

UNIVERSITÄTSKLINIKUM HAMBURG-EPPENDORF

Klinik für Kinder- und Jugendmedizin

Direktor: Prof. Dr. med. Kurt Ullrich

Lymphozytensubpopulationen bei Kindern und Jugendlichen nach Nierentransplantation – Schwerpunkt BAFF und regulatorische T-Zellen

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
an der Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg.

vorgelegt von:

Franziska Dunst
aus Schwedt / Oder

Hamburg 2012

**Angenommen von der
Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg am: 26.11.2012**

**Veröffentlicht mit Genehmigung der
Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg.**

Prüfungsausschuss, der Vorsitzende: Prof. Dr. M. Kemper

Prüfungsausschuss, zweiter Gutachter: Prof. Dr. F. Thaiss

Prüfungsausschuss, dritte Gutachterin: Prof. Dr. M. Koch

Inhaltsverzeichnis

| | |
|---|----|
| 1 Einleitung | 1 |
| 1.1 Nierentransplantation im Kindesalter | 1 |
| 1.2 Lymphozytensubpopulationen | 3 |
| 1.2.1 B-Zellen..... | 3 |
| 1.2.2 T-Zellen..... | 4 |
| 1.3 B-Zell-aktivierender Faktor (BAFF) und sein Rezeptor (BAFF-R) | 5 |
| 1.4 Zielsetzung der Arbeit | 7 |
| 2 Material & Methoden | 8 |
| 2.1 Deskriptive Daten der untersuchten Probandengruppen | 8 |
| 2.1.1 Nierentransplantierte Patienten..... | 8 |
| 2.2 Methoden | 9 |
| 2.2.1 Probenaufbereitung..... | 10 |
| 2.2.2 FACS | 12 |
| 2.2.3 ELISA..... | 13 |
| 2.2.4 Erhebung weiterer Parameter | 13 |
| 2.3. Statistik | 14 |
| 3. Ergebnisse | 15 |
| 3.1 Lymphozyten und ausgewählte Subpopulationen..... | 15 |
| 3.1.1 B- Zellen..... | 15 |
| 3.1.2 Regulatorische T-Zellen (Tregs)..... | 16 |

| | |
|--|----|
| 3.2 BAFF..... | 16 |
| 3.3 BAFF-Rezeptor..... | 18 |
| 3.4 Korrelationen..... | 19 |
| 4. Diskussion..... | 23 |
| 4.1 B- Zellen..... | 23 |
| 4.2 Regulatorische T- Zellen..... | 25 |
| 4.3 BAFF und BAFF-R..... | 26 |
| 4.4 Einschränkungen der vorliegenden Arbeit..... | 31 |
| 4.5 Schlussfolgerung..... | 31 |
| 5. Zusammenfassung..... | 33 |
| 6. Anhang..... | 36 |
| 6.1 Tabellen..... | 36 |
| 6.2 Material..... | 40 |
| 6.3 Zusatzinformationen zu Methoden..... | 42 |
| 7. Abkürzungsverzeichnis..... | 43 |
| 8. Literaturverzeichnis..... | 45 |
| 9. Danksagung..... | 50 |
| 10. Lebenslauf..... | 51 |
| 11. Eidesstattliche Versicherung..... | 52 |

Abbildungsverzeichnis

| | |
|---|----|
| Abb. 1: BAFF und seine Rezeptoren (Mackay & Schneider 2009) | 5 |
| Abb. 2: Gruppenvergleich hinsichtlich des Anteils an CD19+ B- Zellen(%) | 15 |
| Abb. 3: Gruppenvergleich in Bezug auf den Anteil regulatorischer T- Zellen (%) .. | 16 |
| Abb. 4: CD4+ FoxP3+ Tregs (rot), repräsentatives 2 Farben FACS Plot..... | 16 |
| Abb. 5: Vgl. der untersuchten Gruppen in Bezug auf BAFF- Spiegel im Serum in pg/ml..... | 17 |
| Abb. 6: Vergleich des BAFF Spiegels im Serum (pg/ml) zw. Kontrollen, Patienten mit Transplantatdysfunktion und ohne | 18 |
| Abb. 7: BAFF-R+/CD19+ (rot), repräsentatives 2 Farben FACS Plot | 19 |
| Abb. 8: Kein BAFF-R auf T- Zellen, repräsentatives 2 Farben FACS Plot..... | 19 |
| Abb. 9: Vgl. der untersuchten Gruppen in Hinblick auf BAFF-R Expression (MFI) auf B-Zellen | 19 |
| Abb. 10: Korrelation Zeit nach Transplantation mit Anzahl der Tregs | 20 |
| Abb. 11: Korrelation B-Zellzahl mit Anzahl Tregs | 20 |
| Abb. 12: Inverse Korrelation BAFF mit Anteil Tregs | 21 |
| Abb. 13: Inverse Korrelation BAFF im Serum mit BAFF-R auf B-Zellen | 21 |

Tabellenverzeichnis

| | |
|--|----|
| Tab. 1: Deskriptive Daten der untersuchten Kohorten | 36 |
| Tab. 2: Unterschiede in Mittelwerten zwischen den untersuchten Gruppen..... | 37 |
| Tab. 3: Mittelwerte der Immunglobuline und IgG-Subklassen der Transplantierten | 37 |
| Tab. 4: Vgl. BAFF i. Serum (pg/ml) und BAFF-R Expression (MFI) zw. Transplantierten und Kontrollen..... | 38 |
| Tab. 5: Gesonderte Betrachtung der kombiniert leber- und nierentransplantierten Patienten im Vergleich mit der Gesamtpopulation der einfach Nierentransplantierten..... | 38 |
| Tab. 6: Korrelationen..... | 39 |
| Tab. 7: Fluoreszenzmarkierte Antikörper | 40 |
| Tab. 8: Substanzen | 41 |
| Tab. 9: Pufferzusammensetzung | 41 |
| Tab. 10: Pipettierschema für BAFF-R/ FoxP3-Messungen am FACS- Durchflusszytometer | 42 |
| Tab. 11: Eingesetzte Antikörper-Mengen | 42 |

1 Einleitung

1.1 Nierentransplantation im Kindesalter

Mit ungefähr 100 betroffenen Kindern pro Jahr in Deutschland (Offner 2009) ist die Transplantation die Nierenersatztherapie der Wahl bei terminaler Insuffizienz (Neumayer et al. 2008). Im Anschluss daran ist eine lebenslange, medikamentöse Therapie notwendig, um das Immunsystem zu modulieren und einer Abstoßungsreaktion entgegen zu wirken. Die initiale immunsuppressive Standardmedikation in Deutschland besteht bei Kindern aus Steroiden in Kombination mit Calcineurin- Inhibitoren (CNI, Ciclosporin A od. Tacrolimus) und Mycophenolat (Offner 2009). Die kontinuierliche Immunsuppression erfordert einen Balanceakt zwischen ihren erwünschten und zahlreichen unerwünschten Wirkungen. Letztere sind vor allem Abstoßung des empfangenen Organs auf der einen, sowie Infektanfälligkeit, Nierenschädigung und lymphoproliferativen Erkrankungen (PTLD) auf der anderen Seite (Neumayer et al. 2008, Offner 2009). Insgesamt gestaltet sich die immunsuppressive Therapie also schwierig, sie trägt jedoch entscheidend zur Vermeidung und Reduktion von Abstoßungsreaktionen bei und ist somit unerlässlich. Aufgrund der genannten Probleme ist es von besonderer Bedeutung, diese Medikation zu überwachen und anzupassen. Bisher erfolgt dies hauptsächlich durch Medikamentenspiegelkontrollen. Da die Immunsuppression vor allem Immunzellen beeinflusst, ist es außerdem möglich, einzelne Lymphozytenpopulationen genauer zu betrachten.

Die chronische Transplantatdysfunktion -welche vor allem durch antikörpervermittelte Prozesse entsteht- stellt gegenüber der akuten Abstoßung das größere Problem dar. Dafür ist wiederum die B-Zelle entscheidend. Ihre Funktionen sind bspw. die Differenzierung zu Plasmazellen mit der Produktion von Donor-spezifischen Antikörpern, Differenzierung zu B-Gedächtnis-Zellen mit beschleunigter humoraler Immunantwort nach Antigen- Zweitkontakt, aber auch Präsentation von Antigenen und dadurch Aktivierung von CD4+ T-Helferzellen, Interaktion mit dendritischen Zellen und regulatorischen T-Zellen sowie Produktion von Zytokinen (Banas 2008). Wenig ist jedoch bisher zur Regulation der B-Zell Homöostase bekannt. Hierbei findet sich in Diskussionen aktueller Publikationen vor allem das Molekül BAFF (B-Zell-aktivierender Faktor) und sein Rezeptor (BAFF-R) wieder (Mackay & Schneider 2005).

BAFF ist ein Zytokin und wird in erhöhtem Maße bei Autoimmunerkrankungen produziert. Es ist u.a. für das Überleben der B-Zellen und deren Reifung verantwortlich. Bei Transplantierten findet es sich erhöht unter Patienten mit schlechteren Ergebnissen nach einigen Jahren (Xu et al. 2009) und es stellt sich die Frage nach einem Zusammenhang von pathologisch erhöhter Anzahl (autoreaktiver) B-Zellen und verringerter Transplantatakzeptanz. Somit wäre es evtl. auch möglich, die Überlegungen und Ergebnisse vom Autoimmun- zum Alloimmunitäts- Kontext zu transferieren.

Als ein weiterer möglicher Parameter zur Überwachung des Transplantatüberlebens haben speziell die regulatorischen T-Lymphozyten (Tregs) eine besondere Bedeutung. Sie kontrollieren die Immunantwort bspw. durch Unterdrückung von Effektor- CD4+ Zellen oder zytotoxischen CD8+ Zellen, außerdem Antigen-präsentierenden Zellen und B-Zellen. Sie sind somit potente Inhibitoren - in erster Linie der T- Zell- Aktivierung - und wichtig in der Auslösung einer Unempfindlichkeit gegenüber Alloantigenen (Karczewski et al. 2009). In Mäusen wurde eine BAFF-R Expression auf Tregs festgestellt (Ng et al. 2004), woraus sich die Frage ergibt, inwiefern das BAFF/ BAFF-R- System einen Einfluss auf die Treg Homöostase im Menschen ausübt.

Die derzeitig überwiegend angewandte Immunsuppressionskombination (s.o.) richtet sich in erster Linie gegen T-Zellen beeinflusst aber dennoch auch die B-Zellen (Banas 2008). Darum sollen die eben vorgestellten Populationen für sich, sowie im Zusammenhang betrachtet werden. Bisher ist dies so noch nicht geschehen. Ein gezieltes Monitoring spezieller Zellen des Immunsystems und deren Regulation anhand der Betrachtung der Lymphozyten und deren Subpopulationen [incl. regulatorischer T- Zellen und des B-Zell aktivierenden Faktors (BAFF)] im Kontext mit klinischen Parametern könnte Aufschluss über die Transplantatfunktion, die Auswirkungen der Therapie und evtl. die Richtung der weiteren Steuerung geben.

Die Erforschung solcher Prozesse könnte im weitesten Sinne die Überwachung und Qualität der Therapie optimieren. Außerdem wäre es durch zusätzliche Erkenntnisse in Zukunft denkbar, die Therapie möglicherweise zu individualisieren und somit die Inzidenz von Abstoßungsreaktionen nach Nierentransplantationen zu verringern. Wichtig hierzu ist das bessere Verständnis der Regulation des adaptiven Immunsystems und der Toleranzentwicklung gegenüber dem erhaltenen Organ.

1.2 Lymphozytensubpopulationen

Leukozyten, auch weiße Blutkörperchen genannt, bilden das zelluläre Immunsystem. Zu Ihnen zählen u.a. Granulozyten, Monozyten, Makrophagen und dendritische Zellen, welche dem angeborenen, nicht adaptiven Immunsystems angehören, sowie Lymphozyten, die sich zu B- und T-Lymphozyten (im Folgenden B- und T-Zellen) differenzieren und einen Teil der erworbenen, spezifischen Abwehr darstellen (Rieber 2008).

Im Folgenden werden die in dieser Arbeit schwerpunktmäßig betrachteten Lymphozytensubpopulationen näher beschrieben:

1.2.1 B-Zellen

B-Zellen sind Träger der spezifischen humoralen Immunabwehr. Sie differenzieren sich nach Aktivierung zu Gedächtniszellen und Antikörper (Immunglobulin, Ig)-sezernierenden Plasmazellen. Antikörper zirkulieren im Blut, binden ihr spezifisches Antigen bei Kontakt und zerstören dies. Des Weiteren sind B-Zellen (im Folgenden gleich gebraucht mit CD19+ Zellen) in der Lage, Zytokine herzustellen, wie z.B. *Transforming Growth Factor* TGF- β oder Interleukine wie IL-10 und IL-12. Außerdem können sie als Antigen-präsentierende Zellen die CD4+ T-Helferzellen aktivieren und es sind Interaktionen mit dendritischen Zellen und regulatorischen T-Zellen beschrieben (Banas 2008, Welsch 2006).

Die Rolle der B-Zelle in der Transplantatabstoßung bzw. Toleranz ist bisher nicht ausreichend geklärt. Es scheint sich um ein vulnerables Gleichgewicht zu handeln, da B-Zellen sowohl eine herausragende Rolle bei der Infiltration und Effektorfunktion in der Transplantatabstoßung zu haben scheinen. Aber auch in der Akzeptanz bzw. Toleranz des transplantierten Organs sind sie ein wichtiger Einflussfaktor (Zarkhin et al., 2008). Mit zunehmendem Verständnis über die Rolle der B-Zellen im Transplantationskontext, wird die Notwendigkeit der Entwicklung spezifischerer, B-Zell gerichteter, immunsuppressiver Medikamente erkannt. Zu Beginn der Studie gab die Datenlage hierzu jedoch noch wenig Aufschluss. In Erprobung sind in der Behandlung von Autoimmunerkrankungen z.B. gegen CD20 gerichtete B-Zellantikörper oder Belimumab als BAFF-Inhibitor (Sabahi & Anolik 2006).

1.2.2 T-Zellen

T-Zellen stellen die „Träger der spezifischen zellulären Immunantwort“ dar (Neumayer et al. 2008, S.19). Sie wehren vor allem intrazelluläre Erreger (Viren, Mycobakterien) ab, sind an der Eliminierung von entarteten körpereigenen Zellen beteiligt und spielen eine wichtige Rolle bei der Regulation der Immunabwehr. Anhand verschiedener Oberflächenmoleküle können diese Lymphozyten weiter in CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen differenziert werden (Neumayer et al. 2008).

Regulatorische T-Zellen

Eine Population von CD4⁺ T-Zellen, welche die α -Kette des IL-2 Rezeptors (= CD25) exprimiert und für die Kontrolle von autoreaktiven T-Zellen verantwortlich ist, sind die sogenannten regulatorischen T-Zellen (Tregs). Forkhead-Box-Protein P3 (FoxP3) ist ein Transkriptionsfaktor, der speziell für die Differenzierung von CD4⁺ T-Effektorzellen zu den regulatorischen T-Zellen wichtig ist. Der intrazelluläre Nachweis von FoxP3 dient der Identifizierung dieser Tregs. In aktiviertem Zustand produzieren sie die Zytokine IL-10 und TGF- β , wodurch sie die T-Zell-Aktivierung in direktem Zell-Zellkontakt u.a. über *cytotoxic T-lymphocyte antigen* CTLA-4 inhibieren und so die T-Zell Immunantwort (Th1, Th2 und CD8⁺ zytotoxische T-Zell Reaktionen) regulieren. Vor allem bei der Kontrolle von autoreaktiven T-Zellen wird dieser T-Zell Subpopulation eine besondere Rolle zugeschrieben. Klinisch wird dies vor allem bei der Entwicklung und Therapie von Autoimmunerkrankungen oder allergischen Erkrankungen, sowie in der Organtransplantation relevant (Neumayer et al. 2008, Rieber 2008). Diesbezüglich wurde auch der Einfluss der gängigen Immunsuppression (die sich vorwiegend gegen T-Zellen richtet) auf diese für die Transplantatakzeptanz bedeutsame Subpopulation der T- Zellen von Demirkiran et al. (2008) zusammenfassend untersucht. Die spezifischen Effekte auf Tregs waren vor allem bei CNIs deutlich. Diese unterdrücken die FoxP3 Expression und somit die Entwicklung der immunsuppressiv aktiven Tregs. Mycophenolsäure und mTOR-Inhibitoren schienen im Gegensatz keinen nachweisbaren Effekt auf die regulatorischen T-Zellen auszuüben. Corticosteroide stimulieren laut Demirkiran et al. (2008) eher die FoxP3 Expression und T-Zell-depletierende Antikörper wie Campath sparen diese Population der T-Zellen eher aus.

1.3 B-Zell-aktivierender Faktor (BAFF) und sein Rezeptor (BAFF-R)

Der B-Zell-aktivierende Faktor, kurz BAFF (auch als TNFSF13B/ BLYS/ TALL1/ CD257 bekannt) ist ein homotrimeres Typ II Transmembranprotein (Mackay & Schneider 2009).

Er gehört zur Familie der TNF (Tumor Nekrose Faktor). Proteolytische Spaltung macht daraus ein lösliches Cytokin, welches als Trimer oder als Capsid-ähnliche Ansammlung von 20 Trimeren (ein 60-mer) an seine verschiedenen Rezeptoren (s. Abb.1) binden kann. BAFF wird vor allem von Makrophagen, dendritischen Zellen, Neutrophilen und Monozyten aber auch von T-Zellen und aktivierten B-Zellen gebildet.

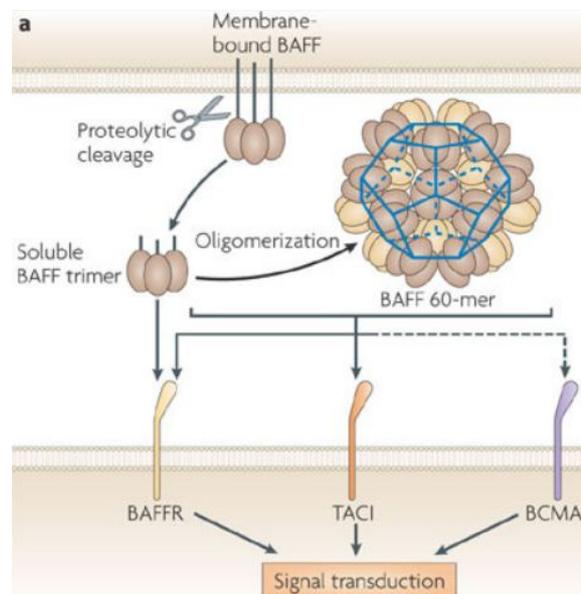


Abb. 1: BAFF und seine Rezeptoren (Mackay & Schneider 2009)

Seine Funktion umfasst in erster Linie das Regulieren des Überlebens peripherer B-Zellen und des Reifens von B-Zellen in der Milz sowie deren Aktivierung. Weiterhin spielt es eine wichtige Rolle bei der Entwicklung von Autoimmunität (Kalled 2005, Mackay & Schneider 2009). Letzteres zeigt sich z.B. durch Erhöhung von BAFF-Spiegeln bei Krankheitsbildern wie systemischem Lupus erythemathodes (Morimoto et al. 2007), Diabetes (Marino et al. 2009), Sjögrens Syndrom oder rheumatoider Arthritis (Sellam et al. 2007). Des Weiteren wird es vermehrt vorkommend bei Nierenversagen im Endstadium (Pahl et al. 2009) und verstärkter Abstoßungsreaktion (Xu et al. 2009) beobachtet.

Neben den autoimmunen Prozessen lässt sich außerdem bei B-Zelldepletion eine BAFF-Erhöhung feststellen. Verschiedene immunsuppressive Regime können zu reduzierten B-Zellzahlen führen, bspw. antiproliferative Medikamente wie MPA oder mTOR- Inhibitoren (Ganschow et al. 2001, Heidt et al. 2008, Mackay & Schneider 2009).

Aus diesen Befunden kann geschlossen werden, dass BAFF als geeigneter Angriffspunkt für gezielte Immunsuppression (Sabahi & Anolik 2006) in Frage kommen könnte. Mit Belimumab, welches sich gegen den B-Zell-Überlebensfaktor BAFF richtet, gibt es bereits Medikamente, die genau hier ansetzen. Es bindet BAFF und neutralisiert seine biologische Aktivität. Es resultiert eine verminderte B-Zellzahl und damit auch die Zahl der Antikörper produzierenden Plasmazellen (Roll & Tony 2009, Sabahi & Anolik 2006). Aus Untersuchungen von Le Pottier et al. (2007) ist zudem bekannt, dass anti-BAFF Antikörper in intravenösem Ig (IVIg) vorhanden sind. Dies führt u.a. durch Bindung von BAFF zur Aufhebung einiger seiner typischen Effekte. Die therapeutischen Konsequenzen sind jedoch noch nicht ausreichend erforscht.

BAFF kann an drei unterschiedliche Rezeptoren (BCMA/ TACI/ BAFF-R) binden. Sein Hauptrezeptor ist BAFF-R (auch BR3/ TNFRSF13C), welcher zugleich exklusiv für BAFF ist (Mackay & Schneider 2009). Er ist ein Typ III Transmembranprotein der TNF-Rezeptor-Familie und spielt in der BAFF/ BAFF-R Interaktion u.a. eine wichtige Rolle für die B-Zellentwicklung und deren Überleben. Dies geschieht über die Aktivierung des TRAF3/NF κ B- Signalweges (Mackay & Schneider 2009). BAFF-R wird auf B- und T-Zellen exprimiert (Kalled 2005, Mackay & Schneider 2009, Morimoto et al. 2007, Xu et al. 2009, Ye et al. 2004), wobei es bezüglich der Expression auf T-Zellen bisher nur wenig Daten aus Mausexperimenten (Ng et al. 2004) oder seltenen humanexperimentellen Untersuchungen (Huard et al. 2001, Morimoto et al. 2007, Xu et al. 2009) gibt. Zum Zeitpunkt der Vorversuche lagen hinsichtlich humaner bzw. pädiatrischer BAFF- und BAFF-R exprimierender Lymphozyten kaum Angaben vor. BAFF-R wurde im Zusammenhang mit hohen Serum BAFF-Spiegeln bspw. bei Patienten mit sehr eingeschränkter Nierenfunktion (= ESRD, Pahl et al. 2009) und in Autoimmunerkrankungen wie Sjögren-Syndrom oder Rheumathoider Arthritis (Sellam et al. 2007) als vermindert exprimiert beobachtet.

1.4 Zielsetzung der Arbeit

Aus Daten zu erwachsenen Patienten ist bekannt, dass erhöhte BAFF-Spiegel mit einem schlechteren Verlauf nach Nieren- oder Knochenmarkstransplantation einhergehen (bspw. Xu et al. 2009). In einer Querschnittsuntersuchung am pädiatrischen nierentransplantierten Patientenkollektiv im Vergleich mit einer gesunden Kontrollgruppe soll diese Annahme genauer untersucht werden. Dazu wurde die Verteilung von B-Zellzahlen, Serum BAFF-Spiegeln, BAFF-R-Expression auf Lymphozyten und regulatorischen T-Zellen analysiert. Zusätzlich sollte eine Korrelation zu klinischen und Laborparametern untersucht werden. Durch Rückschlüsse aus den dadurch gewonnenen Ergebnissen wurden vor allem Hinweise zur Beantwortung folgender Fragen erwartet:

- Gibt es einen Unterschied in B- Zellen, Tregs, BAFF oder BAFF-R zwischen gesunden Kindern und nierentransplantierten?
- Wie korrelieren die gemessenen Parameter mit Laborwerten bzw. der Klinik der Patienten?
- Beeinflusst die Immunsuppression der Patienten auch B-Zellen?
- Wie verhalten sich die Tregs mit Zeit nach Transplantation und im Zusammenhang mit der Transplantatfunktion?
- Gehen hohe BAFF-Spiegel mit schlechter Transplantatfunktion einher?
- Welchen Einfluss hat ein eventuell dysreguliertes BAFF/ BAFF-R-System unter den Transplantierten auf den Immunglobulin-Haushalt?
- Gibt es Zusammenhänge zwischen BAFF/ BAFF-R und humanen Tregs?
- Eignen sich einzelne der gemessenen Immunparameter als prognostische Marker?

2 Material & Methoden

2.1 Deskriptive Daten der untersuchten Probandengruppen

Untersucht wurden $n = 43$ infektfreie, nierentransplantierte Kinder und Jugendliche im Alter von 2-18 Jahren (Median 12,3 J.). Erkrankungen, die der Transplantation zu Grunde lagen, waren: kongenitale Anomalien der Nieren und des Harntraktes ($n = 26$), Erkrankungen des Nephronophysekreises ($n = 5$), Steroid resistentes Nephrotisches Syndrom ($n = 4$), autosomal rezessive polyzystische Nierenerkrankung ($n = 4$), Glomerulonephritis ($n = 2$) und hämolytisch urämisches Syndrom ($n = 2$), vgl. Anhang, Tab. 1.

Als Kontrollen wurden $n = 22$ Kinder und Jugendliche untersucht, die in der Aufnahme der Abteilung für Kinder- und Jugendmedizin der untersuchenden Einrichtung vorstellig wurden (bspw. aufgrund Hydronephrose, Vesikoureteralen Refluxes oder Obstipation). Zum Zeitpunkt der Blutentnahme wiesen diese keine klinischen Anzeichen eines Infektes auf, waren anamnestisch frei von immunologisch relevanten Erkrankungen und ohne Nierenfunktionseinschränkung. Der Altersmedian unterschied sich nicht signifikant von dem der Patienten.

2.1.1 Nierentransplantierte Patienten

Die Gruppe der nierentransplantierten Kinder- und Jugendlichen (= Transplantierte) lässt sich des Weiteren folgender Maßen charakterisieren:

Die Zeit nach Transplantation (Tx) betrug zum Zeitpunkt der Blutentnahme im Median 3,9 Jahre, dabei wurden sowohl Patienten unmittelbar nach Transplantation (Minimum der Zeit nach Tx: 0,1 Jahr) als auch solche mit über 10 Jahre zurückliegendem Ereignis (Maximum bei 12,4 Jahren) untersucht. Die immunsuppressive Therapie erfolgte größtenteils durch Kombinationen von Steroid, Calcineurin-Inhibitoren und Mycophenolsäure. $N = 17$ Patienten erhielten steroidfreie Immunsuppression, $n = 3$ ein mTOR-Inhibitor enthaltendes Regime. $N = 4$ waren kombiniert Leber- und Nierentransplantiert. Diese Besonderheit wird später trotz der geringen Populationsgröße zum Aufzeigen evtl. vermuteter Effekte gesondert betrachtet.

Alle beteiligten Probanden wurden ihrer Indikation entsprechend über den Inhalt der Studie aufgeklärt und ihr Einverständnis schriftlich eingeholt. Ein positives Votum der Ethikkommission der Ärztekammer Hamburg lag vor.

2.2 Methoden

Der folgende Abschnitt beschreibt die Vorgehensweise zur Etablierung der Methode, die bei der Messung von Tregs sowie BAFF und seinem Rezeptor in EDTA- Vollblut bzw. im Serum angewandt wurde. Informationen zu den verwendeten Materialien, die Zusammensetzung von Puffern und Medien, sowie Herstellerangaben finden sich im Anhang (s. Abschnitt 6., ab S. 34).

Etablierung der Methode

Zur Messung von BAFF und BAFF-R auf Lymphozyten wurde zunächst eine geeignete Methode etabliert (siehe 2.2.1-2.2.2). Änderungen oder Variationen dieses Vorgehens werden im Folgenden beschrieben. Zur Etablierung wurden zunächst optimale Dosierungen der BAFF und BAFF-R Antikörper getestet und genauer untersucht, auf welchen Lymphozyten diese Moleküle exprimiert werden. Für diese Vorversuche wurde Blut von zwei gesunden, erwachsenen Kontrollprobanden und Blut einer Patientin mit Lupus erythematodes¹ zur Klärung der nachfolgenden Bedingungen und offenen Fragen in verschiedenen Tests untersucht. Hierfür wurden die Blutproben prinzipiell über Ficoll- Dichtegradientenseparation getrennt, die Lymphozyten entnommen und in eine 96-Wellplatte überführt. Dort wurden sie mit den entsprechenden Antikörpern für 30min bei 4°C inkubiert und schließlich im FACS- Gerät analysiert.

Messung von B-Zellen, regulatorischen T-Zellen, BAFF und BAFF-R

Die nach eingehender Vorarbeit etablierten Methoden konnten nun mit Blut bzw. Seren der Probandengruppen durchgeführt werden.

Die Bestimmung der BAFF- Konzentrationen im Serum erfolgte mittels ELISA – Analyseverfahren. Anschließend war die Erfassung von B-Zellen, Tregs und der BAFF-R Expression per FACS- Analyse möglich. Zur Messung des BAFF-R wurde die mean fluorescence intensity (MFI) als Quantifizierungsmittel genutzt. Sie beschreibt das Mittel der gemessenen Intensität der Fluoreszenz und dient im Rahmen dieser Arbeit zur Angabe der Häufigkeit des Rezeptors auf B-Zellen.

¹ Von SLE ist aus verschiedenen Artikeln bereits bekannt, dass BAFF dabei besonders erhöht vorkommt. (z.B. Morimoto et al. 2007).

Nach zusätzlicher Permeabilisierung im Rahmen der Zellaufbereitung für die FACS-Messungen war es zudem möglich, auch den Anteil regulatorischer T-Zellen an der Gesamtlymphozytenpopulation zu bestimmen..

2.2.1 Probenaufbereitung

begleitende Versuche zur Auswertbarkeit der FACS- Daten

Bestimmung der relativen und absoluten Leukozytenpopulationen

Um die Leukozyten in ihrer Zahl und prozentualem Anteil an der jeweilig untersuchten Probe zu erfassen, wurden Blutausstriche angefertigt und anschließend unter dem Mikroskop das Vorkommen von Granulo-, Mono- und Lymphozyten auf 100 Leukozyten ausgezählt. Später konnten so die Prozent-Angaben der FACS-Analysen auf den relativen Anteil der Lymphozyten in der Probe bezogen werden. Für absolute Zellwerte wurden die Leukozyten in der EDTA-Blutprobe bestimmt (s.u.) und ebenfalls die Angaben der FACS- Analysen darauf bezogen. Berechnungen wurden über Excel® erstellt und die Angaben aus den Analysen so verwertbar gemacht.

Anfertigung von Blutausstrichen

Zunächst wurde ein Tropfen von ca. 4µl EDTA-Blut aus den jeweils zu untersuchenden Proben entnommen und mit Hilfe eines Deckgläschens auf einem Objektträger ausgestrichen. Nach Trocknen der Präparate erfolgte die Färbung zur späteren Auszählung der Leukozyten anhand der May- Gruenwald/ Giemsa-Färbung (auch Methode nach Pappenheim). Dazu wurden die Objektträger mit May-Gruenwald Lösung bedeckt und dieses 3min inkubiert, anschließend mit Aqua dest. gespült und es folgte die Färbung mit Giemsa-Gebrauchslösung für 20min. Im Anschluss konnten die verschiedenen Bestandteile des Blutes unter dem Lichtmikroskop in unterschiedlichen Einfärbungen nach morphologischen Kriterien zur Auszählung differenziert werden.

Bestimmung der Gesamtheit der Leukozyten pro Blutprobe

Der EDTA-Blutprobe wurden 10µl entnommen und diese mit 90µl Türks-Lösung vermischt, anschließend 10µl dieser gefärbten Zelllösung in eine NEUBAUER-Zählkammer appliziert und ausgezählt. Türks-Lösung färbt Zellkerne, was das Bestimmen der absoluten Leukozytenzahl möglich machte.

Vorbereitung der Proben zur FACS- Messung

Lymphozytenseparation

Die Lymphozytenseparation aus der zu untersuchenden Probe EDTA-Vollblutes erfolgte über eine Ficoll-Dichtegradienten Auftrennung. Dazu wurden 5ml Ficoll in ein 15ml Zentrifugenröhrchen überführt und im Anschluss mit ca. 6-8 ml (entsprechend der gewonnen Probenmenge) EDTA-Blut langsam überschichtet. Durch die folgende Zentrifugation (bei 1500rpm, 20min, ohne Bremse) des Röhrchens ergab sich eine Schichtung der einzelnen Bestandteile nach Dichtegradient [unten: abzentrifugierte Erythrozyten, überschichtet von Interphase mit Lymphozyten (weißer Ring), oben auf: Überstand]. Daraufhin wurde der Lymphozytenring abpipettiert und separiert, sowie im Anschluss zweimalig mit Medium 199 gereinigt und zentrifugiert (1500rpm, 5min bei Raumtemperatur², mit Bremse).

Bestimmung des Gehalts intakter Leukozyten

Der Zellsuspension nach Ficoll-Auftrennung und folgender Reinigung wurden 10µl entnommen und mit 90µl Trypanblau vermischt, anschließend 10µl dieser gefärbten Zelllösung in eine NEUBAUER-Zählkammer appliziert und ausgezählt. Die Verwendung von Trypanblau dient hierbei der Unterscheidung von lebenden und toten Zellen.

Im Anschluss an die Bestimmung des Gehaltes an intakten Leukozyten in der gereinigten Probe wurden die Zellen auf eine 96-Wellplatte überführt. Abhängig vom Zellgehalt der Probe erfolgte die Verteilung zu jeweils optimaler Weise 100µl Zellsuspension/ Well. Dabei sollte eine Mindestzellzahl von 1×10^5 Zellen/Well vorhanden sein. Durch Zentrifugation der 96-Wellplatte und folgendem Entfernen des Überstandes wurden die Leukozyten zur Antikörperfärbung erhalten.

Färbung oberflächlicher Epitope

In jedes mit Zellen gefüllte Well wurden nun jeweils 20µl Immunglobulin zur Blockierung unspezifischer Bindungsstellen pipettiert. Es folgte die Verteilung der Antikörper auf die entsprechenden Wells (Pipettierschema s. Anhang, Tab. 7) und anschließende Inkubation der Proben bei 4°C für 30min.

Schließlich konnten die nun mit fluoreszenzmarkierten Antikörpern inkubierten Zellen in zwei Waschsritten (Zugabe von je 100µl FACS-Waschmedium/Well und

² Im Folgenden soll von den hier angegebenen Zentrifugationsbedingungen (ohne Bremse) ausgegangen werden, sofern keine anderen Informationen angegeben sind.

anschließende Durchmischung auf dem Mixmate für 30sec, Zentrifugation und anschließendes Verwerfen des Überstandes) gereinigt, in jeweils 300µl FACS-Waschmedium aufgenommen und dann am FACS-Canto® Gerät gemessen werden.

Die Zellen, in denen intrazelluläre Marker detektiert werden sollten, verblieben an dieser Stelle auf der Wellplatte und wurden in den im Folgenden beschriebenen Schritten für die intrazelluläre Färbung permeabilisiert.

Permeabilisierung

Der Schritt der Permeabilisierung innerhalb der Aufbereitung der Lymphozyten für die Antikörperfärbung und anschließende FACS- Messung wird erforderlich, sofern intrazelluläre Bestandteile gemessen werden sollen. In diesem speziellen Fall handelt es sich bei den als CD4+CD25+FoxP3+ definierten regulatorischen T- Zellen bezüglich des FoxP3 um einem Transkriptionsfaktor (vgl. 1.2.1, Tregs), der intrazellulär vorkommt und dort durch die entsprechenden fluoreszenzmarkierten Antikörper gebunden wird.

Um die Zellen für die intrazellulären Antikörper zugänglich zu machen, müssen sie zunächst permeabilisiert werden. In diesem Experiment wurde dafür *FoxP3 Fix/Perm Buffer Set* von BioLegend verwendet. Jedes Zellpellet/ Well wurde mit 100µl *Fix/Perm-Buffer* (in Verdünnung 1:4) gemischt und anschließend bei 4°C für 20min inkubiert. Dann wurde die 96-Wellplatte zentrifugiert, der Überstand verworfen, die Pellets in je 100µl *Perm-Buffer* (in Verdünnung 1:10) resuspendiert und schließlich bei Raumtemperatur 15min im Dunkeln inkubiert. Es folgte eine weitere Zentrifugation mit Verwerfung der überstehenden Flüssigkeit.

Färbung intrazellulärer Bestandteile (FoxP3)

Die Pellets wurden in diesem Schritt nochmals in je 100µl *Perm-Buffer* (1:10) resuspendiert und zu dieser Lösung in die jeweiligen Wells die intrazellulären Antikörper appliziert. Eine Inkubationszeit von 30min bei Raumtemperatur folgte, woraufhin sich eine Zentrifugation anschloss und letztlich die antikörpermarkierten Pellets in 100µl FACS-Waschmedium gelöst und am FACS-Canto™ Durchflusszytometer gemessen werden konnten.

2.2.2 FACS

Analyse und Auswertung der FACS- Daten

Nach den Messungen am FACS- Canto™ (BD) Messgerät wurden die Proben mit der FACS- Diva™ (BD) Software in Dichteplots und Histogrammen dargestellt sowie analysiert und statistisch ausgewertet. Die gemessenen Anteile der jeweiligen Lymphozytensubpopulationen bezogen sich dabei auf ein zu Beginn jede Messung definiertes Lymphozyten(CD45+)-Gate, welches gleich 100% gesetzt wurde. Die Ergebnisse wurden entsprechend der ausgezählten relativen und absoluten Zellzahlen pro Probe berechnet und schließlich in einem Tabellenkalkulationsprogramm (Excel®) erfasst, um sie dann zur Auswertung mittels Statistikprogramm (SPSS®) vorzubereiten.

2.2.3 ELISA

Zur Bestimmung der BAFF-Serumspiegel (in pg/ml) wurden Analysen von bei Blutentnahme direkt abgeserten und eingefrorenen (-20°C) Serumproben mit Hilfe des *Quantikine® Human BAFF/BLyS Immunoassay Kit* [Catalog-Nr. DBLYS0 von R&R Systems®, Minneapolis, (USA)] lt. beiliegender Anleitung [*Quantikine® Human BAFF/BLyS Instruction Manual*, R&R Systems® Inc., MN, USA (2008)] durchgeführt.

Die Extinktionen der zu untersuchenden Proben auf der 96-Well-Platte wurden am infinite® M200 Microplatten Lesegerät [TECAN Group Ltd., Männenberg (CH)] gemessen und mit der Software Magellan™ 6 (TECAN) analysiert und ausgewertet. Es erfolgten jeweils für alle Proben Doppelbestimmungen, die anschließend gemittelt wurden.

2.2.4 Erhebung weiterer Parameter

Die klinischen Daten der nierentransplantierten Patienten wurden den jeweiligen Unterlagen der Akten des betreuenden Zentrums für pädiatrische Nephrologie entnommen. Des Weiteren wurden Angaben wie Grunderkrankung, Zeitpunkt und Verlauf nach Transplantation etc. in einer für diese Studie angelegten Datenbank aufgenommen.

Die Quantifizierung der Immunglobulin- Subklassen erfolgte durch Nephelometry (nach Kemper et al. 1997). Die Auswertung der Messungen erfolgte durch Abgleich mit den Referenzwerten des durchführenden Labors.

Der Beschreibung der Transplantatfunktion diene die GFR. Sie wurde basierend auf der Cystatin C Konzentration im Serum anhand der Filler Formel berechnet (Filler & Lepage 2003) und die Transplantatfunktion in gut ($GFR > 60 \text{ ml/min/1,73m}^2$) und eingeschränkt ($GFR < 60 \text{ ml/min/1,73m}^2$) unterteilt.

2.3. Statistik

Die Analyse der Daten zur statistischen Auswertung erfolgte mit Hilfe des Programms SPSS 15.0 für Windows® [SPSS Inc., München (D)], die grafischen Darstellungen wurden mit PRISM 5 [GraphPad Software, La Jolla, CA (USA)] erstellt.

Es wurden Mittelwertsunterschiede bei unabhängigen Variablen mit zwei Ausprägungen betrachtet. Deswegen kam der *t*-Test für unabhängige Stichproben zum Einsatz. Die Forderungen nach Varianzgleichheit und normalverteiltem Populationsparameter waren in allen Fällen erfüllt und werden dadurch nicht weiter diskutiert.

Zusammenhangshypothesen wurden mit Hilfe von Korrelationsanalysen nach Spearman und Pearson überprüft.

In allen Analysen wurde 2-seitig in Bezug auf ein α -Niveau von 0,05 getestet.

3. Ergebnisse

3.1 Lymphozyten und ausgewählte Subpopulationen ³

Die absoluten Lymphozytenzahlen unterschieden sich zwischen Transplantierten und Kontrollen nicht signifikant. Es ist also bei der Betrachtung der Anteile der einzelnen, speziellen Populationen davon auszugehen, dass annähernd gleiche Ausgangszahlen vorliegen (vgl. Anhang, Tab. 2).

3.1.1 B-Zellen

Die B-Zellzahl und deren relativer Anteil an der Gesamtzahl der Lymphozyten war - wie in Abb. 2 zu erkennen- signifikant niedriger als die der Kontrollen ($11 \pm 5\%$ vs. $17 \pm 5\%$, $p < .001$).

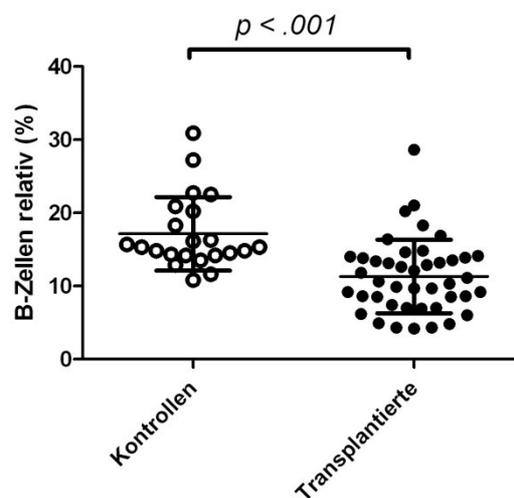


Abb. 2: Gruppenvergleich hinsichtlich des Anteils an CD19+ B- Zellen(%)

Die gemessenen Werte der Kontrollen liegen im Mittel alle im altersentsprechend gültigen Normbereich (Erkeller-Yuksel et al. 1992). Auffällig ist eine verringerte relative wie absolute Zahl B-Lymphozyten unter den Transplantierten gegenüber den Normwerten, was sich auch durch die Ergebnisse der Kontrollgruppe bestätigt. Unter 3 von 43 Patienten war eine Lymphopenie (vgl. Normalwerte in Tab. 2) zu verzeichnen. Die Gruppe der Transplantierten wurde zusätzlich hinsichtlich ihres Immunglobulinstatus untersucht. Es fand sich kein Hinweis auf signifikante

³ Es fanden sich keine signifikanten Ergebnisse hinsichtlich geschlechtsspezifischer Unterschiede innerhalb der untersuchten Kollektive, so dass dies im Folgenden nicht mehr zusätzlich Erwähnung findet.

Immunglobulinmangel oder –überproduktion, bezogen auf altersentsprechende Normwerte (vgl. Anhang, Tab. 2).

3.1.2 Regulatorische T-Zellen (Tregs)

Unter den CD4+ T-Zellen fand sich bei den Transplantierten ein verminderter Anteil ($1,1 \pm 0,7\%$ vs. $1,6 \pm 0,8\%$, $p = .013$) regulatorischer T-Zellen gegenüber der Kontrollgruppe, dargestellt in Abb. 3. Abb. 4 zeigt eine repräsentative Darstellung der FoxP3 positiven CD4+ T-Zellen im FACS Plot.

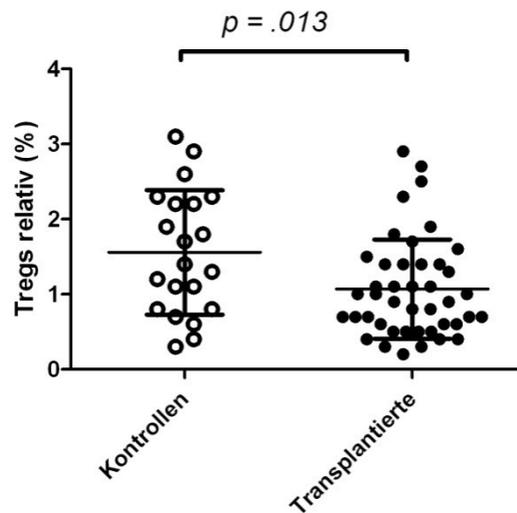


Abb. 3: Gruppenvergleich in Bezug auf den Anteil regulatorischer T- Zellen (%)

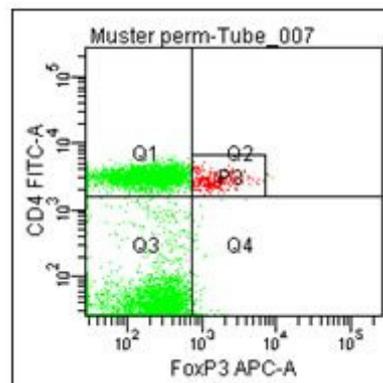


Abb. 4: CD4+ FoxP3+ Tregs (rot), repräsentatives 2 Farben FACS Plot

3.2 BAFF

Die BAFF-Spiegel im Serum der Transplantierten waren im Vergleich zur Kontrollgruppe signifikant höher (1375 ± 417 vs. 894 ± 189 pg/ml, $p < .001$), vgl. Abb.5. Einen BAFF- Spitzenspiegel von 4013 pg/ml erreichte ein transplantiertes Patient mit bekannter schwieriger Klinik, sehr schwacher Restnierenfunktion post Transplantation (GFR von 23 ml/min) und umfangreicher Immunsuppression (u.a. mTOR-Inhibitor enthaltend). Er ist aufgrund verschiedener Ausschlusskriterien nicht Teil der Analysen und wird gesondert diskutiert.

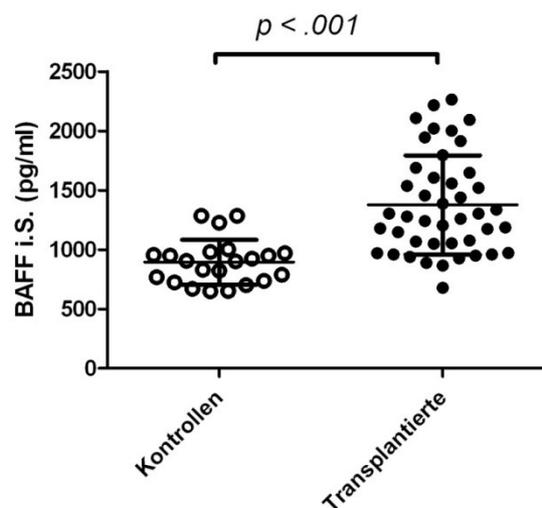


Abb. 5: Vgl. der untersuchten Gruppen in Bezug auf BAFF- Spiegel im Serum in pg/ml

Die Einteilung der Kohorte nach ihrer Transplantatfunktionsleistung (GFR) in 2 Gruppen [GFR > 60 ml/min/1,73m² ($n= 26$; Mittelwert GFR= 83 ±14 ml/min/1,73m²); GFR < 60 ml/min/1,73m² ($n= 16$; Mittelwert GFR= 43 ±10 ml/min/1,73m²)], zeigte (s. Abb.6), dass in der Gruppe mit chronischer Transplantatdysfunktion (GFR < 60 ml/min/1,73m²) signifikant höhere BAFF-Spiegel im Serum messbar waren ($p = .041$). Die B-Zellen unterschieden sich in den gebildeten Gruppen durch diese Aufteilung nicht signifikant (*n.s.*) [Mittelwert CD19+ (c/μl): GFR > 60 ml/min/1,73m² = 272 (SD ±223); GFR < 60 ml/min/1,73m² = 186 (SD ±84); bzw. 12 ±6 vs. 11 ±4%, *n.s.*].

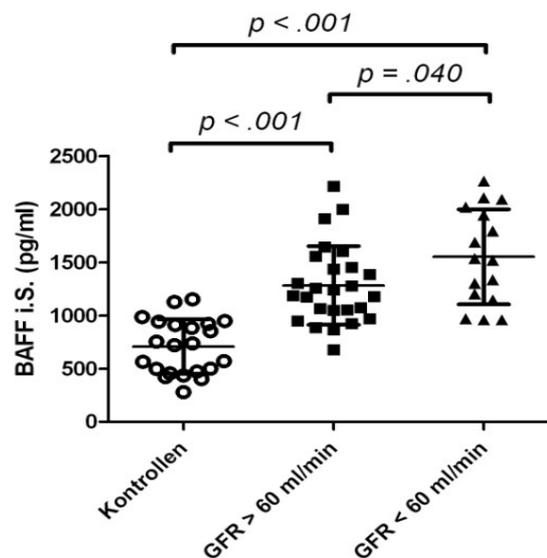


Abb. 6: Vergleich des BAFF Spiegels im Serum (pg/ml) zw. Kontrollen, Patienten mit Transplantatdysfunktion und ohne [GFR>60ml/min/1,73m²= 1283 pg/ml (SD ±370); GFR<60 ml/min/1,73m²= 1553 pg/ml (SD ±447); $p= .040$]

Serum BAFF (pg/ml) von kombiniert Transplantierten

Die kleine Kohorte der kombiniert Leber- und Nierentransplantierten Patienten hatte mit ausschließlich Nierentransplantierten vergleichbare BAFF- Spiegel (1510 ± 696 vs. 1361 ±390 pg/ml, *n.s.*).

BAFF (MFI) in der FACS-Analyse auf B- und T-Zellen

Es konnte kein BAFF+ (MFI) auf B- und T-Zellen, weder bei Messung nach Protokoll (vgl. Methode 2.2.2), noch nach Stimulation der Lymphozyten oder Permeabilisierung in der FACS- Analyse gemessen werden.

3.3 BAFF-Rezeptor

Die durchgeführten Experimente ergaben lediglich Ergebnisse für eine BAFF-R Positivität auf B-Zellen, wie in Abb. 7 dargestellt. Auf T-Zellen ließ sich bei keinem der Probanden BAFF-R nachweisen (s. Abb.8).

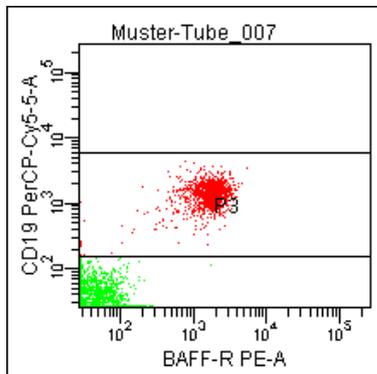


Abb. 7: BAFF-R+/CD19+ (rot), repräsentatives 2 Farben FACS Plot

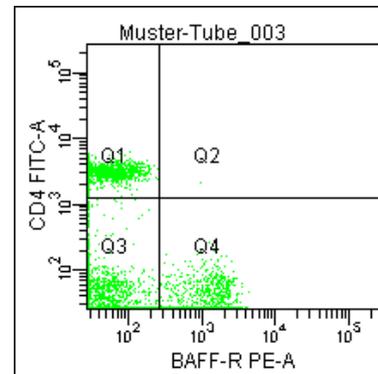


Abb. 8: kein BAFF-R auf T- Zellen, repräsentatives 2 Farben FACS Plot

Abb. 9 zeigt die in der FACS- Analyse erhobene, signifikant geringere BAFF-R Expression auf B-Zellen im Gegensatz zur Kontrollgruppe (539 ± 334 vs. 707 ± 257 MFI, $p = .0427$).

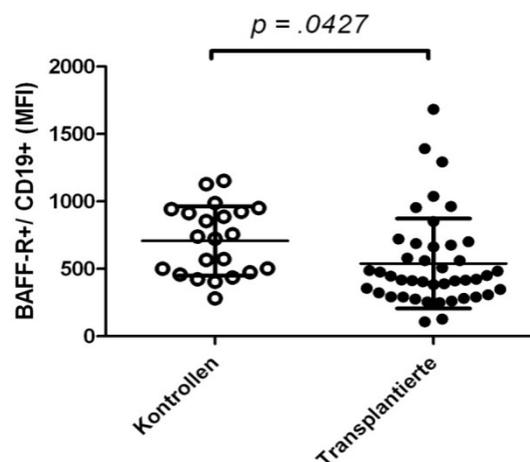


Abb. 9: Vgl. der untersuchten Gruppen in Hinblick auf BAFF-R Expression (MFI) auf B-Zellen

3.4 Korrelationen

Es wurden innerhalb der Kohorte der transplantierten Patienten mögliche Zusammenhänge von experimentell erhobenen und klinischen Parametern durch Korrelationsanalysen getestet.

B- Zellen

Es fand sich keine Korrelation zwischen B-Zellen und BAFF oder B-Zellen und GFR.

Tregs

Ein hoher Anteil regulatorischer T-Zellen fand sich bei langer Zeit nach Transplantation ($r = .381$; $p = .012$), s. Abb. 10. Die Zahl der Tregs korrelierte mit derjenigen der B- Zellen ($r = .477$; $p = .001$), wie in Abb. 11 gezeigt. Tregs korrelierten invers mit BAFF ($r = -.337$; $p = .027$), vgl. Abb. 12.

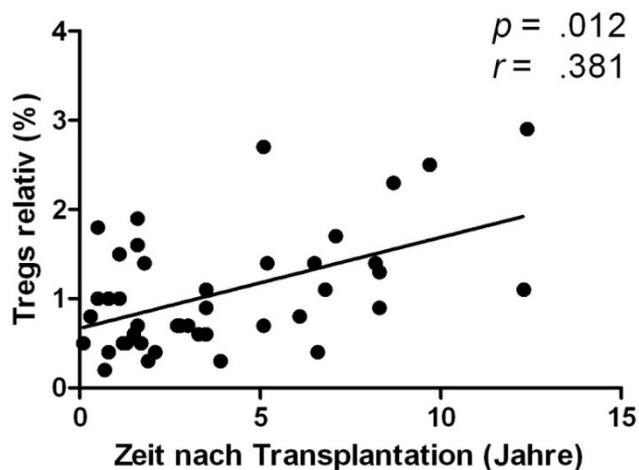


Abb. 10: Korrelation Zeit nach Transplantation mit Anzahl der Tregs

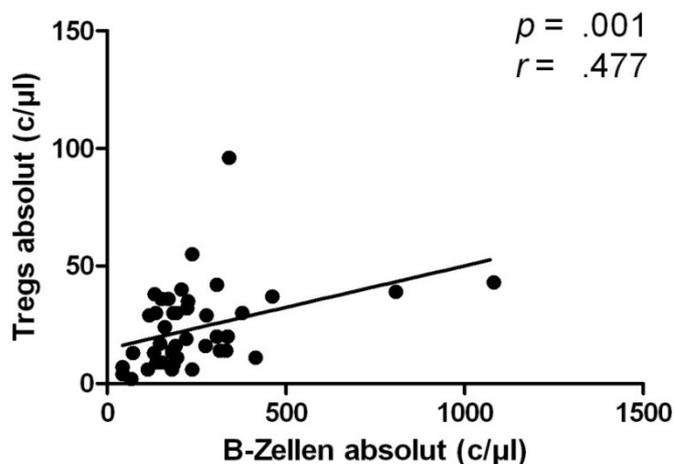


Abb. 11: Korrelation B-Zellzahl mit Anzahl Tregs

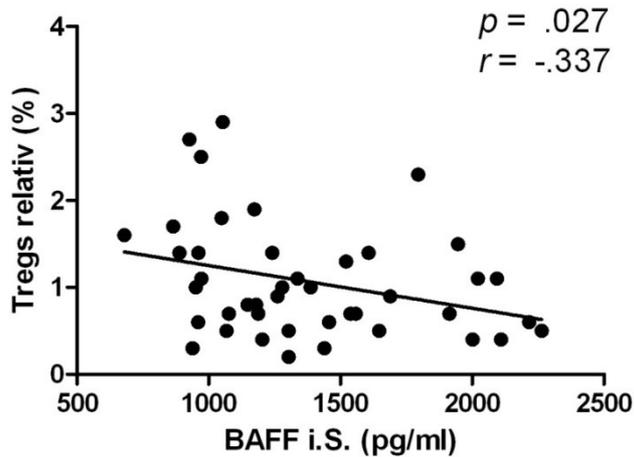


Abb. 12: Inverse Korrelation BAFF mit Anteil Tregs

BAFF und BAFF-R

Hohe BAFF- Spiegel im Serum gingen mit niedriger BAFF-R Expression auf B-Zellen einher ($r = -.503$; $p < .001$), s. Abb. 13.

Ein Zusammenhang zwischen BAFF und der absoluten Zahl an B- Zellen konnte in diesen Experimenten nicht gezeigt werden. Es fand sich keine signifikante Korrelation. Innerhalb der Transplantierten ($n = 43$) findet sich auch keine signifikante Korrelation zwischen GFR und BAFF-Spiegel im Serum.

Es wurde kein Zusammenhang für BAFF/BAFF-R in Bezug auf Alter oder Zeit nach Transplantation gefunden.

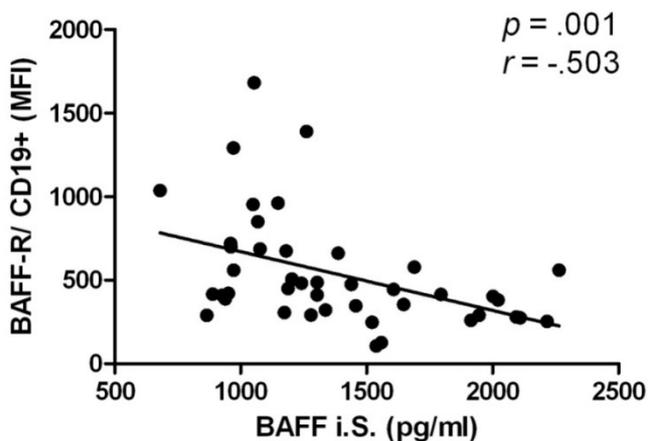


Abb. 13: Inverse Korrelation BAFF im Serum mit BAFF-R auf B-Zellen

Serum BAFF (pg/ml) in Abhängigkeit der Immunsuppression

Die Frage, ob sich die Mittelwerte für BAFF- Spiegel im Serum der verschiedenen immunsuppressiven Kombinations-Gruppen (vgl. Anhang, Tab. 1) voneinander unterscheiden, ergab folgende Ergebnisse: Die Kombination von Steroid+ CNI+ MPA/Aza hat keinen signifikanten Unterschied in der BAFF-Konzentration im Serum der Transplantierten gegenüber steroidfreier (CNI+ MPA/Aza) Immunsuppression ergeben (1315 ± 404 pg/ml vs. 1388 ± 388 pg/ml; *ns.*). Patienten ($n = 3$), die eine mTOR-Inhibitor verwendende Therapie (MPA/Aza+ mTOR-I.) erhielten, zeigten sehr hohe BAFF-Spiegel im Gegensatz zu Regimen ohne mTOR-I. (1867 ± 478 pg/ml), ihre GFR betrug im Mittel 47 ± 23 ml/min/1,73m². Außerdem ließ sich feststellen, dass in einer Gruppe Patienten mit über längeren Zeitraum stabiler Transplantatfunktion (>5 Jahre) und geringer Dosis an Immunsuppression 4 Personen mit sehr hohen BAFF-R Expressionen (MFI > 900) waren, unter denen sich zudem die höchsten T-regs und B-Zellzahlen finden ließen.

4. Diskussion

In der vorliegenden klinischen Querschnittsstudie wurden Unterschiede in bestimmten Lymphozytensubpopulationen sowie Tregs, BAFF und BAFF-R bei pädiatrischen, nierentransplantierten Patienten und gesunden Kontrollpatienten untersucht. Die Analysen zeigten, dass Transplantierte und Kontrollen bei vergleichbaren absoluten Lymphozytenzahlen signifikant höhere BAFF-Spiegel aufwiesen. Es präsentierte sich jedoch eine signifikante Reduktion der B-Zellen und der regulatorischen T-Zellen im Gegensatz zu gesunden Kontrollen. Die BAFF-R-Expression auf B-Zellen war signifikant vermindert. Unter den Transplantierten waren höhere BAFF- Spiegel unter denjenigen mit einer GFR < 60 ml/min/1,73m² gegenüber den Patienten ohne Transplantatdysfunktion (GFR > 60 ml/min/1,73m²) zu beobachten. Die B-Zellen unterschieden sich hier nicht. Trotz verminderter B-Zellen unter den Transplantierten fanden sich keine Immunglobulindysregulationen. BAFF korrelierte signifikant invers mit der BAFF-R Expression auf B-Zellen. Außerdem zeigte sich, dass eine Verringerung der Anzahl regulatorischer T-Zellen mit einer reduzierten Zahl an B-Zellen, sowie hohen BAFF- Spiegeln einher ging. Zudem fand sich ein relativ hoher Anteil regulatorischer T-Zellen mit längerer Zeit nach Transplantation.

Im Folgenden sollen diese Ergebnisse detailliert diskutiert werden.

4.1 B-Zellen

Es konnte in der vorliegenden Arbeit gezeigt werden, dass die B-Zellen von Transplantierten signifikant niedriger sind, als die der Kontrollen. Die B-Zellzahlen der Kontrollen entsprechen den publizierten altersentsprechenden Normalwerten (Erkeller-Yuksel et al. 1992, Kemper et al. 2005). Dies unterstützt den Verdacht, dass u.a. die Immunsuppression zur Verminderung der B-Zellzahl führt, obwohl sie sich in erster Linie gegen T-Zellen richtet.

Bisher ist wenig zum Einfluss dieser langfristigen immunsuppressiven Therapie auf die einzelnen Lymphozytensubpopulationen bekannt. Tacrolimus und CsA greifen vor allem in die T-Zell- Reaktivität ein, während die B-Zellpopulation von deren Effekten nur geringfügig betroffen ist (Klaus et al. 2003). Glukokortikoide hemmen vor allem die Antigen-aktivierte T-Zellproliferation (Neumayer et al. 2008). Von MPA und mTOR-Inhibitoren (z.B. Rapamycin) liegen Daten vor, die eine starke Hemmung

der B-Zell-Proliferation sowie die Auslösung der B-Zell- Apoptose beschreiben. Zusätzlich verursache Rapamycin die Reduktion der Immunglobulin produzierenden B-Zellen (Ganschow et al. 2001, Heidt et al. 2008). Die Gruppe der Transplantierten wurde zusätzlich hinsichtlich ihres Immunglobulinstatus untersucht. Es fand sich kein Hinweis auf Immunglobulindysfunktion trotz der verminderten B-Zellen.

Pallier et al. 2010 und Zarkhin et al. 2010 fanden höhere B-Zellen bei immunsuppressionsfreien Patienten sowie eine BAFF-R/ BAFF Erhöhung in transplantierten Patienten. Als mögliche Begründung dafür sahen die Autoren eine regulatorische Funktion der B-Zellen, z.B. durch dessen Entzündungsreaktionskontrollen über Cytokinproduktion, Beeinflussung der T-Zell Antwort sowie Interaktionen mit anderen Immunzellen (Pallier et al. 2010). Bestätigend dafür beschrieben Zarkhin et al. 2008 und 2010 die Rolle der B-Zellen im Rahmen der Abstoßung als Akzeptanz- und Toleranz beeinflussender Faktor in Bezug auf das transplantierte Organ und stellen den B-Zell- Haushalt als Gleichgewicht zwischen Infiltration und Effektorfunktion dar.

Einige spezifische B-Zell- Medikamente sind bereits in der Behandlung von Autoimmunkrankheiten in Erprobung (Navarra et al. 2011, Zarkhin et al. 2010). Beispielsweise wirken B-Zell spezifische Antikörper wie Rituximab gegen B-Zell typische Oberflächenmoleküle, u.a. CD19 (Roll & Tony 2009, Zarkhin et al. 2010). Campath (Alemtuzumab) reduziert Lymphozyten (Zarkhin et al. 2010), also sowohl B- als auch T-Zellen, was wiederum auch regulatorische Zellen in beiden Lymphozytenlinien vernichtet und zu vermehrtem Auftreten Antikörper vermittelter Abstoßung (antibody mediated rejection = AMR) führt (Bloom et al. 2009). Außerdem muss bei den depletierenden Therapien gut ausbalanciert werden, da sonst seltene aber schwerwiegende Infektionen auftreten oder reaktiviert werden könnten. Dies wurde z.B. bei Rituximab beobachtet (Ratanatharathorn et al. 2009). Diejenigen Medikamente unter den eben genannten, welche eine B-Zelldepletion hervorrufen, bewirken infolge dessen eine Erhöhung des BAFF-Spiegels (Bloom et al. 2009, Zarkhin et al. 2010). Eine Chance für effektive B-Zellaktivitätsunterdrückung stellen Kombinationen mit indirekter Hemmung durch Zytokine oder ähnlichem dar. Gaben von Campath plus CNI bspw. blockierte die B-Zellaktivierung durch BAFF infolge der B- Zelldepletion (Bloom et al. 2009). Campath würde in dem Fall idealerweise

zusätzlich die regulatorischen T-Zellen aussparen (Demirkiran et al. 2008) und deren positive immunregulatorische Funktionen erhalten.

4.2 Regulatorische T-Zellen

Tregs wurden von Karczewski et al. (2009) bereits bei adulten Patienten untersucht und als vermindert bei Patienten mit Abstoßung und erhöht bei solchen ohne akute Abstoßung beschrieben. In der vorliegenden Arbeit konnten signifikant verminderte Tregs unter den Transplantierten gegenüber den Kontrollpatienten ermittelt werden. Es zeigte sich, dass eine Verringerung der Zahl der regulatorischen T-Zellen mit einer reduzierten Zahl an B-Zellen, sowie hohen BAFF- Spiegeln einher ging. Bei einer hohen Zahl regulatorischer T-Zellen hingegen fand sich in den vorliegenden Untersuchungsergebnissen tendenziell eine hohe BAFF-R Expression auf B-Zellen. Weiterhin wurde gezeigt, dass mit langer Zeit nach Transplantation ein hoher Anteil regulatorischer T-Zellen einherging. Hier ist möglicherweise der verringerte Bedarf an Immunsuppression mit der Zeit ein Faktor für die verringerte Zelldepletion und damit die Erholung der Tregs u.a. Das zeigte auch der Befund, dass die Patienten mit hohen Tregs ebenfalls hohe B-Zellzahlen aufwiesen. Es ergibt sich die mögliche Schlussfolgerung, dass eine ausbalancierte Zahl an B- und regulatorischen T-Zellen für eine gute Prognose bzw. Toleranz des transplantierten Organs stehen können. Dies wird durch Erkenntnisse von Marino et al. (2009) oder Karczewski et al. (2009) unterstützt, die eine möglicherweise protektive Wirkung von regulatorisch wirksamen T-Zellen entgegen autoimmun (in dem Fall übertragen alloimmun) wirkender Aktivität auf die Transplantatakzeptanz beschrieben.

Erwähnenswert ist zudem, dass ein transplantiertes Patient mit besonders hohem Anteil an Tregs eine stabile GFR bei relativ geringer immunsuppressiver Therapie zeigte. Dies bestätigt zusätzlich die Annahmen von Karczewski et al. (2009), ebenda. Die geschilderten Befunde legen zudem den Verdacht nahe, dass möglicherweise eine zu starke Immunsuppression die positive Wirkung der Tregs für die Transplantatakzeptanz bzw. -funktion unterdrücken könnte. Eine diese Vermutung unterstützende direkte Korrelation zwischen der GFR und der Zahl regulatorischer T-Zellen konnte jedoch beim untersuchten Kollektiv nicht gefunden werden.

Bezüglich der regulatorischen T-Zellen als Biomarker für Transplantatfunktion oder mögliche bevorstehende Abstoßungsreaktionen ist zu sagen, dass diese aufgrund

ihrer niedrigen Prozentzahl an der CD4+ T-Zellpopulation nur sehr fehleranfällig gemessen werden können und die Schwankungen in den Messungen per FACS eine direkte Ableitung einer therapeutischen Konsequenz nicht sicher ermöglichen. Daher sind die Tregs als möglicher Überwachungsparameter eher ungeeignet. Es scheint jedoch lohnenswert diese Population im Einzelfall genauer zu betrachten.

4.3 BAFF und BAFF-R

BAFF

Der Nachweis von BAFF im Serum zeigte erhöhte BAFF- Spiegel unter den nierentransplantierten Patienten im Vergleich zur Kontrollgruppe.

Es ließ sich mit den hier erhobenen Daten keine Korrelation zwischen B-Zellen und BAFF finden. Es ist jedoch aus anderen Publikationen bekannt, dass eine niedrige B-Zellzahl einer der Hauptauslöser für hohe BAFF- Spiegel zu sein scheint. Zu solchen Annahmen führten Studien von Bloom et al. (2009) oder Zarkhin et al. (2010), welche eine erhöhte BAFF- Aktivität nach B-Zell Depletion durch Rituximab oder Alemtuzumab Therapie aufzeigen konnten. Möglicherweise beeinflusst die Immunsuppression direkt die BAFF Homöostase, unabhängig von B-Zellzahlen.

Bezüglich der Immunsuppression und ihrer Folgen für BAFF und die B-Zellen ist zu sagen, dass sich (bezogen auf das hier untersuchte Patientenkollektiv der Transplantierten) der Einfluss der immunsuppressiven Medikamente schwierig abgrenzen lässt. Es wurden unterschiedliche immunsuppressive Kombinationen an Medikamenten zur Behandlung der untersuchten Patienten verwendet. In der Literatur ist ein Abfall der BAFF-Konzentration infolge immunsuppressiver Therapie bei Autoimmunerkrankungen beschrieben: in therapeutisch verwendetem intravenösen Immunglobulin IVIg wurden BAFF-Antikörper (AK) nachgewiesen, welche mögliche BAFF Effekte durch Bindung aufheben könnten (Le Pottier et al. 2007). Unter Dexamethason- Therapie konnten verminderte BAFF mRNA Expressionen und in Folge dessen reduzierte BAFF- Sekretion aufgezeigt werden (Reyes et al. 2008). Dies ließ sich durch die hier erhobenen Daten nicht bestätigen, bzw. wären hierzu anders aufgebaute Studien erforderlich. Für sich betrachtet, schienen die niedrigdosierten Glucocorticoide die BAFF- Spiegel im Serum der hier untersuchten Transplantierten nicht zu beeinflussen. Auffällig waren jedoch besonders hohe BAFF- Werte unter Kindern, die mit mTOR-Inhibitoren behandelt wurden. Erklärend hierfür wären gestörte Antworten der angeborenen Immunität, die

eine Blockierung des mTOR Signalweges verursachen (Weichhart et al. 2008) oder die Erkenntnis, dass BAFF das Zellwachstum unterstützt, indem es bspw. eine Aktivierung des mTOR-Komplexes verursacht (Mackay & Schneider 2009). Neuere Medikamente wie Alemtuzumab führen lt. Bloom et al. (2009) zu einer BAFF-Erhöhung durch u.a. B-Zelldepletion, die beim überwiegenden Teil der Patienten auch noch 2 Jahre nach der Behandlung bestand. BAFF-R auf CD19+ B-Zellen war in der genannten Studie signifikant runterreguliert. Außerdem steigerte eine zusätzliche Gabe von mTOR-Inhibitor die BAFF gesteuerte B-Zellaktivierung, was im Gegensatz zur eigentlichen Funktion der mTOR-Inhibitoren stand. Insgesamt bestätigt dies z.T. die in der vorliegenden Arbeit beschriebenen Erkenntnisse. Es legt außerdem aber auch eine mögliche Rolle von BAFF als Verursacher von Antikörpervermittelter Abstoßung nahe. Als Produzenten der hohen BAFF-Spiegel zeigten die Autoren bspw. erhöhte mRNA-Level für BAFF in CD14+ Monozyten auf. Die Monozyten sollten daher neben Granulozyten zusätzlich zu den T-Zellen als Quelle von erhöhten BAFF-Spiegeln in Betracht gezogen werden, da aus den hier vorliegenden Daten zu den untersuchten Probanden keine eindeutige Zuordnung einer Ursache möglich ist.

Die Übertragung der Kenntnis über erhöhte Aktivität von BAFF mit konsekutiv verstärkten autoimmunologischen Prozessen auf die Gegebenheiten bei Transplantierten, also vom Auto- zum Alloimmunitätskontext liegt hier nahe. Xu et al. 2008 und 2009 beschrieben, dass erhöhtes BAFF zu verstärkter Transplantatabstoßung oder schlechterer Transplantatfunktion führen würde. Bestätigend hierfür zeigen neueste Ergebnisse von Neusser et al. 2010, dass BAFF und BAFF-R auch direkt in von autoimmunen Erkrankungen betroffenen Organen zu finden sind.

Hinsichtlich der Ergebnisse dieser Studie konnte zudem gezeigt werden, dass erhöhte BAFF-Spiegel im Serum mit Transplantatdysfunktion ($GFR < 60 \text{ ml/min/1,73m}^2$) einhergingen. Dies zeigte sich auch bei einer inzwischen generierten Kontrollgruppe dialysepflichtiger pädiatrischer Patienten, welche ebenfalls erhöhte BAFF-Spiegel im Vergleich zu gesunden Kontrollen zeigten, jedoch in geringerem Ausmaß als transplantierte Kinder (eigene Daten, vgl. Lehnhardt et al. 2012). Daraus lässt sich schlussfolgern, dass hier nicht allein von einer Urämie als Auslöser für die BAFF-Erhöhung ausgegangen werden sollte. Die Daten bezüglich terminal

niereninsuffizienter (ESRD) erwachsener Patienten ließen dies zunächst vermuten (Pahl et al. 2009). Es handelte sich hierbei jedoch nicht um transplantierte Patienten. Eine signifikante Veränderung hinsichtlich der B-Zellen im Vergleich der nach Transplantatfunktion aufgeteilten Gruppe der Nierentransplantierten konnte nicht nachgewiesen werden. Dass die niedrigen B-Zellzahlen u.a. durch Immunsuppression eine Erhöhung der BAFF-Spiegel verursachen, ist nicht auszuschließen. BAFF könnte in diesem Zusammenhang gleichzeitig inflammatorisch wirksam sein und gegen das Transplantat reagieren. Diese Hypothese ließe sich wiederum dadurch unterstützen, dass BAFF das B-Zellüberleben von auto- und auch alloreaktiven B-Zellen bewirkt (Zarkhin et al. 2010) und dass es als lokales inflammatorisch wirksames Chemokin agiert (Neusser et al. 2010). Xu et al. (2009) fanden zudem signifikant erhöhte intrarenale BAFF Expressionen in abgestoßenen Nierentransplantaten. Insgesamt wären gezielte Untersuchungen von Biopsien in Zusammenhang mit BAFF-Spiegeln und B-Zellstatus im pädiatrischen, transplantierten Patientenkollektiv interessant. Somit ließen sich vermutlich genauere Aussagen formulieren.

In der vorliegenden Studie gelang kein Nachweis von BAFF anhand von FACS Analysen, weder auf B- Zellen, noch auf T-Zellen. Möglicherweise ist dies am ehesten auf methodische Schwierigkeiten, bspw. auf die Verwendung eines defekten, fluoreszenzmarkierten Antikörpers zurückzuführen. Auch Gruppen wie Morimoto et al. 2007 hatten Probleme mit dem Nachweis, während dies in Experimenten von Bloom et al. 2009 hingegen gelang. Aus Daten von tierexperimentellen Studien geht hervor, dass neben den B-Zellen auch die T-Zellkostimulation durch BAFF beeinflusst wird (Huard et al. 2001, Ng et al. 2004, Ye et al. 2004). Von Ye et al. (2004) ist aus murinen Modellen bekannt, dass BAFF über BAFF-R auf T-Zellen zu T-Zellproliferation und Alloimmunantwort führen kann. Huard et al. (2001) zeigten in vitro, dass BAFF in der Lage ist, T-Zellaktivierung über Kostimulation sowohl in CD4+ als auch CD8+ T-Zellen zu regulieren. Die hier gezeigten Ergebnisse können dies nur z.T. bestätigen. Es fehlen geeignete Bestimmungsverfahren zu BAFF/ BAFF-R auf T-Zellen. Weiterhin herrscht noch erheblicher Bedarf an klärenden Untersuchungen für die genauen Zusammenhänge der humanen BAFF/ T-Zellinteraktionen. Bisher konnten diese nur in Ausnahmefällen für humane T-Zellen nachgewiesen werden (Morimoto et al. 2007, Sellam et al.

2007, Xu et al. 2009). Auch in der vorliegenden Arbeit gelang dies nicht. Eine Adaptation an die Methodik der eben genannten Forschungsgruppe brachte ebenfalls keine Ergebnisse, so dass diese Daten schwer nachvollziehbar sind. Trotz dessen ist die BAFF/BAFF-R Achse vermutlich sehr wichtig für die B-/T-Zell Interaktion, da nachgewiesenermaßen T-Zellen als bekannte BAFF- Produzenten die B-Zellen beeinflussen können. Inwiefern alternative BAFF Rezeptoren hier eine Rolle spielen, bleibt zu klären.

BAFF-R

Beobachtet werden konnte, dass BAFF-R in der transplantierten Gruppe signifikant niedriger exprimiert wurde als innerhalb der Kontrollgruppe. Dies könnte eine mögliche Erklärung für relativ niedrige B-Zellzahlen trotz hoher BAFF- Spiegel darstellen. Zusätzlich ließ sich in der vorliegenden Arbeit zeigen, dass die gemessene BAFF-R-Expression invers mit den BAFF- Spiegeln korrelierte. Es konnte entgegen der vorausgegangen Vermutungen keine Korrelation von BAFF-R und B-Zellzahl gefunden werden. Möglicherweise liegt hier eine Art Regulationsmechanismus vor, welcher die BAFF-R Expression infolge langfristig erhöhter BAFF- Spiegel herunter fährt (Lesley et al. 2004). Unter Umständen könnte dies durch Internalisierung des Rezeptors erfolgen. Dies wurde bspw. von Kreuzaler et al. 2012 oder Zhao et al. 2010 bereits beschrieben. Lavie et al. (2007) nannten zudem post- und transkriptionelle Prozesse als mögliche Begründung dieser Dysregulation. Auch in SLE Patienten fanden sich ähnliche Beobachtungen: BAFF und BAFF-R korrelierten negativ, BAFF-R fand sich in Verbindung mit verstärkter Krankheitsaktivität. Dies können die vorliegenden Daten in ähnlicher Weise für die transplantierten Patienten zeigen. Eine Gruppe Patienten mit über längeren Zeitraum stabiler Transplantatfunktion (>5 Jahre) und geringer Dosis an Immunsuppression bildeten 4 Personen mit sehr hohen BAFF-R Expressionen (MFI > 900). Diese zeigten die höchsten Tregs und B-Zellzahlen. Das unterstützt u.a. das Argument des besseren Transplantatüberlebens bei einem höheren Anteil Tregs (s. Absatz 4.2). Die hohe BAFF-R-Expression könnte somit einen Hinweis auf eine Art Toleranzentwicklung bedeuten. Die Besetzung des Rezeptors ist als Begründung für die niedrigen Expressionsraten ausgeschlossen, da für den verwendeten Antikörper (Klon 8A7) eine Unabhängigkeit vom Besetzungsstatus des Rezeptors beschrieben wurde (Nakamura et al. 2005).

Therapeutische Beeinflussung von BAFF/ BAFF-R

Aus Untersuchungen von Le Pottier et al. (2007) ist bekannt, dass anti- BAFF Antikörper in intravenösem Ig (IVIg) vorhanden sind. Dies führt u.a. durch Bindung von BAFF zur Aufhebung einiger seiner typischen Effekte (Le Pottier et al. 2007). Die therapeutischen Konsequenzen sind jedoch noch nicht ausreichend erforscht. Eine Kombination, bspw. mit Rituximab, erscheint sinnvoll (Zarkhin et al. 2010).

Deutlich wird aus den erhobenen Ergebnissen, dass eine B-Zellreduktion durch die verordnete Immunsuppression mit darauf folgender Erhöhung des BAFF- Spiegels unter Umständen dem Transplantat schaden kann. Wichtig sind daher Medikamente, die genau hier angreifen. Belimumab blockiert den B Zell Überlebensfaktor BAFF (Roll & Tony, 2009, Sabahi & Anolik 2006). Belimumab in Kombination mit Rituximab könnte eine effektivere Möglichkeit der B-Zellunterdrückung darstellen, dies muss jedoch klinisch evaluiert werden (Ratanatharathorn et al. 2009). Eine überschießende BAFF- Produktion infolge der B-Zell Depletion könnte eventuell eingedämmt und somit alloimmune Aktivität vermindert werden.

BAFF als prognostischer Marker

In Knochenmarks-transplantierten Kindern wird BAFF bereits als verwertbarer Biomarker im Zusammenhang mit der Entwicklung von GvHD benutzt (Fujii et al. 2008) und er dient als Prognosefaktor bei Patienten mit B-Zell Lymphom (Kim et al. 2008). Um zu beurteilen, ob sich BAFF und sein Rezeptor BAFF-R als Biomarker im Transplantationsgeschehen eignen (vgl. Xu et al. 2009), sind letztlich Langzeitstudien erforderlich. Mit den hier erhobenen Daten lässt sich ansatzweise zeigen, dass sich hohe B-Zellzahlen und hohe BAFF-R Expressionen mit geringer Dosierung an Immunsuppression und stabiler Transplantatfunktion bei relativ langer Zeit nach Transplantation assoziieren lassen könnten. 3 der $n= 44$ untersuchten transplantierten Kinder zeigten die eben genannte Konstellation auf und sie kann somit als hinweisend für prognostisch günstige Markerkonstellation betrachtet werden. Es kann jedoch keine umfassende Aussage durch die hier gezeigten Ergebnisse getroffen werden.

Bisher kann nicht eindeutig geklärt werden, ob die Serum BAFF Messungen direkt auf die Transplantate übertragbar sind bzw. damit in Verbindung gebracht werden können. Eine mögliche Option zur Untersuchung dieser Frage stellen BAFF-Messungen in Biopsien des transplantierten Organs in Kombination und Relation zu

BAFF-Messungen im Blut dar. Eventuell könnte von lokalen Entzündungsreaktionen durch BAFF Infiltration als Hauptursache für die Entwicklung verminderter Organfunktion rückgeschlossen werden. Erste Daten zu BAFF in Nierenbiopsien wurden in SLE Patienten mit Lupus-Nephropathien erhoben (Neusser et al. 2010).

4.4 Einschränkungen der vorliegenden Arbeit

Die limitierenden Faktoren dieser Studie sind mitunter das retrospektive Design, die Inhomogenität der untersuchten Populationen mit diversen durch den Aufbau der Arbeit nicht eindeutig zu evaluierenden Einflussfaktoren. Hinzu kommt die Tatsache, dass zu aussagekräftigeren Korrelationen von BAFF zu Pathomechanismen bspw. weitere Lymphozytensubpopulationen bzw. gezieltere Analysen von B-Zelluntergruppen notwendig wären. Außerdem sind Verlaufsbeobachtungen der Klinik im Zusammenhang mit Tregs oder BAFF Spiegeln wichtig, um die Wertigkeit der Parameter als prognostische Faktoren noch besser einschätzen zu können.

4.5 Schlussfolgerung

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass bei pädiatrischen nierentransplantierten Patienten unter immunsuppressiver Erhaltungstherapie eine Dysregulation der BAFF/BAFF-R-Achse vorkommen kann. Es kann zudem eine Reduktion von B- und FoxP3⁺ regulatorischen T-Zellen beobachtet werden. Die daraus resultierenden Folgen für das Transplantatüberleben bedürfen weiterer Erforschung.

Den regulatorischen T-Zellen ist eine protektive Funktion vor auto- und alloimmuner Aktivität zuzuschreiben. Der Erhalt dieser Population erscheint prognostisch begünstigend, betrachtet man die in der vorliegenden Arbeit erhobenen Daten im Kontext mit der Literatur.

Die Quelle für BAFF Erhöhung bei den untersuchten Transplantierten ist nicht eindeutig zu eruieren. Bei BAFF- Erhöhung scheint u.a. eine GFR-Abhängigkeit zu bestehen. Dies zeigte sich in erhöhten BAFF-Spiegeln sowohl bei transplantierten als auch nicht transplantierten Patienten mit verminderter Nierenfunktion (eigene Daten, vgl. Lehnhardt et al. 2012). Eine verminderte B-Zellzahl und eine eingeschränkte Transplantatfunktion scheinen jedoch nicht alleinig ursächlich für erhöhte BAFF-Konzentrationen bei nierentransplantierten Patienten zu sein. Wie die vorliegenden Ergebnisse zeigen, könnte eine mögliche BAFF/BAFF-R-Dysregulation die Funktion der Transplantate im Verlauf beeinflussen. Die Regulationsmechanismen, welche zu

hohen BAFF-Konzentrationen und einer verminderten BAFF-R-Expression auf B-Zellen führen, bedürfen daher gezielterer Forschung. Bezüglich des Einsatzes von BAFF und BAFF-R als geeignete Biomarker in der Transplantatüberwachung oder als therapeutische Ziel bleiben noch Fragen offen. Weitere Studien hierzu sind erforderlich. In Bezug auf die Interaktionen und Regulationsmechanismen von BAFF und regulatorischen T-Zellen konnten die erhobenen Daten nur zu Annahmen verhelfen. Möglicherweise führen hohe BAFF Spiegel infolge z.B. verminderter B-Zellzahl zu einer verringerten Anzahl regulatorischer T-Zellen. Dies kann wiederum durch direkte Interaktion über BAFF-R auf T-Zellen (in den präsentierten Daten nicht nachweisbar) oder durch allgemeine Suppression von T- und B-Zellen hervorgerufen worden sein. Eine niedrige BAFF-R-Expression auf B-Zellen oder niedrige B-Zellzahl einhergehend mit niedriger Tregs-Zahl lassen am ehesten auf Letzteres schließen.

5. Zusammenfassung

Bisher wurde davon ausgegangen, dass Transplantatabstoßung und -akzeptanz hauptsächlich T-Zell abhängig wären. Besondere Bedeutung im Kontext der Transplantationsimmunologie erreichte hier die Subpopulation der regulatorischen T-Zellen. Mit der Erkenntnis über Antikörper vermittelte Abstoßung verlagerte sich das Interesse der wissenschaftlichen Forschung zunehmend in Richtung der B-Zellen. Diesen wird neben der Abstoßung auch eine wichtige Rolle in Bezug auf Toleranz zugeschrieben. Der B-Zell-aktivierende Faktor (BAFF) und sein Rezeptor (BAFF-R) sind essentiell für die B-Zellentwicklung und deren Überleben. Über die Regulation der B-Zellhomöostase nach Nierentransplantation ist wenig bekannt. Es gibt vor allem kaum Daten zu BAFF-Spiegeln bei nierentransplantierten Kindern. Darum wurde im Rahmen dieser Arbeit eine Querschnittsstudie zur Erhebung von B-Zellen, BAFF-R-Expression auf B-Zellen und BAFF-Spiegeln im Serum anhand von Durchflusszytometrie (FACS) und Immunoabsorptions-Assay (ELISA) in einer Kohorte von 44 Kindern und Jugendlichen nach Nierentransplantation im Alter von $12 \pm 4,1$ (2-17) Jahren durchgeführt. 22 altersentsprechende, gesunde Kontrollen dienten als Vergleich. Zusätzlich wurde im Kollektiv der Transplantierten nach Korrelation zu klinischen Parametern wie Nierenfunktion, Zeit nach Transplantation etc. geschaut.

Die Ergebnisse zeigen, dass bei nierentransplantierten Kindern gegenüber den Kontrollen bei vergleichbaren absoluten Lymphozytenzahlen (2188 ± 980 vs. 2331 ± 1087 c/ μ l, *n.s.*) signifikant höhere BAFF-Spiegel (1375 ± 417 vs. 894 ± 189 pg/ml, $p < .001$), sowie verminderte B-Zellen (11 ± 5 vs. $17 \pm 5\%$, $p < .001$) und regulatorische T-Zellen ($1,1 \pm 0,7$ vs. $1,6 \pm 0,8\%$, $p = .017$) zu finden waren. Die BAFF-R-Expression auf B-Zellen war signifikant vermindert (539 ± 334 vs. 707 ± 257 MFI, $p = .043$). Unter den Transplantierten waren höhere BAFF- Spiegel unter denjenigen mit einer GFR < 60 ml/min/1,73m² gegenüber den Patienten ohne Transplantatdysfunktion zu beobachten (1553 ± 447 vs. 1283 ± 370 pg/ml, $p = .040$). Die B-Zellen unterschieden sich hier nicht. Trotz verminderter B-Zellen unter den Transplantierten fanden sich keine Immunglobulindysregulationen. BAFF korrelierte signifikant invers mit der BAFF-R Expression auf B-Zellen ($r = -.503$, $p = .001$). Zusammenfassend lässt sich sagen, dass BAFF-Erhöhung nach Nierentransplantation nicht allein durch verminderte B-Zellzahl oder Transplantatdysfunktion verursacht wird. Inwiefern eine

Verschlechterung der Transplantatfunktion Ursache oder Folge des erhöhten BAFF-Spiegels ist, geht hieraus nicht eindeutig hervor. Die erhobenen Daten zeigen jedoch, dass eine Dysregulation des BAFF/ BAFF-R Systems von klinischer Relevanz nach Nierentransplantation zu sein scheint. Es bedarf daher weiterer Erforschung BAFF- abhängiger Mechanismen. Außerdem zeigte sich, dass eine Verringerung der Zahl der regulatorischen T-Zellen mit einer reduzierten Zahl an B-Zellen, sowie hohen BAFF- Spiegeln einher ging. Zudem fand sich ein relativ hoher Anteil regulatorischer T-Zellen mit längerer Zeit nach Transplantation. Regulatorische T-Zellen stehen also möglicherweise im Zusammenhang mit BAFF in Bezug auf die B-Zellhomöostase und das Transplantatüberleben. Die Mechanismen sind jedoch durch diese Studie allein nicht erklärbar. Eine Überwachung der Immunsuppressiven Therapie anhand von Monitoring des BAFF und BAFF-R oder regulatorischer T-Zellen muss in Langzeitstudien gesondert evaluiert werden.

Publikation/ Vortrag/ Poster

Teile dieser Arbeit wurden u.a. wie folgt veröffentlicht:

Lehnhardt, A., Dunst, F., van Husen, M., Loos, S., Oh, J., Eiermann, T., Koch, M., Kemper, M. J. (im Druck). Elevated serum levels of B-cell activating factor (BAFF) in pediatric renal transplant patients. *Pediatric Nephrology*, DOI 10.1007/s00467-012-2142-8

Lehnhardt, A., Dunst, F., van Husen, M., Loos, S., Koch, M., Kemper, M. J. (2010). Distinct changes in lymphocyte subpopulations and expression of BAFF/ BAFF-R after pediatric kidney transplantation. *19. Jahrestagung Deutsche Transplantationsgesellschaft, Hamburg 2010*

Lehnhardt A., Dunst F., van Husen M., Müller-Wiefel D., Koch M., Kemper M. (2010) Lymphocyte subpopulations including FoxP3+ regulatory T-cells and BAFF/BAFF-R in pediatric kidney transplantation. *2010-TTS International Congress, Vancouver 2010*

Lehnhardt A. (2011) BAFF/BAFF-R axis is dysregulated in patients after pediatric renal transplantation. 44th Annual Scientific Meeting of the European Society for Paediatric Nephrology, Dubrovnik 2011

6. Anhang

6.1 Tabellen

Tab. 1: Deskriptive Daten der untersuchten Kohorten und spezifische Charakteristika

| | Transplantierte | Kontrolle |
|--|--|---|
| Stichprobengröße | <i>n</i> = 43 | <i>n</i> = 22 |
| Alter* (Jahre) | 12,3 [2,0-17,8] | 14,5 [6,1-19,6] |
| Geschlecht | <i>n</i> = 17 weiblich <i>n</i> = 26 männlich | <i>n</i> = 15 weiblich <i>n</i> = 7 männlich |
| Zeit nach Transplantation* (Jahre) | 3,9 [0,1 - 12,4] | |
| Immunsuppression | | |
| Prednison + CNI + MPA oder Aza | <i>n</i> = 27 | |
| CNI + MPA oder Aza | <i>n</i> = 13 | |
| mTOR + MPA oder Aza | <i>n</i> = 3 | |
| kombiniert leber- & nierentransplantiert | <i>n</i> = 4 | |
| Grunderkrankungen | | |
| Kongenitale Anomalien der Nieren und des Harntraktes (CAKUT) | <i>n</i> = 26 | |
| Erkrankungen des Nephronophthisekreises | <i>n</i> = 5 | |
| Steroid resistentes Nephrotisches Syndrom | <i>n</i> = 4 | |
| autosomal rezessive Polyzystische Nierenerkrankung | <i>n</i> = 4 | |
| Glomerulonephritis | <i>n</i> = 2 | |
| hämolytisch urämisches Syndrom | <i>n</i> = 2 | |
| eGFR ** (ml/min/1,73m²; Mittelwert ±SD) | 67,5 ±23 | |

* Median [range], ** basierend auf Cystatin C, berechnet nach Filler et al. 2003, *n* = 42

Tab. 2: Unterschiede in Mittelwerten zwischen den untersuchten Gruppen (Transplantierte, Kontrollen)

| | | Normalwerte ** | Transplantierte* | gesunde Kontrollen* | Signifikanz |
|--------------------|-------------------|------------------|----------------------------------|------------------------------------|-----------------|
| n | | | 43 | 22 | |
| Lymphozyten | absolut (c/μl) | 2000-2700 | 2188 (±980) [320-5355] | 2331 (±1087) [1176-6384] | <i>n.s.</i> |
| | prozentual (%) | 36-43 | 36 (±11) [16-63] | 42 (±11) [28-72] | <i>p</i> = .034 |
| CD4+ | absolut (c/μl) | 700-1100 | 1046 (±532) [66-2382] | 773 (±351) [292-1641] | <i>p</i> = .035 |
| | prozentual (%) | 33-45 | 46 (±11) [13-60] | 36 (±6) [22-43] | <i>p</i> < .001 |
| T-reggs | absolut (c/μl) | - | 23 (±17) [2-96] | 33 (±21) [6-101] | <i>p</i> = .051 |
| | prozentual (%) | - | 1,1 (±0,7) [0,2-2,9] | 1,6 (±0,8) [0,3-3,1] | <i>p</i> = .017 |
| B-Zellen | absolut (c/μl) | 300-500 | 243 (±186) [43-1082] | 406 (±228) [159-1026] | <i>p</i> = .003 |
| | prozentual (%) | 12-22 | 11 (±5) [4-29] | 17 (±5) [11-31] | <i>p</i> < .001 |

* Mittelwerte (SD), [range];** nach Erkeller- Yuksel, F.M. et al. (1992), bezogen auf Altersgruppe 7-17 Jahre (entspricht bei Altersmedian von 12-14J. der Mehrheit der untersuchten Probanden).

Tab. 3: Mittelwerte der Immunglobuline und IgG-Subklassen der Transplantierten

| | IgA | IgM | IgG | IgG1 | IgG2 | IgG3 | IgG4 | IgE |
|-----------------|------------------------|----------------------------|--------------------------|--------------------------|----------------------------|--------------------------|--------------------------|-------------------------|
| n | 42 | 43 | 43 | 39 | 39 | 39 | 39 | 42 |
| Konz. (g/l)* | 2,2 (±6,6) [0,3-44] | 2,9 (±13,4) [0,3-89] | 8,3 (±2,4) [3,6-12,9] | 6,1 (±2,3) [2,2-12,1] | 2,2 (±1,0) [1,1-6,2] | 1,3 (±0,6) [0,5-3] | 0,2 (±0,3) [0-1,3] | 36,2 (±54,6) [1-186] |

n= Stichprobengröße; Abweichungen von der Gesamtfallzahl der *n*=44 Transplantierten sind auf logistische Probleme bei der Probenanalyse zurückzuführen (kU/l); Angaben als Mean (SD) [range]; *=Ausnahme: IgE in kU/l; Anmerkng.: bei Werten von IgE unterhalb des messbaren Bereiches (<34 kU/l) wurden die Werte=1 gesetzt.

Tab. 4: Vgl. BAFF i. Serum (pg/ml) und BAFF-R Expression (MFI) zw. Transplantierten und Kontrollen

| | Transplantierte* | gesunde Kontrollen* | Signifikanz |
|-----------------------|---------------------------|----------------------------|--------------------|
| Stichprobengröße | <i>n</i> = 43 | <i>n</i> = 22 | |
| BAFF i. Serum (pg/ml) | 1375 (±417) [679-2263] | 894 (±189) [648-1284] | <i>p</i> < .001 |
| BAFF-R+/ CD19+ (MFI) | 539 (±334) [108-1683] | 707 (±257) [280-1153] | <i>p</i> = .043 |

* Mittelwerte (SD), [range]

Tab. 5: Gesonderte Betrachtung der kombiniert leber- und nierentransplantierten Patienten im Vergleich mit der Gesamtpopulation der einfach Nierentransplantierten.

| | kombiniert transplantierte Patienten* | einfach Transplantierte* | Signifikanz |
|-----------------------|--|---------------------------------|--------------------|
| Stichprobengröße | <i>n</i> = 4 | <i>n</i> = 39 | |
| BAFF i. Serum (pg/ml) | 1510 (±696) [888-2215] | 1361 (±390) [679-2263] | <i>n.s.</i> |

*Mittelwerte (SD), [range]

Tab. 6: Korrelationen***

| | | BAFF | BAFF-R+/ CD19+ | CD19+ % | CD19+ absolut (c/μl) | CD4+/ FoxP3+ % | CD4+/ FoxP3+ absolut (c/μl) | Alter bei BE | Zeit nach Tx | GFR Cyst.C (ml/min) |
|--|----------|-------|-------------------|------------|----------------------------|----------------------|--------------------------------------|-----------------|--------------------|---------------------------|
| BAFF | <i>r</i> | 1,000 | -,503 | -,024 | -,166 | -,337 | -,312 | -,101 | ,052 | -,191 |
| | <i>p</i> | . | ,001 | ,877 | ,287 | ,027 | ,042 | ,519 | ,740 | ,226 |
| BAFF-R+/ CD19+ | <i>r</i> | -,503 | 1,000 | -,135 | ,082 | ,140 | ,238 | ,148 | -,019 | ,129 |
| | <i>p</i> | ,001 | . | ,387 | ,601 | ,371 | ,124 | ,343 | ,902 | ,416 |
| CD19+ % | <i>r</i> | -,024 | -,135 | 1,000 | ,534 | ,169 | ,067 | -,167 | ,255 | ,128 |
| | <i>p</i> | ,877 | ,387 | . | ,000 | ,278 | ,670 | ,284 | ,098 | ,417 |
| CD19+ absolut (c/μl) | <i>r</i> | -,166 | ,082 | ,534 | 1,000 | ,149 | ,477 | -,169 | ,037 | ,167 |
| | <i>p</i> | ,287 | ,601 | ,000 | . | ,340 | ,001 | ,278 | ,815 | ,291 |
| CD4+/ FoxP3+ % | <i>r</i> | -,337 | ,140 | ,169 | ,149 | 1,000 | ,815 | ,152 | ,381 | -,057 |
| | <i>p</i> | ,027 | ,371 | ,278 | ,340 | . | ,000 | ,332 | ,012 | ,721 |
| CD4+/ FoxP3+ absolut (c/μl) | <i>r</i> | -,312 | ,238 | ,067 | ,477 | ,815 | 1,000 | -,011 | ,141 | ,139 |
| | <i>p</i> | ,042 | ,124 | ,670 | ,001 | ,000 | . | ,946 | ,366 | ,381 |
| Alter bei Blutentnahme (BE) | <i>r</i> | -,101 | ,148 | -,167 | -,169 | ,152 | -,011 | 1,000 | ,248 | -,416 |
| | <i>p</i> | ,519 | ,343 | ,284 | ,278 | ,332 | ,946 | . | ,108 | ,006 |
| Zeit nach Transplanta- tion (Tx) | <i>r</i> | ,052 | -,019 | ,255 | ,037 | ,381 | ,141 | ,248 | 1,000 | -,428 |
| | <i>p</i> | ,740 | ,902 | ,098 | ,815 | ,012 | ,366 | ,108 | . | ,005 |
| GFR Cyst.C (ml/min) | <i>r</i> | -,191 | ,129 | ,128 | ,167 | -,057 | ,139 | -,416 | -,428 | 1,000 |
| | <i>p</i> | ,226 | ,416 | ,417 | ,291 | ,721 | ,381 | ,006 | ,005 | . |

*** Erhebung beruht auf $n = 43$ Patienten, bei GFR basierend auf Cyst. C auf $n = 42$; $r =$ Korrelationskoeffizient; $p =$ Signifikanz nach Spearman (2-seitig); $n =$ Summe der erhobenen Probanden

6.2 Material

Es werden die im Wesentlichen verwendeten Materialien samt Herkunftsinformation (Firmensitze nur bei erster Erwähnung) angegeben. Angaben zu Software oder speziellen Kits fanden sich bereits in den entsprechenden Textabschnitten, so dass auf eine Aufführung in diesem Kapitel verzichtet wird.

Tab. 7: Fluoreszenzmarkierte Antikörper

| Zellpopulation / Rezeptor | Oberflächenmarker/ Transkriptionsfaktor/ Rezeptor | Antikörper / zugesetzer Fluoreszenzfarbstoff | Klon | Hersteller |
|---------------------------|---|---|-----------------|-----------------------------------|
| Lymphozyten gesamt | CD45+ | CD45 PE* | 30-F11 | BD Bioscience; San Jose CA (USA) |
| T-Helfer-Zellen | CD4+ | CD4 FITC** | SK3+SK4 | BD |
| Regulatorische T-Zellen | CD4+ CD25b+ FoxP3+* | Multiclone CD4 FITC** | SK3+SK4 | BD |
| | | Alexa Fluor®647 anti-human FoxP3 | M- A251 206D | BioLegend; San Diego CA (USA) |
| Isotyp zu FoxP3 | Mouse IgG _{1,κ} * | Alexa Fluor®647 Mouse IgG _{1, κ} Isotype Control | MOPC-21 | BioLegend |
| Zytotoxische T-Zellen | CD8+ | CD8 FITC** | SK1 | BD |
| B-Zellen | CD19+ | CD19 PerCP*** | 4G7 | BD |
| BAFF | BAFF+ | PE* anti-human BAFF | 1D6 | eBioscience San Diego CA (USA) |
| Isotyp zu BAFF | IgG _{1, κ} | PE*-Mouse IgG ₁ Isotype Control | MOPC-31C | BD |
| BAFF-R | BAFF-R+ | PE* anti-human BAFF-R | 8A7 | eBioscience |
| Isotyp zu BAFF-R | IgG _{2a, κ} | Mouse IgG _{2a} Isotype Control-PE* | 20102 | R&D Systems; Minneapolis MN (USA) |

(Farbstoffabkürzungen: * Phycoerythrin; ** Fluoresceinisothiocyanat; *** Peridinin-Chlorophyll)

Tab. 8: Substanzen

| Substanz | Hersteller |
|---|--|
| Trypanblau, Bestellnr. 15250-061 | GIBCO® |
| Giemsa Stammlösung Artikelnr. T826-1 | Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe (D) |
| May-Gruenwald-Lösung Artikelnr. T863-1 | Roth |
| Intratect, humanes Immunglobulin (Ig) [vorliegende Konzentration 50mg/ml] | Biotest AG, Dreieich (D) |
| FoxP3 Puffer Set: Fix/Perm-Buffer (1:4) Perm-Buffer (1:10) | BioLegend |
| Medium 199 Bestellnummer 22350-029 | GIBCO®/ invitrogen, Carlsbad CA (USA) |
| Bicoll Catalognr. L6115 | Biochrom AG, Berlin (D) |

Tab. 9: Pufferzusammensetzung

| Puffer | Komponente | Menge |
|-------------------|-------------------------|--------------|
| FACS- Waschpuffer | Aqua dest. | 500ml |
| | BSA (0,5%) | 2,5g |
| | NaN ₃ (0,1%) | 0,5g |
| | PBS | 4,75g |

6.3 Zusatzinformationen zu Methoden

Tab. 10: Pipettierschema für BAFF-R/ FoxP3-Messungen am FACS-Durchflusszytometer

| nicht permeabilisiert | | | | permeabilisiert | | | |
|-----------------------|-------|--------|---------------|-----------------|-------|-------|---------------|
| Tube*1 | Tube2 | Tube3 | Tube4 | Tube5 | Tube6 | Tube7 | Tube8 |
| Ig | Ig | Ig | Ig | Ig | Ig | Ig | Ig |
| - | CD45 | CD19 | CD19 | - | CD45 | CD4 | CD4 |
| (Leerwert) | | BAFF-R | BAFF-R Isotyp | (Leerwert) | | CD25b | CD25b |
| | | | | | | FoxP3 | FoxP3 Isotype |

* Tubes: entsprechende FACS-Röhrchen

Tab. 11: Eingesetzte Antikörper-Mengen

| Antikörper | Abfüllkonzentration des Herstellers | µl/Probe* |
|---|--|-----------|
| CD45 <i>PE</i> | 0,2 mg/ml | 5 |
| CD19 <i>PerCP</i> | 6,3µl/ml | 5 |
| CD4 <i>FITC</i> | 75µg/ml | 10 |
| CD25b <i>PE</i> | 12.5 µg/ml | 10 |
| BAFF-R <i>PE</i> | 0,1875µg/ml | 10 |
| BAFF-R Isotyp(IgG _{2a}) <i>PE</i> | 25µl/ml | 10 |
| FoxP3 <i>Alexa Fluor® 647</i> | 50µg/ml | 5 |
| FoxP3 Isotyp(IgG ₁) <i>Alexa Fluor® 647</i> | 0,5mg/ml | 5 |

* unverdünnter AK aus dem Original- Reagenziengefäß entnommen

7. Abkürzungsverzeichnis

| Abkürzung | Bedeutung |
|------------------|---|
| AG | Arbeitsgemeinschaft |
| Aza | Azathioprin |
| BAFF | B- Zell-aktivierender Faktor (=TNFSF13B/ BLyS/ TALL1/ CD257) |
| BAFF-R | Rezeptor des B- Zell-aktivierenden Faktors (= BR3/ TNFRSF13C) |
| BCMA | <i>B-cell maturation antigen</i> |
| CD | <i>cluster of differentiation</i> |
| CKD | <i>chronic kidney disease</i> |
| CNI | Calcineurin- Inhibitor |
| CsA | Ciclosporin A |
| CTLA | <i>cytotoxic T-lymphocyte antigen</i> |
| EDTA | Ethylendiamintetraessigsäure |
| ELISA | <i>Enzyme-linked immunosorbent assay</i> |
| ESRD | <i>end stage renal disease</i> |
| FACS | Floureszenz aktivierte Zellsortierung |
| FoxP3 | Forkhead- Box- Protein P3 |
| GFR | glomeruläre Filtrationsrate |
| GvHD | <i>Graft vs. Host Disease</i> |
| Ig | Immunglobulin |
| IL | Interleukin |
| IVIg | intravenöses Immunglobulin |
| MFI | <i>mean flourescence intensity</i> |
| MPA | Mycophenolat- Mofetil |
| mRNA | messenger ribonucleic acid |
| mTOR | <i>mammalian Target of Rapamycin</i> |
| mTOR- I. | Inhibitor des <i>mammalian Target of Rapamycin</i> |
| NFkB | <i>nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells</i> |
| PTLD | <i>Post-transplant lymphoproliferative disorder</i> |
| SLE | systemischer Lupus erythematodes |

| | |
|-------|---|
| TACI | <i>transmembrane activator and CAML interactor</i> |
| TGF | <i>Transforming Growth Factor</i> |
| TNF | <i>Tumor Necrosis Factor</i> |
| Tregs | regulatorische T- Zellen |
| TRAF3 | <i>tumor necrosis factor receptor-associated factor 3</i> |
| Th | T- Helfer Zellen |
| Tx | Transplantation |
| UKE | Universitätsklinik Hamburg Eppendorf |

8. Literaturverzeichnis

- Banas, B. (2008). Bedeutung der B-Zelle für die Transplantat-Abstoßung. *Nephro-News*, S. 30-34.
- Bloom, D., Chang, Z., Pauly, K., Kwun, J., Fechner, J., Hayes, C., et al. (2009). BAFF is Increased in Renal Transplant Patients Following Treatment with Alemtuzumab. *American Journal of Transplantation*, 9, S. 1835-1845.
- Demirkiran, A., Hendriks, T. K., Baan, C. C., & van der Laan, L. J. (2008). Impact of Immunosuppressive Drugs on CD4+CD25+FOXP3+ Regulatory T Cells: Does in vitro Evidence Translate to the Clinical Setting? *Transplantation*, 85 (6), S. 783-789.
- Erkeller-Yuksel, F. M., Deneys, V., Yuksel, B., Hannel, I., Hulstaert, F., Hamilton, C., et al. (1992). Age-related changes in human blood lymphocyte subpopulations. *Journal of Pediatrics*, 120 (2), S. 216-222.
- Filler, G., & Lepage, N. (2003). Should the Schwartz formula for estimation of GFR be replaced by cystatin C formula? *Pediatric Nephrology*, 18, S. 981-985.
- Fujii, H., Cuvelier, G., She, K., Aslanian, S., Shimizu, H., Kariminia, A., et al. (2008). Biomarkers in newly diagnosed pediatric-extensive chronic graft-versus-host disease: a report from the Children's Oncology Group. *blood*, 111, S. 3276-3285.
- Ganschow, R., Lyons, M., Kemper, M. J., & Burdelski, M. (2001). B-cell dysfunction and depletion using mycophenolate mofetil in a pediatric combined liver and kidney graft recipient. *Pediatric Transplantation*, 5 (1), S. 60-63.
- Heidt, S., Roelen, D. L., Eijssink, C., van Kooten, C., Claas, F. H., & Mulder, A. (2008). Effects of immunosuppressive drugs on purified human B cells: evidence supporting the use of MMF and rapamycin. *Transplantation*, 86 (9), S. 1292-1300.
- Huard, B., Schneider, P., Mauri, D., Tschopp, J., & French, L. E. (2001). T Cell Costimulation by the TNF Ligand BAFF. *The Journal of Immunology*, 167, S. 6225-6231.
- Jee, H. M., Kim, K. W., Hong, J. Y., Sohn, M. H., & Kim, K. E. (2010). Increased serum B cell-activating factor level in children with atopic dermatitis. *Clinical and Experimental Dermatology*, 35 (6), S. 593-598.
- Kalled, S. L. (2005). The role of BAFF in immune function and implications for autoimmunity. *Immunological Reviews*, 204, S. 43-54.
- Karczewski, M., Karczewski, J., Kostrzewa, A., Wiktorowicz, K., & Glyda, M. (2009). The Role of Foxp3+ Regulatory T Cells in Kidney Transplantation. *Transplantation Proceedings*, 41, S. 1527-1529.

- Kemper, M. J., Zepf, K., Klaassen, I., Link, A., & Müller-Wiefel, D. E. (2005). Changes of lymphocyte Populations in Pediatric Steroid-Sensitive Nephrotic Syndrome Are More Pronounced in Remission than in Relapse. *American Journal of Nephrology* , 25, S. 132-137.
- Kemper, M. J., Meyer-Jark, T., & Müller-Wiefel, D. E. (1997). IgG2 deficiency in uremic children is not restricted to peritoneal dialysis treatment. *Pediatric Nephrology*, 11, S. 684-686.
- Kim, S. J., Lee, S. J., Choi, I. Y., Park, Y., Choi, C. W., Kim, I., et al. (2008). Serum BAFF predicts prognosis better than APRIL in diffuse large B-cell lymphoma patients treated with rituximab plus CHOP chemotherapy. *European journal of heamatology* , 81 (3), S. 177-184.
- Klaus, G., Mostert, K., Reckzeh, B., & Mueller, T. F. (2003). Phenotypic changes in lymphocyte subpopulations in pediatric renal-transplant patients after T-cell depletion. *Transplantation* , 76 (12), S. 1719-1724.
- Kreuzaler, M., Rauch, M., Salzer, U., Birmelin, J., Rizzi, M., Grimbacher, B., et al. (2012). Soluble BAFF levels inversely correlate with peripheral B cell numbers and the expression of BAFF receptors. *Journal of Immunology* , 188 (1), S. 497-503.
- Lavie, F., Miceli-Richard, C., Ittah, M., Sellam, J., Gottenberg, J. E., & Mariette, X. (2007). Increase of B cell activating factor of the TNF family (BAFF) after rituximab treatment: insights into a new regulating system of BAFF production. *Annals of the rheumatic diseases* , 66, S. 700-703.
- Le Pottier, L., Sapir, T., Bendaoud, B., Youinou, P., Shoenfeld, Y., & Pers, J.-O. (2007). Intravenous Immunoglobulin and Cytokines: Focus on Tumor Necrosis Factor Family Members BAFF and APRIL. *Annals of the New York Academy of Sciences* , 1110, S. 426-432.
- Lehnhardt, A., Dunst, F., van Husen, M., Loos, S., Oh, J., Eiermann, T., Koch, M., Kemper, M. J. (im Druck). Elevated serum levels of B-cell activating factor (BAFF) in pediatric renal transplant patients. *Pediatric Nephrology*, DOI 10.1007/s00467-012-2142-8
- Lesley, R., Xu, Y., Kalled, S. L., Hess, D. M., Schwab, S. R., Shu, H. B., et al. (2004). Reduced Competitiveness of Autoantigen-Engaged B Cells due to Increased Dependence on BAFF. *Immunity* , 20, S. 441-453.
- Li, X., Xiao, B.-G., Xi, J.-Y., Lu, C.-Z., & Lu, J.-H. (2007). Decrease of CD4⁺CD25^{high}Foxp3⁺ regulatory T cells and elevation of CD19⁺ BAFF-R⁺ B cells and soluble ICAM-1 in myasthenia gravis. *Clinical Immunology* , 126, S. 180-188.
- Mackay, F., & Browning, J. L. (2002). BAFF: a fundamental survival factor for B cells. *Nature Reviews Immunology* , 2, S. 465-475.
- Mackay, F., & Schneider, P. (2009). Cracking the BAFF code. *Nature Reviews Immunology* , 9, S. 491-502.

- Marino, E., Villanueva, J., Walters, S., Liuwantara, D., Mackay, F., & Grey, S. T. (2009). CD4+CD25+ T-Cells Control Autoimmunity in the Absence of B-Cells. *Diabetes* , 58, S. 1568-1577.
- Morimoto, S., Nakano, S., Watanabe, T., Tamayama, Y., Mitsuo, A., Nakiri, Y., et al. (2007). Expression of B-cell activating factor of the tumor necrosis factor family (BAFF) in T cells in active systemic lupus erythematosus: the role of BAFF in T cell-dependent B cell pathogenic autoantibody production. *Rheumatology* , 46, S. 1083-1086.
- Nakamura, N., Hase, H., Sakurai, D., Yoshida, S., Abe, M., Tsukada, N., et al. (2005). Expression of BAFF-R (BR 3) in normal and neoplastic lymphoid tissues characterized with a newly developed monoclonal antibody. *Virchows Archiv* , 447, S. 53-60.
- Navarra, S. V., Guzman, R. M., Gallacher, A. E., Hall, S., Levy, R. A., Jimenez, R. E., et al. (2011). Efficacy and safety of belimumab in patients with active systemic lupus erythematosus: a randomised, placebo-controlled, phase 3 trial. *Lancet* , 377 (9767), S. 721-731.
- Neumayer, H.-H., Budde, K., & Waiser, J. (2008). *Neue Medikamente in der Transplantationsmedizin* (2. Auflage Ausg.). (B. International Medical Publishers (London, Hrsg.) Bremen: UNI-MED.
- Neusser, M. A., Lindenmeyer, M. T., Edenhofer, I., Gaiser, S., Kretzler, M., Regele, H., et al. (2010). Intrarenal production of B-cell survival factors in human lupus nephritis. *Modern Pathology* , 24 (1), S. 98-107.
- Ng, L. G., Sutherland, A. P., Newton, R., Qian, F., Cachero, T. G., Scott, M. L., et al. (2004). B Cell Activating Factor Belonging to the TNF Family (BAFF)-R is the Principal BAFF Receptor Facilitating BAFF Costimulation of Circulating T and B Cells. *The Journal of Immunology* , 173, S. 807-817.
- Offner, G. (2009). Nierentransplantation bei Kindern. *Der Urologe* , 48, S. 1464-1467.
- Pahl, M. V., Gollapudi, S., Sepassi, L., Gollapudi, P., Elahimehr, R., & Vaziri, N. D. (2009). Effect of end-stage renal disease on B-lymphocyte subpopulations, IL-7, BAFF and BAFF receptor expression. *Nephrology Dialysis Transplantation* , S. 1-7.
- Pallier, A., Hillion, S., Danger, R., Giral, M., Racape, M., Degauque, N., et al. (2010). Patients with drug-free long-term graft function display increased numbers of peripheral B cells with a memory and inhibitory phenotype. *Kidney International* , 78, S. 503-513.
- Ratanatharathorn, V., Pavletic, S., & Uberti, J. P. (2009). Clinical applications of rituximab in allogeneic stem cell transplantation: Anti-tumor and immunomodulatory effects. *Cancer Treatment reviews* , 35 (8), S. 653-661.

Reyes, L. I., Leon, F., Gonzales, P., Rozas, M. F., Labarca, C., Segovia, A., et al. (2008). Dexamethasone inhibits BAFF expression in fibroblast-like synoviocytes from patients with rheumatoid arthritis. *Cytokine* , 42, S. 170-178.

Rieber, E. P. (2009). *Grundlagen der Immunologie für Studierende der Medizin. Vorlesungsskriptum für Studierende an der Technischen Universität Dresden*. Dresden.

Roll, P., & Tony, H.-P. (2009). B-Zell-gerichtete Therapie bei Autoimmunerkrankungen. *Zeitschrift für Rheumatologie* (68), S. 255-259.

Sabahi, R., & Anolik, J. H. (2006). B-cell-targeted therapy for systemic lupus erythematosus. *Drugs* , 66 (15), S. 1933-1948.

Sellam, J., Miceli-Richard, C., Gottenberg, J. E., Ittah, M., Lavie, F., Lacabaratz, C., et al. (2007). Decreased B cell activating factor receptor expression on peripheral lymphocytes associated with increased disease activity in primary Sjögren's syndrome and systemic lupus erythematosus. *Annals of the rheumatic diseases* , 66, S. 790-797.

Weichhart, T., Constantino, G., Poglitsch, M., Rosner, M., Zeyda, M., Stuhlmeier, K. M., et al. (2008). The TSC-mTOR Signaling Pathway Regulates the Innate Inflammatory Response. *Immunity* (29), S. 565-577.

Welsch, U. (2006). *Lehrbuch Histologie* (2 Ausg.). (U. & Verlag, Hrsg.) München: Elsevier GmbH.

White, C., Akbari, A., Hussain, N., Dinh, L., Filler, G., Lepage, N., et al. (2007). Chronic kidney disease stage in renal transplantation classification using cystatin C and creatinin-based equations. *Nephrology Dialysis Transplantation* , 22, S. 3013-3020.

Xu, H., He, X., Liu, Q., Chen, Y., Zhu, Y., Shi, D., et al. (2008). The Abnormal High Expression of B Cell Activating Factor Belonging to TNF Superfamily (BAFF) and Its Potential Role in Kidney Transplant Recipients. *Cellular & Molecular Immunology* (5), S. 465-470.

Xu, H., He, X., Liu, Q., Shi, D., Chen, Y., Zhu, Y., et al. (2009). Abnormal High Expression of B-Cell Activating Factor Belonging to the TNF Superfamily (BAFF) Associated With Long-Term Outcome in Kidney Transplant Recipients. *Transplantation Proceedings* , 41, S. 1552-1556.

Ye, Q., Wang, L., Wells, A. D., Tao, R., Han, R., Davidson, A., et al. (2004). BAFF binding to T cell-expressed BAFF-R costimulates T cell proliferation and alloresponses. *European journal of immunology* , 34, S. 2750-2759.

Zarkhin, V., Chalasani, G., & Sarwal, M. (2010). The yin and yang of B cells in graft rejection and tolerance. *Transplantation Reviews* , 24, S. 67-78.

Zarkhin, V., Li, L., & Sarwal, M. (2009). BAFF May Modulate the Rate of B-Cell Repopulation After Rituximab Therapy for Acute Renal Transplant Rejection. *Transplantation* , 88 (10), S. 1229-1230.

Zarkhin, V., Li, L., & Sarwal, M. (2008). "To B or not to B?" B-Cells and Graft Rejection. *Transplantation* , 85, S. 1705-1714.

Zhao, L. D., Smith Jr, M. F., Wang, J. S., Zhang, W., Tang, F. L., Tian, X. P., et al. (2010). Expression of BAFF/BAFF receptors and their correlation with disease activity in Chinese SLE patients. *Lupus* , 19, S. 1534-1549.

9. Danksagung

Ich möchte mich herzlich bei all jenen bedanken, die mich auf unterschiedliche Weise unterstützt und zu dieser Dissertation beigetragen haben.

An erster Stelle richtet sich mein Dank an Herrn Professor Dr. med. Markus Kemper, der es mir ermöglicht hat, mich mit diesem spannenden pädiatrischen Thema zu beschäftigen. Ich danke ihm für die Überlassung des interessanten Themas, die Einführung in die Thematik und die äußerst hilfreichen Besprechungen meiner Arbeit in ihren verschiedenen Entwicklungsstadien.

Besonders bedanken möchte ich mich bei meiner Betreuerin Frau Dr. med. Anja Lehnhardt, für ihre Idee zu der Arbeit und ihre Ausdauer bei der Anleitung zum wissenschaftlichen Arbeiten, ihre viele Zeit, die sie in meine Betreuung investiert hat und ihre konstruktiven Anmerkungen und ständige Hilfsbereitschaft. Ihr Engagement und das unbändige Interesse an der B-Zelle haben mich schwer beeindruckt.

Ein großer Dank gilt außerdem dem gesamten Team der nephrologischen Ambulanz der Kinderklinik für die Unterstützung bei der Probensammlung und Elternaufklärung, sowie der hepatobiliären Chirurgie für die freundliche Bereitstellung der Räumlichkeiten und Arbeitsplätze sowie der zum Teil dort bereits etablierten Messverfahren zur Auswertung der Patientendaten und Analyse des Probenmaterials.

Frau Petra Tiede sowie Sabrina Christiansen und Claudia Göbler danke ich ganz herzlich für die hilfreiche Anleitung und Beratung beim experimentell praktischen Teil dieser Arbeit im Labor. Ihre Anwesenheit und die freundliche Atmosphäre während dieser Zeit haben mir sehr geholfen.

Meiner Familie -in erster Linie meinem Papa- danke ich für die Geduld und das Verständnis während des turbulenten Studiums und auch meinen Großeltern für die jahrelange Unterstützung und Ermutigung auf diesem Weg.

Meiner lieben Schwester gilt besonderer Dank für ihre Ausdauer in Bezug auf Geduld mit mir, Hilfe und Korrekturen, sowie zahlreiche Tipps vor allem zum wissenschaftlichen Schreiben dieser Arbeit.

Ich möchte mich auch bei meinem Freund Jens Lange bedanken, dass er mich ständig bestärkt hat, am Ball zu bleiben und mich nicht entmutigen zu lassen, sowie für die unendliche, unbezahlbare Beratung in statistischen Fragen und alle anderen Groß- und Kleinigkeiten, die zum Fertigstellen der Arbeit beitrugen.

Und schließlich meinen Freunden für die aufregende, anstrengende und auch wunderbare Zeit des Studiums, ohne die die vergangenen 6 Jahre nicht die gleichen gewesen wären.

10. Lebenslauf

Entfällt aus datenschutzrechtlichen Gründen.

11. Eidesstattliche Versicherung

Ich versichere ausdrücklich, dass ich die vorliegende Arbeit mit dem Thema: „Lymphozytensubpopulationen bei Kindern und Jugendlichen nach Nierentransplantation - Schwerpunkt BAFF und regulatorische T-Zellen“ selbständig und ohne fremde Hilfe verfasst, andere als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel nicht benutzt und die aus den benutzten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen einzeln nach Ausgabe (Auflage und Jahr des Erscheinens), Band und Seite des benutzten Werkes kenntlich gemacht habe.

Ferner versichere ich, dass ich die Dissertation bisher nicht einem Fachvertreter an einer anderen Hochschule zur Überprüfung vorgelegt oder mich anderweitig um Zulassung zur Promotion beworben habe.

Unterschrift: