus S, Siekierka JJ, Chin J, Hutchinson NI: The immunosuppressant FK506 selectively inhibits expression of early T cell activation genes. *J Immunol* 143 : 718-726 (1989)

Van Rossum HH, de Fijter JW, van Pelt J: Pharmacodynamic monitoring of calcineurin inhibitor therapy: principles, performances, and perspectives. *Ther Drug Monit* 32(1): 3-10 (2010)

Venkataramanan R, Swaminathan A, Prasad T, Jain A, Zuckerman S, Warty V, McMichael J, Lever J, Burckart G, Starzl T: Clinical pharmacokinetics of tacrolimus. *Clin Pharmacokinet* 29 (6): 404-430 (1995)

Vincenti F: A decade of progress in kidney transplantation. *Transplantation* 77 (9 Suppl) S52-61 (2004)

Vincenti F, Kirkman R, Light S, Bumgardner G, Pescovitz M, Halloran P, Neylan J, Wilkinson A, Ekberg H, Gaston R, Backman L, Burdick J: Interleukin -2-receptor blockade with daclizumab to prevent acute rejection in renal transplantation. Daclizumab Triple Therapy Study Group. *N Engl J Med* 338 (3): 161-165 (1998)

Wallemacq PE, Leal T, Besse T, Squifflet JP, Reding R, Otte JB, Lerut J, Hassoun A : IMx tacrolimus II vs IMx tacrolimus microparticle enzyme immunoassay evaluated in renal and hepatic transplant patients. *Clin Chem* 43 (10): 1989-1991 (1997)

Wang SC, Morel PA, Wang Q Jordan ML, Simmons RL, Tweardy DJ: A dual mechanism of immunosuppression of IL-4 and IL-10 levels in T helper 2 cells. *Transplantation* 56 (4): 978-985 (1993)

Weaver CT, Harringston LE, Mangan PR, Gavriel M, Murphy KM: Th17: an effector CD4 lineage with regulatory T cell ties. *Immunity* 24 (6): 677-688 (2006)

Webb DC, Cai Y, Matthaei KI, Foster PS: Comparative roles of IL-4, IL-13, and IL-4Rα in dendritic cell maturation and $CD4^+$ Th2 cell function. *J Immunol* 178 (1): 219-227 (2007)

Webster AC, Woodroffe RC, Taylor RS, Chapman JR, Craig JC: Tacrolimus versus ciclosporin as primary immunosuppression for kidney transplant recipients: meta-analysis and meta-regression of randomised trial data. *BMJ* 331 (7520) : 810 (2005)

Webster AC, Ruster LP, McGee R, Matheson SL, Higgins GY, Willis NS, Chapman JR, Craig JC: Interleukin 2 receptor antagonists for kidney transplant recipients. *Cochrane Database Syst Rev* Jan 20; (1): CD003897 (2010)

Weimer R, Melk A, Daniel V, Friemann S, Padberg W, Opelz G: Switch from cyclosporine A to tacrolimus in renal transplant patients: impact on Th1, Th2 and monokine responses. *Hum Immunol* 61 (9) : 884-897 (2000)

Wiederrecht G, Lam E, Hung S, Martin M, Sigal N: The mechanism of action of FK-506 and cyclosporin A. *Ann N Y Acad Sci* 696: 9-19 (1993)

Wu O, Levy AR, Briggs A, Lewis G, Jardine A: Acute rejection and chronic nephropathy : a systemic review of the literature. *Transplantation* 87(9) : 1330-1339 (2009)

Yatscoff RW, Aspeslet LJ, Gallant HL: Pharmacodynamic monitoring of immunosuppressive drugs. *Clin Chem* 44 (2) : 428-432 (1998)

Yoshimura N, Kahan BD: Parmakodynamic assessment of the in vivo cyclosporine effect on interleukin-2 production by lymphocytes in kidney transplant recipients. *Transplantation* 40 (6): 661-666 (1985)

Zucker C, Zucker K, Asthana D, Carreno M, Viciana AL, Ruiz P, Esquenazi V, Nery J, Burke G, Miller J: Longitudinal induced IL-2 mRNA monitoring in renal transplant patients immunosuppressed with cyclosporine and in unmodified canine renal transplant rejection. *Hum Immunol* 45 (1): 1-12 (1996)

8. Danksagung

Ich möchte mich an dieser Stelle bei meinem Doktorvater Herrn PD Dr. med. Christoph Härtel für die Überlassung des interessanten Themas, die Ideen, für die großzügige Unterstützung, den Rückhalt und die Geduld bedanken.

Mein besonderer Dank gilt Herrn PD Dr. med. Michael Müller-Steinhardt für die fachliche Betreuung und Beratung, er hat wesentlich zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen.

Herrn Prof. Dr. med. Egbert Herting möchte ich für sein Interesse und seine Hilfe danken.

Ich danke Herrn Prof. Dr. med. Holger Kirchner für die Möglichkeit, meine Forschungsarbeit an seinem Institut durchführen zu können. Mein Dank gilt auch allen Mitarbeitern des Institutes für Immunologie und Transfusionsmedizin für ihre Hilfsbereitschaft.

Ganz besonders möchte ich Frau Brigitte Ebel für die geduldige Einführung in verschiedene Methoden und ihre Hilfe bei kleinen und großen Problemen danken, mit der sie viele Versuche erst möglich machte.

Desweiteren danke ich Herrn Prof. Dr. med. Lutz Fricke, dem damaligen Leiter des Transplantationszentrums der Medizinischen Universität Lübeck und den Mitarbeitern der damaligen Station 19T für die gute Zusammenarbeit.

Selbstverständlich gebührt allen Probanden und Patienten mein aufrichtiger Dank, ohne ihre Mitarbeit hätte diese Arbeit nicht durchgeführt werden können.

Meinen Eltern und Großeltern gilt an dieser Stelle ganz besonderer Dank für ihre liebevolle Begleitung und ihre unermüdliche Unterstützung. Ich möchte es nicht versäumen, all meinen Freuenden für ihre Motivation und ihr Verständnis zu danken.