

Aus der I. Medizinischen Klinik und Poliklinik  
der Universitätsmedizin der Johannes Gutenberg-Universität Mainz

Expression und Funktion des Proteins A20  
Nierentransplantierte, Dialysepatienten und Gesunde im Vergleich

Inauguraldissertation  
zur Erlangung des Doktorgrades der Medizin  
der Universitätsmedizin  
der Johannes Gutenberg-Universität Mainz

Vorgelegt von

Karin Anna-Maria Schäfer  
aus Langen

Mainz, 2022

Tag der Promotion:

06. Dezember 2022

# Inhaltsverzeichnis

I.	Abkürzungsverzeichnis .....	V
II.	Tabellenverzeichnis .....	VII
III.	Abbildungsverzeichnis .....	VIII
1	Einleitung und Ziel der Dissertation .....	1
2	Literaturdiskussion .....	2
2.1	A20 – Stand der Forschung.....	2
2.1.1	Einführung und historischer Hintergrund .....	2
2.1.2	Expression und Struktur von A20.....	2
2.1.3	A20-kontrollierte Signalwege .....	4
2.1.4	Regulation von A20.....	6
2.1.5	Funktion in T- und B-Zellen.....	7
2.1.6	A20 und Ischämie- und Reperfusionsschaden .....	8
2.1.7	A20 und Nierentransplantation .....	9
2.2	Nierentransplantation – Transplantationsimmunologie.....	12
2.2.1	Einführung und historischer Hintergrund .....	12
2.2.2	Bedeutung der Alloantigene für die Immunantwort .....	12
2.2.3	Evaluation des immunologischen Risikos vor NTX .....	15
2.2.4	Allokation.....	18
2.2.5	Initiation der Immunantwort durch Aktivierung der angeborenen Immunabwehr .....	19
2.2.6	Von der angeborenen Immunabwehr zur adaptiven Immunantwort.....	19
2.2.7	Abstoßungsreaktionen .....	20
2.2.8	Einfluss der Immunantwort auf die Transplantatfunktion .....	24
2.2.9	Immunsuppression .....	25
3	Material und Methoden .....	29
3.1	Material .....	29
3.2	Methoden.....	29
3.2.1	Register: Klinischer Verlauf vor und nach Nierentransplantation .....	29
3.2.2	FACS-Analyse: A20-Expression in PBMCs vor und im Verlauf nach NTX .....	33
3.2.3	RT-qPCR und IHC: A20-Expression im Transplantatnierengewebe .....	41
4	Ergebnisse .....	47
4.1	Register: Klinischer Verlauf vor und nach Nierentransplantation.....	47
4.1.1	Alters- und Geschlechterverteilung der Kollektive .....	48
4.1.2	Verhältnis von Leichennierentransplantationen zu Lebendnierenspenden .....	49
4.1.3	Nephrologische Grunderkrankungen.....	50
4.1.4	Kardiovaskuläre Risikofaktoren .....	51
4.1.5	Ischämiezeiten .....	52

4.1.6	Kreatinin, CRP und Leukozytenzahl .....	53
4.1.7	Komplikationen nach NTX.....	54
4.2	FACS-Analyse: A20-Proteinexpression in PBMCs vor und im Verlauf nach NTX .....	57
4.2.1	Nachweis von A20 in zirkulierenden CD4+, CD3+, CD19+ und CD11b+ Zellen .....	57
4.2.2	Anteil A20-positiver Zellen bei Gesunden, Dialysepatienten und Transplantierten .....	58
4.2.3	Anteil A20-positiver Zellen bei Transplantierten mit und ohne Abstoßungsreaktion .....	60
4.2.4	Anteil A20-positiver Zellen – Nephrologische Grunderkrankungen im Vergleich .....	62
4.2.5	Korrelation des Anteils A20-positiver Zellen mit klinischen Parametern .....	63
4.2.6	Zytokine in CD4+ Zellen bei Gesunden, Dialysepatienten und Transplantierten .....	64
4.2.7	Zytokine in CD4+ Zellen bei Transplantierten mit und ohne Abstoßungsreaktion.....	66
4.2.8	Korrelation des Anteils A20-positiver Zellen mit der Zytokinexpression .....	67
4.3	RT-qPCR und IHC: A20-Expression im Transplantatnierengewebe .....	69
4.3.1	RT-qPCR: A20-Gesamt-mRNA-Expression im Transplantatnierengewebe .....	69
4.3.2	IHC: A20-Proteinexpression im Transplantatnierengewebe .....	70
5	Diskussion.....	72
5.1	Register: Klinischer Verlauf vor und nach Nierentransplantation.....	72
5.1.1	Diskussion der Methoden .....	73
5.1.2	Diskussion der Ergebnisse.....	73
5.2	FACS-Analyse: A20-Expression in PBMCs vor und im Verlauf nach NTX .....	79
5.2.1	Diskussion der Methoden .....	79
5.2.2	Diskussion der Ergebnisse.....	80
5.3	RT-qPCR und IHC: A20-Expression im Transplantatnierengewebe .....	86
5.3.1	Diskussion der Methoden .....	86
5.3.2	Diskussion der Ergebnisse.....	87
6	Zusammenfassung.....	89
7	Literaturverzeichnis.....	91
8	Anhang .....	103
8.1	Auflistung der verwendeten Materialien.....	103
8.1.1	Verwendete Laborgeräte .....	103
8.1.2	Verwendete Verbrauchsartikel .....	104
8.1.3	Verwendete Chemikalien und Reagenzien .....	104
8.1.4	Verwendete Puffer und Lösungen .....	106
8.1.5	Verwendete Primer .....	108
8.1.6	Verwendete Antikörper .....	108
9	Danksagung .....	109
10	Tabellarischer Lebenslauf .....	110

## I. Abkürzungsverzeichnis

3'UTR	3'-untranslatierte Region
ABC	Avidin-Biotin-Komplex
ABIN 1/2	A20-bindender-Inhibitor-der-NFκB-Aktivierung-1/2
ASK1	Apoptosesignal-regulierende-Kinase-1
ATG	Anti-Thymozyten-Globulin
ATP	Adenosintriphosphat
Bcl-x	B-Cell-Lymphoma-x
BCR	B-Zell-Rezeptor
BKV	BK-Virus
BSA	Body Surface Area
C103	Cysteinrest
CCL-2	Chemokin-C-C-Motiv-Ligand-2
CD	Cluster-of-Differentiation
CDC	Komplementabhängige Zytotoxizität
ciAP1/2	Zellulärer-Inhibitor-des-Apoptoseproteins-1/2
CMV	Zytomegalievirus
cPRA	Kalkulierte Panel-reaktive Antikörper
DAB	Diaminobenzidin
DAMPs	Schaden-assoziierte molekulare Muster
DREAM	Downstream-Regulatory-Element-Antagonist-Modulator
DSA	Donorspezifische Antikörper
DUB	Deubiquitinase
E1	Ubiquitin-aktivierendes Enzym
E2	Ubiquitin-konjugierendes Enzym
E3	Ubiquitin-Ligase
ELISPOT	Enzyme-Linked-Immuno-Spot-Assay
ERRα	Estrogen-Related-Receptor-α
FACS	Fluorescence-activated Cell Sorting
GM-CSF	Granulozyten-Monozyten-Kolonie-stimulierender-Faktor
GFR	Glomeruläre Filtrationsrate
HIF-1α	Hypoxie-induzierter-Faktor-1-α
HLA	Humanes Leukozytenantigen
ICAM-1	Intrazelluläres-Adhäsionsmolekül-1
IDO	Indolamin-2,3-Dioxygenase
IHC	Immunhistochemie
IκB	Inhibitor-von-NFκB
IKK	Inhibitor-von-NFκB-Komplex
IKKα	Inhibitor-der-NFκB-Untereinheit-α
IKKβ	Inhibitor-der-NFκB-Untereinheit-β
IL-1α	Interleukin-1α
IL-1β	Interleukin-1-β
IL-1R	Interleukin-1-Rezeptor
IL-2	Interleukin-2
IL-4	Interleukin-4
IL-6	Interleukin-6
IL-10	Interleukin-10
IL-17	Interleukin-17
IL-17R	Interleukin-17-Rezeptor
IL-33	Interleukin-33
INFγ	Interferon-γ
iNOS	Induzierbare-Stickstoffmonoxid-Synthase

IRF	Interferon-Regulierender-Faktor
ITCH	Itchy-E3-Ubiquitin-Ligase
IVIGs	Intravenöse Immunglobuline
JNK	c-JUN-N-terminale Kinase
LPS	Lipopolysaccharide
LUBAC	Linearer-Ubiquitin-Chain-Assembly-Komplex
MAC	Membranangriffskomplex
MALT-1	Translokationsprotein-1 des Mukosa-assoziierten lymphatischen Gewebes
MHC	Haupthistokompatibilitätskomplex
MIC-A und MIC-B	MCH-I-verbundene Ketten A und B
miRNA	Mikro-RNA
MMF	Mycophenolat-Mofetil
mTOR	Ziel des Rapamycins im Säugetier
mTSS	Sharp-Gesamtscore
NEMO	NFκB-essenzieller-Modulator
NFAT	Nukleärer Faktor aktivierter T-Zellen
NFκB	Nukleärer-Faktor-κB
NK-Zellen	Natürliche Killerzellen
NLRP3	NOD-Like-Rezeptor-Protein-3-Inflammasom
NOD	NOD-Like-Rezeptor
NTX	Nierentransplantation
OTU	Ovarialtumordomäne
PASI	Psoriasis Area Severity Index
PBMCs	Mononukleäre Zellen des peripheren Blutes
PRA	Panel-reaktive Antikörper
PRR	Mustererkennungsrezeptoren
RC3H1	Ring-Finger-and-CCCH-Type-Domains-1
RIP1	Rezeptor-Interagierendes-Protein-1
RIPK3	Rezeptor-Interagierende-Proteinkinase-3
RNF11	Ringfingerprotein-11
S381	Serinrest 381
SLE	Systemischer Lupus Erythematoses
SLEDAI	SLE-Disease Activity Index
SNP	Einzelnukleotid-Polymorphismus
SQL	Structured Query Language
TAB2/3	TAK1-Bindeprotein 2/3
TAK1	Transforming-Growth-Faktor-β-Aktivierte-Kinase-1
TAX1BP1	Tax-1-Bindeprotein-1
TCR	T-Zell-Rezeptor
TLR	Toll-Like-Rezeptor
TNFα	Tumor-Nekrose-Faktor-α
TNFAIP3	Tumor-Nekrose-Faktor-α-induziertes-Protein-3-Gen
TNFR	TNF-Rezeptor
TRADD	TNF-Rezeptor-Assoziiertes-Death-Domain-Protein
TRAF2/5	TNF-Rezeptor-Assoziierter-Faktor 2/5
Tregs	Regulatorische T-Zellen
TGF-β	Transforming-Growth-Faktor-β
Ubc13	Ubiquitin-konjugierendes-Enzym-13
VCAM-1	Vaskuläres-Zell-Adhäsionsprotein-1
Wnt-Signalweg	Wingless-Signalweg
Zn4	Zinkfinger 4
Zn7	Zinkfinger 7

## II. Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Mixe und Verdünnungen der Antikörper der FACS-Analyse .....	38
Tabelle 2: Zusammensetzung des Master Mix .....	43
Tabelle 3: Standardprotokoll für den PCR-Lauf .....	43
Tabelle 4: Charakteristika der Kollektive .....	47
Tabelle 5: Korrelation des Anteils A20-positiver Zellen mit der Zytokinexpression.....	68

### III. Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Aufbau des TNFAIP3-Genlokus (17) .....	3
Abbildung 2: Funktionen von A20 im TNF-Signalweg (10).....	5
Abbildung 3: Struktur des MHC-Lokus des Menschen (45) .....	13
Abbildung 4: Polymorphismus und Polygenie der HLA-Moleküle (45) .....	14
Abbildung 5: Eingabemaske „Nierentransplantation“ des Registers.....	31
Abbildung 6: Eingabemaske „NTX Spendervariablen“ des Registers.....	32
Abbildung 7: Isolation von PBMCs mittels Ficoll®-Dichtegradientenzentrifugation (45).....	34
Abbildung 8: Schema einer FACS-Analyse (45).....	36
Abbildung 9: Prinzip der Entparaffinierung und mRNA-Isolation mittels Qiagen-Kits (74).....	42
Abbildung 10: Alters- und Geschlechterverteilung der Kollektive .....	48
Abbildung 11: Anteil von Leichennierentransplantationen und Lebendnierenspenden .....	49
Abbildung 12: Nephrologische Grunderkrankungen .....	50
Abbildung 13: Kardiovaskuläre Risikofaktoren .....	51
Abbildung 14: Verteilung der Ischämiezeiten.....	52
Abbildung 15: Verlauf von CRP, Kreatinin und Leukozytenzahl.....	53
Abbildung 16: Histologie der ersten Nierenbiopsie nach Nierentransplantation .....	54
Abbildung 17: Anzahl der Mismatche bei Patienten mit und ohne Abstoßungsreaktion .....	55
Abbildung 18: Komplikationen nach Nierentransplantation .....	56
Abbildung 19: FACS-Färbung der CD4+ Zellen.....	57
Abbildung 20: Anteil A20-positiver Zellen bei Gesunden, Dialysepatienten und Transplantierten .....	59
Abbildung 21: Anteil A20-positiver Zellen bei Patienten mit und ohne Abstoßungsreaktion .....	61
Abbildung 22: Anteil A20-positiver Zellen – Nephrologische Grunderkrankungen im Vergleich .....	62
Abbildung 23: Korrelation der A20-Expression mit klinischen Transplantationsparametern .....	63
Abbildung 24: Zytokine in CD4+ Zellen bei Gesunden, Dialysepatienten und Transplantierten .....	65
Abbildung 25: Zytokine in CD4+ Zellen bei Transplantierten mit und ohne Abstoßungsreaktion .....	66
Abbildung 26: A20-mRNA-Gesamtexpression im Transplantatnierengewebe (RT-qPCR) .....	69
Abbildung 27: Immunhistochemie – Intrarenale A20-Expression auf Proteinebene .....	71

# 1 Einleitung und Ziel der Dissertation

Die Nierentransplantation ist die erfolversprechendste Therapieoption für Patienten mit chronischer Niereninsuffizienz im Stadium 5 (1). Sie verbessert im Vergleich zur Dialyse Lebensqualität und Lebenserwartung (2). Trotz der Fortschritte der letzten Jahre bezüglich der Transplantatüberlebenszeit besteht weiterhin das Risiko, ein Transplantat durch akute oder chronisch vermittelte immunologische Schädigung vorzeitig zu verlieren (2, 3). Im Rahmen der Betreuung von Patienten nach Nierentransplantation gilt es, das Transplantat durch den Einsatz von Immunsuppressiva vor Abstoßungsreaktionen zu schützen und gleichzeitig das Risiko unerwünschter Arzneimittelwirkungen und Infektionen zu minimieren. Bei einer Transplantatfunktionsverschlechterung ist die invasive Nierenbiopsie aufgrund fehlender Biomarker des peripheren Blutes noch immer Goldstandard der Diagnostik. Die medizinische Betreuung von Patienten nach Nierentransplantation bleibt somit weiterhin eine Herausforderung.

Das Ubiquitin-editierende Enzym A20 ist ein zentraler Inhibitor des Transkriptionsfaktors Nukleärer-Faktor- $\kappa$ B (NF $\kappa$ B) und beeinflusst eine Vielzahl immunologischer Signalkaskaden (4). Dem Protein A20 wurden vielseitige immunregulatorische und antiinflammatorische Eigenschaften zugeschrieben, wodurch Zellhomöostase und Entzündungshemmung sowie Zellzyklus und Apoptose beeinflusst werden. Veränderungen der A20-Expression konnten bei Erkrankungen mit autoinflammatorischer Komponente, wie dem Ischämie- und Reperfusionsschaden und bei verschiedenen Autoimmunerkrankungen gemessen werden.

Die Funktion von A20 im Kontext der chronischen Niereninsuffizienz, der Dialyse und insbesondere der Nierentransplantation ist noch unzureichend untersucht. Erste Ergebnisse legen eine Assoziation zwischen der Funktion und Expression von A20 und dem Ausmaß immunologisch-vermittelter Transplantatschädigung nahe (5).

Die vorliegende Arbeit soll die Rolle von A20 bei Nierentransplantierten und schwerpunktmäßig bei immunologischer Transplantatschädigung beleuchten. Dazu wird zunächst untersucht, ob sich die A20-Expression in mononukleären Zellen des peripheren Blutes (PBMCs) bei Nierentransplantierten, Dialysepatienten und Gesunden, bei Patienten mit und ohne Abstoßungsreaktion und bei Patienten mit unterschiedlichen nephrologischen Grunderkrankungen unterscheidet. Anschließend sollen Zusammenhänge zwischen der gemessenen A20-Expression in PBMCs und klinischen Transplantationsparametern herausgearbeitet werden. Nachfolgend wird untersucht, ob auch Unterschiede bezüglich der A20-Expression im intrarenalen Gewebe bei Patienten mit und ohne Abstoßungsreaktion existieren.

Abschließend wird bewertet, ob A20 als diagnostischer und prognostischer Biomarker oder als Therapietarget im Kontext der Nierentransplantation dienen könnte.

## 2 Literaturdiskussion

### 2.1 A20 – Stand der Forschung

#### 2.1.1 Einführung und historischer Hintergrund

A20 ist ein Ubiquitin-editierendes Enzym und ein zentraler Inhibitor des Transkriptionsfaktors NFκB (4). Da zahlreiche immunologische Signalkaskaden in der Aktivierung von NFκB münden, ist A20 ein wichtiges immunregulatorisches und antiinflammatorisches Enzym, das zur Zellhomöostase und Entzündungshemmung beiträgt und darüber hinaus den Zellzyklus sowie den Zelltod und das Überleben von Zellen beeinflusst.

Im Jahre 1990 wurde von Dixit et al. erstmals die Expression von A20 in Endothelzellen nach Stimulation mit Tumor-Nekrose-Faktor-α (TNFα), Interleukin-1-β (IL-1β) und Lipopolysacchariden (LPS) nachgewiesen (6). Die Induktion von A20 durch TNF konnte nachfolgend über die Wirkung von κB-Transkriptionsfaktoren erklärt werden (7). Weitere Untersuchungen konnten die NFκB-inhibierende Funktion von A20 belegen (8). Erste Mausmodelle ergaben, dass ein homozygoter A20-knock-out aller Zellen schwere Entzündungsreaktionen multipler Organe bewirkt und zum Tod bereits in der Perinatalperiode führt (9).

Diese ersten Untersuchungen wiesen auf die Regulation kritischer Schritte der Immunzellhomöostase durch A20 hin (10). Diese Homöostase gerät aus dem Gleichgewicht bei Erkrankungen mit autoinflammatorischer Komponente, die mit verstärkter Zytokinproduktion einhergehen, sowie bei Autoimmunerkrankungen, die durch autoreaktive T-Zellen und Autoantikörper vermittelt werden (10). Daher wurde eine Dysregulation von A20 mit verschiedenen Erkrankungen mit autoinflammatorischen und autoimmunen Komponenten in Verbindung gebracht. Insbesondere waren dies Ischämie- und Reperfusionsschaden, Systemischer Lupus Erythematoses (SLE), Rheumatoide Arthritis, Psoriasis und chronisch entzündliche Darmerkrankungen.

#### 2.1.2 Expression und Struktur von A20

Das Ubiquitin-editierende Enzym A20 wird vom Tumor-Nekrose-Faktor-α-induzierten-Protein-3-Gen (TNFAIP3) kodiert, das in der Chromosomenregion 6q23 liegt und eine Länge von 790 Aminosäureresten aufweist (11, 12). A20 ist ein pleiotrop exprimiertes, zytoplasmatisches Protein (4).

Die basale Expressionsrate von A20 ist in den meisten Zellen relativ gering, da die Expression durch den Downstream-Regulatory-Element-Antagonist-Modulator (DREAM) supprimiert wird (10, 13). Ausnahmen bilden bestimmte Immunzellen, wie periphere T-Zellen, Thymozyten und dendritische Zellen oder Organe deren Zellen gegenüber hohen Antigenmengen exponiert sind, wie beispielsweise

Zellen der Lunge (14). Auf transkriptioneller Ebene wird die Expression von A20 durch Bindung, beispielsweise des Orphan-Rezeptors Estrogen-Related-Receptor- $\alpha$  (ERR $\alpha$ ), an zwei NF $\kappa$ B-Bindungsstellen des TNFAIP3-Promotors eingeleitet (10, 15).

Ubiquitinierung ist ein posttranslationaler Regulationsmechanismus, durch den mono- oder polymere Ubiquitinmoleküle über verschiedene Bindungsarten Lysin- oder Methioninresten von Zielproteinen angefügt werden (16). Je nach Art der Bindung werden dadurch die Aktivität oder die Lokalisation der Zielproteine sowie die Interaktionen verschiedener Proteine untereinander reguliert (16). An der Ubiquitinierung sind Ubiquitin-aktivierende Enzyme (E1), Ubiquitin-konjugierende Enzyme (E2) und Ubiquitin-Ligasen (E3) beteiligt (16). Darüber hinaus spalten Deubiquitinasen (DUB) Ubiquitinmoleküle von Zielproteinen ab, sodass Ubiquitinierung einen hoch dynamischen und reversiblen Prozess darstellt (16).

A20 besteht aus zwei unterschiedlichen Domänen, die jeweils unterschiedliche Reaktionen katalysieren. Am carboxyterminalen Ende enthält A20 eine Zinkfingerdomäne, die sieben Zinkfinger aufweist (4). Zinkfinger 4 (Zn4) ist einerseits eine E3-Ligase, die K-48-verbundene Polyubiquitinketten an Zielproteine anfügt, wodurch diese für den Abbau im Proteasom markiert werden (17). Andererseits hat Zn4 Ubiquitin-bindende Eigenschaften und fördert dadurch die Bindung von A20 an ubiquitinierte E2-Enzyme (4, 18). Die Zinkfingerdomäne 7 (Zn7) bindet lineare Polyubiquitinketten und kann dadurch die Aktivierung bestimmter Proteine supprimieren (17). Die Funktionen der fünf weiteren Zinkfinger sind noch nicht abschließend geklärt (4). Die aminoterminal Ovarialtumordomäne (OTU) von A20 enthält einen katalytischen Cysteinrest (C103) und vermittelt die Funktion eines deubiquitinierenden Enzyms (10, 17). Sie spaltet aktivierende, K-63-verbundene Polyubiquitinketten von Zielproteinen ab, wodurch Ubiquitin-abhängige Signale unterbunden und die Anlagerung nachgeschalteter Proteine inhibiert werden (4, 17).

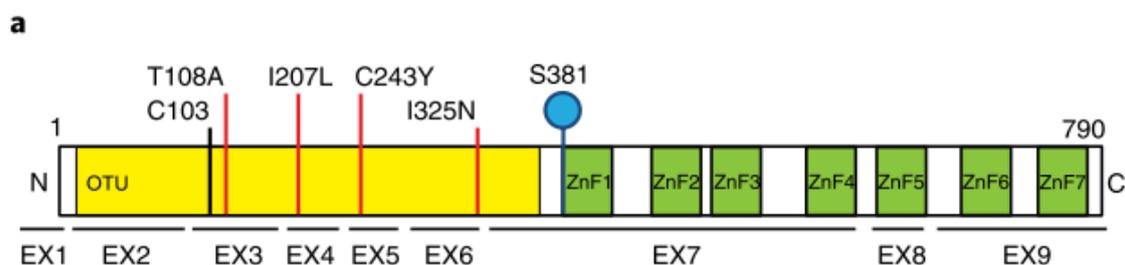


Abbildung 1: Aufbau des TNFAIP3-Genlokus (17)

### 2.1.3 A20-kontrollierte Signalwege

Weitere Untersuchungen beleuchteten, dass A20 nach Ligandenbindung an verschiedenste Rezeptoren der angeborenen und erworbenen Immunantwort über die Inhibition von NFκB wirkt. Das konnte einerseits für Mustererkennungsrezeptoren wie membranständige Toll-Like-Rezeptoren (TLR) und zytoplasmatische NOD-Like-Rezeptoren (NOD) belegt werden (4, 19). Andererseits wurde es für den zur TNF-Rezeptor-Superfamilie gehörenden Rezeptor Cluster-of-Differentiation-40 (CD40), Zytokinrezeptoren wie den Interleukin-1-Rezeptor (IL-1R) oder den IL-17-Rezeptor (IL-17R) sowie die lymphozytären T-Zell-Rezeptoren (TCR) und B-Zell-Rezeptoren (BCR) beschrieben (19). Zuletzt gab es aber immer mehr Hinweise, dass A20 auch eine davon unabhängige Funktion in der Verhinderung des Zelltods zukommt, die für die antiinflammatorische Funktion verantwortlich ist (18). So wurden NFκB-unabhängige A20-Funktionen in der Regulation des NOD-Like-Rezeptor-Protein-3-Inflammasoms (NLRP3), des Wntless-Signalwegs (Wnt), des Interferon-Regulierenden-Faktor-Signalwegs (IRF) und der Autophagie beschrieben (10, 19).

#### 2.1.3.1 NFκB-Signalweg

NFκB ist ein zentraler Transkriptionsfaktor, der in nahezu allen menschlichen Zellen exprimiert wird (20). Er unterstützt die Transkription von vielen verschiedenen Genen, unter anderem von Zytokinen, Chemokinen, Akute-Phase-Proteinen, antiapoptotischen und zellzyklusregulierenden Proteinen (20). NFκB kann durch den kanonischen oder den nicht-kanonischen Signalweg aktiviert werden, wobei A20 den kanonischen Signalweg reguliert (19). Insgesamt sind fünf unterschiedliche NFκB-Moleküle bekannt: RelA, RelB, c-Rel, NFκB1 und NFκB2, die als Homo- oder Heterodimere an Bindungsstellen auf der DNA binden (10). Der zytosolische Inhibitor von NFκB (IκB) bindet im Ruhezustand NFκB und verhindert dadurch dessen Translokation in den Nukleus (19). Ein Schlüsselmechanismus des NFκB-Signalwegs ist die Aktivierung des Inhibitors-von-NFκB-Komplexes (IKK), der im kanonischen Signalweg durch den Inhibitor-der-NFκB-Untereinheit-α (IKKα), den Inhibitor-der-NFκB-Untereinheit-beta (IKKβ) und die regulatorische Untereinheit NFκB-essenzieller-Modulator (NEMO) gebildet wird (19). Der aktivierte IKK-Komplex phosphoryliert IκB und markiert diesen damit für den Abbau im Proteasom (19). Dadurch wird NFκB frei und dessen Translokation in den Zellkern ermöglicht, um dort an NFκB-Bindungsstellen der Promotoren von Zielgenen als Transkriptionsfaktor zu wirken (19, 21).

#### 2.1.3.2 TNF-Signalweg

Exemplarisch werden hier die Funktionen von A20 im TNF-Signalweg erläutert: Im TNF-Signalweg führt die Bindung von Liganden an den TNF-Rezeptor (TNFR) zur Anlagerung von Adapterproteinen, wie TNF-Rezeptor-Assoziiertem-Death-Domain-Protein (TRADD), Rezeptor-Interagierendem-Protein-1

(RIP1) und TNF-Rezeptor-Assoziiertem-Faktor 2/5 (TRAF2/5), die den TNFR-Komplex bilden (19). Durch Unterstützung des E2-Enzyms Ubiquitin-konjugierendes-Enzym-13 (Ubc13) und des E3-Enzyms Zellulärer-Inhibitor-des-Apoptoseproteins-1/2 (cIAP1/2) erfolgt die K-63-Polyubiquitinierung von RIP1 (10, 19). Die so entstandene Polyubiquitinkette ermöglicht einerseits die Rekrutierung der Transforming-Growth-Faktor- $\beta$ -Aktivierten-Kinase-1 (TAK1), die zusammen mit TAK1-Bindeprotein 2/3 (TAB2/3) einen Komplex bildet, und andererseits die Anlagerung des NF $\kappa$ B-Essentiellen-Modulators, der zum IKK-Komplex zählt (10, 19). Durch die räumliche Nähe der beiden Komplexe kann TAK1 jetzt IKK $\beta$  phosphorylieren und damit NF $\kappa$ B aktivieren (19). Des Weiteren wird NEMO durch den Linearen-Ubiquitin-Chain-Assembly-Komplex (LUBAC) phosphoryliert, der zur Anlagerung des IKK-Komplexes und zur Stabilisierung des IKK/LUBAC-Komplexes führt (10, 19). Innerhalb dieses Signalwegs hydrolysiert A20 die K63-verbundenen Polyubiquitinketten von RIP1 und fügt K-48-verbundene Polyubiquitinketten an, um RIP1 für den Abbau im Proteasom zu markieren (10, 19). Zudem destabilisiert A20 die Interaktion von Ubc13 und cIAP1/2 und markiert Ubc13 durch K48-Polyubiquitinierung für den Abbau (10, 19). Gleichzeitig konkurriert die Zn7-Domäne von A20 mit NEMO um die Bindung an Ubiquitinketten und destabilisiert dadurch den IKK/LUBAC-Komplex (10, 19).

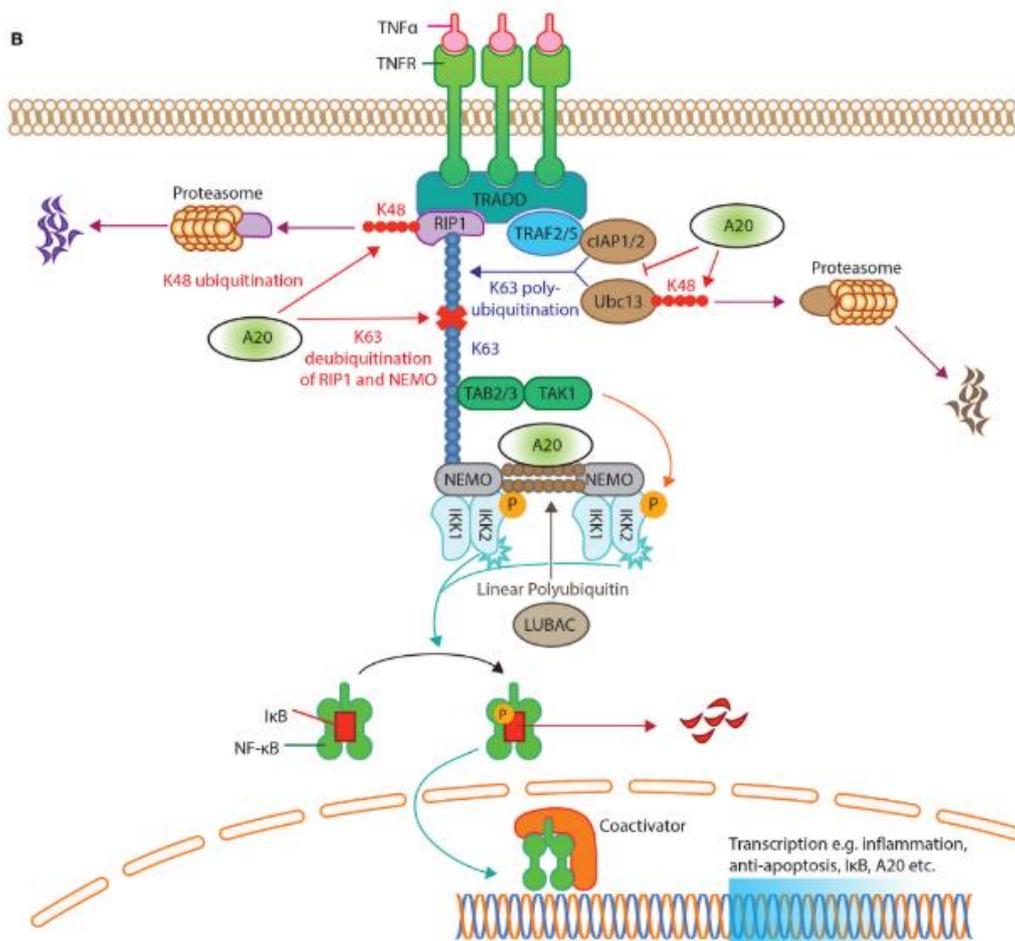


Abbildung 2: Funktionen von A20 im TNF-Signalweg (10)

#### 2.1.4 Regulation von A20

Die Funktion und Expression von A20 unterliegt verschiedenen transkriptionellen, post-transkriptionellen und post-translationalen Regulationsmechanismen (10). A20 vermittelt Feedback-Inhibition, da die TNFAIP3-mRNA direkt durch NFκB induziert wird und A20 gleichzeitig als negativer Regulator des NFκB-Signalwegs fungiert (17).

Auf transkriptioneller Ebene wirken Glukokortikoide fördernd auf die A20-Expression (21). Über Bindung des Glukokortikoidrezeptors an einen intronischen Enhancer des TNFAIP3-Genlokus kann, eingeleitet durch proinflammatorische Stimuli, eine verlängerte A20-Expression sogar nach Reduktion von NFκB aufrechterhalten werden (14, 21).

Im Review von Das et al. werden mRNA-bindende-Proteine und Mikro-RNAs (miRNAs), die auf posttranskriptioneller Ebene die Stabilität des TNFAIP3 Transkripts regulieren, zusammengefasst (10). Ring-Finger-and-CCCH-Type-Domains-1 (RC3H1), ein mRNA-bindendes-Protein, destabilisiert die TNFAIP3-mRNA und verringert dadurch die A20-Expression (10). Im Mausmodell konnte zudem die Induktion von Autoimmunität ursächlich auf mutiertes RC3H1 zurückgeführt werden (10). Ebenso bedingen nicht-kodierende miRNAs, nach Bindung komplementärer RNA-Abschnitte der 3'-untranslatierten Region (3'UTR), die Inhibition der A20-Expression (22). Dysregulierte miRNA-Expression von TNFAIP3/A20 scheint daher auch in der Pathogenese bestimmter Autoimmunerkrankungen oder Tumorerkrankungen relevant zu sein (22, 23). Ebenfalls auf posttranskriptioneller Ebene unterliegt A20 in humanen Zellen insbesondere nach Aktivierung von B- und T-Zellen der Proteinspaltung durch das Translokationsprotein-1 des Mukosa-assoziierten lymphatischen Gewebes (MALT-1) am zwischen Zinkfinger 1 und Zinkfinger 2 lokalisierten Argininrest 439 (10, 14). Diese Spaltung führt letztlich zur Unterbrechung des NFκB-inhibitorischen Potenzials von A20 (14).

Im Rahmen der posttranslationalen Modifikation konnte in verschiedenen Zellreihen die Phosphorylierung von A20 am Serinrest 381 (S381) der OTU durch IKKβ nach Stimulation mit TNFα und LPS nachgewiesen werden (24). In inflammatorischer Umgebung wird so durch Förderung der K63-Polyubiquitinierung und der K48-Polyubiquitinierung auf posttranslationaler Ebene die A20-Expression verstärkt (10). Inzwischen konnte für drei A20-OTU-Allele eine abgestufte Verringerung der A20-Phosphorylierung (C243Y > I325N > T108A;I207L) nachgewiesen werden (17). Eine geringe Abnahme der A20-Phosphorylierung scheint die Immunantwort gegenüber bestimmten Pathogenen zu verbessern, wohingegen eine deutlich verringerte A20-Phosphorylierung spontane inflammatorische Erkrankungen bedingt (17). Daher dienen Varianten der OTU, welche die Phosphorylierung von A20 vermitteln, als abstimmbare genetische Elemente, welche die Balance zwischen mikrobieller Toleranz und Immunität beeinflussen (17).

Darüber hinaus scheinen auch zellextrinsische Faktoren, wie Hyperglykämien über die Inhibition von A20 zur entzündlich vermittelten Gewebeschädigung beizutragen (10, 25). So führt in glatten Muskelzellen, die hohen Glukosekonzentrationen ausgesetzt sind, die posttranslationale O-Glykosylierung zur Ubiquitinierung und zum Abbau von A20 im Proteasom (25).

Die Funktionen von A20 sind darüber hinaus abhängig von der Bindung an Adapterproteine, die A20 unter anderem in die Nähe von Polyubiquitinketten lokalisieren (10). Wichtige Adapterproteine sind A20-bindender Inhibitor-der-NFκB-Aktivierung-1/2 (ABIN 1/2) und Tax-1-Bindeprotein-1 (TAX1BP1), die an der Zinkfingerdomäne des C-Terminus von A20 binden, sowie die Itchy-E3-Ubiquitin-Ligase (ITCH) und Ringfingerprotein-11 (RNF11) (4).

### 2.1.5 Funktion in T- und B-Zellen

Die Funktion von A20 in T-Zellen wurde von unterschiedlichen Arbeitsgruppen untersucht. Die von Giordano et al. generierten Knock-out Mäuse, die doppeldefizient für A20 in reifen konventionellen T-Zellen waren, wiesen Lymphadenopathie und T-Zell-Infiltrationen in peripheren Organen auf (26). In vitro reagierten CD8+ Zellen dieses Stamms auf inflammatorische Stimuli mit verstärkter Produktion proinflammatorischer Zytokine, wie Interferon-γ (INFγ) und Interleukin-2 (IL-2) (26). Daher scheint A20 in CD8+ Zellen die Freisetzung von INFγ und IL-2 zu kontrollieren (10).

Daneben wurden von Onizawa et al. A20-doppeldefiziente CD4-Knock-out Mäuse generiert (27). Die T-Zellen dieses Mausstamms zeigten einerseits verringerte Differenzierung naiver T-Zellen zu Th1- und Th-17-Zellen, andererseits unterlagen sie verstärkt der Nekroptose, also dem durch die Rezeptor-interagierende Proteinkinase-3 (RIPK3) vermittelten Zelltod, wodurch sich die Expansion aktivierter T-Zellen verminderte (10, 27). Daher wird A20 eine Bedeutung in der Inhibition der Nekroptose und damit eine fördernde Rolle auf die T-Zell-Proliferation zugewiesen (27). Anhand anderer Untersuchungen an CD4+ Zellen A20-doppeldefizienter CD4-Knock-out Mäuse konnte A20 ein fördernder Einfluss auf Autophagie, die einen wichtigen Prozess der Zellerneuerung darstellt, zugewiesen werden (28). In CD4+ Zellen scheint für diesen fördernden Einfluss die A20-bedingte Inhibition des Autophagie-inhibierenden Ziel des Rapamycins im Säugetier (mTOR)-Signalwegs verantwortlich zu sein (28).

Zur Klärung der Funktionen von A20 in B-Zellen wurden von verschiedenen Arbeitsgruppen Mausmodelle mit A20-Defizienz in B-Zellen untersucht. A20-Defizienz in B-Zellen führte bei Tavares et al. zu einem Anstieg der B-Zellen in den Keimzentren dieser Mäuse (29). Der Stamm entwickelte ein autoimmunes Syndrom, das durch Autoantikörperproduktion und glomeruläre Immunglobulinablagerungen charakterisiert war (29). Daher wurde A20 eine unterstützende Funktion in der Elimination autoreaktiver B-Zellen im Rahmen der in den Keimzentren stattfindenden negativen Selektion zugewiesen (29). Ursächlich war einerseits die Resistenz A20-negativer B-Zellen gegenüber

FAS-induziertem Zelltod (29). Andererseits scheint A20 das Überleben aktivierter B-Zellen zu verhindern, indem es die NFκB-abhängige Transkription des Proteins B-Cell-Lymphoma-x (Bcl-x) limitiert (29). Hövelmeyer et al. beobachteten verstärkte B-Zell-Proliferation und einen Anstieg der Serum-Immunglobuline, der durch Autoantikörperproduktion verursacht war (30). Als Ursache wurde ebenfalls die durch A20-Defizienz bedingte ineffiziente B-Zell-Deletion im Keimzentrum angegeben (30). Chu et al. beobachteten die vermehrte Expression des proinflammatorischen Zytokins Interleukin-6 (IL-6) sowie eine Expansion myeloischer Zellen, T-Effektorzellen und regulatorischer T-Zellen (Tregs) (31). Darüber hinaus zeigten gealterte Mäuse ein Autoimmunsyndrom, das durch Splenomegalie, Plasmazellhyperplasie und Autoantikörperproduktion bestimmt war (31). Daher kontrolliert A20 in B-Zellen die IL-6-Produktion und die Expression des anti-apoptotischen Bcl-x, wodurch die Bildung autoreaktiver Zellen, die Autoimmunphänomene bedingen, verhindert wird (10).

#### 2.1.6 A20 und Ischämie- und Reperfusionsschaden

Durch seine zytoprotektiven und antiinflammatorischen Eigenschaften wurde auch die Bedeutung von A20 für den Ischämie- und Reperfusionsschaden untersucht. Zunächst wiesen Lutz et al. in der Zellkultur an Endothelzellen, die Hypoxie und Reperfusion ausgesetzt waren, die Induktion von A20 sowie die Suppression von NFκB und proinflammatorischer Moleküle durch Vorbehandlung mit A20-Adenovirus nach (32). Nachfolgend zeigten sie an Rattennieren, die ebenfalls Ischämie und Reperfusion ausgesetzt waren, eine Reduktion von akuter Tubulusnekrose und der Expression von NFκB durch Vorbehandlung mit A20-Adenovirus (32). Daher wurde angenommen, dass A20 den Ischämie- und Reperfusionsschaden durch Reduktion entzündlicher Gewebeschädigungen und Apoptose in Endothelzellen und proximalen Tubuluszellen begrenzt und somit zur Aufrechterhaltung der physiologischen Homöostase in Nieren beiträgt (32). Yang et al. untersuchten, inwiefern Methoden der Nierenkonservierung die Expression von A20 beeinflussen (33). Verglichen mit Kälteperfusion zeigte sich bei Nieren von Kaninchen, die nach einer Phase der Ischämie mittels maschineller Perfusion konserviert wurden, vor allem in den Tubulusepithelzellen eine stärkere A20-Expression sowie eine geringere Expression von NFκB und TNFα (33). Gleichzeitig waren entzündliche Veränderungen, Apoptose und Nekroptose in perfundierten Nieren signifikant verringert (33). Die Hemmung der Nekroptose wurde durch die A20-vermittelte Inhibition der RIPK-3-Expression in den maschinell perfundierten Nieren erklärt (33). Die antiapoptotischen Effekte der renalen Zellen wurden auf die Regulation des Signalwegs der c-JUN N-terminalen Kinase (JNK) durch A20 zurückgeführt, ein Mechanismus, der zuvor schon von Won et al. in der Zellkultur beschrieben worden war (33, 34). A20 bindet innerhalb des JNK-Signalwegs die Apoptosesignal-regulierende-Kinase-1 (ASK1), fördert dadurch die ASK1-Degradation und verringert so die Apoptose (33). Einen neuen Mechanismus, über den A20 die Hypoxie-induzierte tubulointerstitielle Inflammation reguliert, zeigten Li et al. auf (35). So

wird in hypoxischen Tubulusepithelzellen der Hypoxie-induzierte-Faktor-1- $\alpha$  (HIF-1 $\alpha$ ) exprimiert, der die Sekretion miRNA23a-beinhaltenender Exosomen fördert (35). In Makrophagen führt miRNA23a wahrscheinlich durch direkte Interaktion mit der 3'UTR von A20/TNFAIP3 mRNA zur verringerten A20-Expression (35). Umgekehrt begrenzt die Transfektion mit einem miRNA23a-Inhibitor die tubulointerstitielle Inflammation durch Verstärkung der A20-Expression (35).

#### 2.1.7 A20 und Nierentransplantation

Durch seine zytoprotektiven und antiinflammatorischen Eigenschaften wurde A20 eine Bedeutung in der Protektion transplantierter Organe gegenüber Inflammation und Abstoßungsreaktionen zugewiesen (32). Dennoch existieren nur wenige Studien, die den Zusammenhang zwischen A20 und Nierentransplantation beschreiben. Zunächst untersuchten Avihingsanon et al. Transplantatnierenbiopsien von Patienten, bei denen der Verdacht auf eine Abstoßungsreaktion bestand, und konnten dadurch erstmals eine Assoziation zwischen der Expression von A20 in den Gefäßen des Transplantats und einer Transplantatabstoßung beschreiben (36). A20 war in Transplantaten ohne Abstoßungsreaktion nicht nachweisbar, wurde aber als Reaktion auf immunologische Schädigung durch akute oder chronische Abstoßungsreaktionen induziert (36). Die Expression von A20 beschränkte sich meist auf Endothelzellen und glatte Gefäßmuskelzellen sowie infiltrierende mononukleäre Zellen (36). Dabei war das Ausmaß der Induktion bei chronischen Abstoßungsreaktionen deutlich geringer als bei akuten (36). Da Biopsien mit Cyclosporintoxizität im Gegensatz zu jenen mit Transplantatabstoßung keinerlei A20 exprimierten, ergab sich, dass nicht jede Form der Transplantatschädigung die A20-Expression verstärkt (36). Ähnliche Ergebnisse legten auch Bodonyi et al. vor, die ebenfalls die Induktion von A20 in Nierenbiopsien von Patienten mit Abstoßungsreaktion zeigen konnten (37).

Nachfolgend wiesen Kunter et al. an Nierentransplantaten von Ratten eine Korrelation zwischen der Expression von A20 in Endothelzellen sowie glatten Gefäßmuskelzellen und der Abwesenheit von Transplantatarteriosklerose nach (38). Histopathologisch ließen sich in Organen mit hoher A20 Expression in glatten Gefäßmuskelzellen nur moderate Gewebeschäden mit minimalen zellulären Infiltraten und erhaltener Gefäßintegrität erkennen (38). Umgekehrt war die A20 Expression in Transplantaten mit eingeschränkter Organfunktion und obstruktiven neointimalen Läsionen verringert oder fehlte vollständig (38). Diese Untersuchung legt daher nahe, dass die Abwesenheit oder Verminderung von A20 in Endothelzellen und glatten Gefäßmuskelzellen proinflammatorische Prozesse durch NF $\kappa$ B-Aktivierung fördert (38). Das korreliert auch mit den Ergebnissen früherer Untersuchungen glatter Muskelzellen, die durch A20-vermittelte Blockade des NF $\kappa$ B-Signalwegs ihre Proliferation drosselten und weniger proinflammatorische Moleküle wie Intrazelluläres-Adhäsionsmolekül-1 (ICAM-1) und Chemokin-C-C-Motiv-Ligand-2 (CCL-2)

sezernierten (38). Ebenso fördern auch aktivierte Endothelzellen die transendotheliale entzündliche Zellmigration und Proliferation glatter Gefäßmuskelzellen durch Expression des Vaskulären-Zell-Adhäsionsproteins-1 (VCAM-1) und ICAM-1 (38). Daher resultiert eine Verringerung der Expression von A20 in der Reduktion seiner zytoprotektiven Effekte durch unkontrollierte NFκB-Aktivierung (38). Auch Teng et al. führten Untersuchungen an Nierentransplantaten von Ratten durch, die Zeichen der chronischen Abstoßung aufwiesen (39). Sie prüften, ob A20 die Fähigkeit verschiedener Immunsuppressiva beeinflusst Transplantatarteriosklerose abzuschwächen (39). Verglichen mit Cyclosporin war die A20-Expression durch Behandlung mit MMF signifikant höher (39). A20 war vor allem in den glatten Muskelzellen der intrarenalen Gefäße nachweisbar, wohingegen die Endothelzellen negativ blieben (39). Zudem konnte A20 in glomerulären Strukturen und in zellulären Infiltraten nachgewiesen werden (39). Erhöhung der A20-Expression könnte daher ein Mechanismus sein, durch den MMF Transplantatarteriosklerose abschwächt (39).

Neben diesen Studien, welche die Bedeutung von A20 bei der Nierentransplantation aufzeigen, wurden weitere Untersuchungen zum Einfluss von A20 auf andere Transplantationen solider Organe durchgeführt, die auch für die Nierentransplantation relevant sein könnten. Yang et al. untersuchten in einem Rattenmodell der chronischer Allograftdysfunktion bei allogener Lebertransplantation die Auswirkungen einer A20-Überexpression (40). Durch Adenovirus-A20-vermittelten Gentransfer konnten die Transplantatfunktion verbessert, die Transplantatfibrose abgeschwächt und das Überleben von Ratten verlängert werden (40). Souza et al. untersuchten sequenzielle Biopsien von Herztransplantaten auf A20-mRNA-Expression und immunhistochemisch auf A20-Proteinexpression (41). A20 wurde zu allen Zeitpunkten exprimiert, war jedoch innerhalb der ersten zwei Monate niedrig und stieg zehn Monate nach Transplantation signifikant an (41). Anders als in der oben genannten Studie von Avihingsanon wurde keine signifikante Assoziation zwischen A20-mRNA-Expression und akuten Abstoßungsreaktionen gefunden (41). Die immunhistochemischen Ergebnisse hingegen waren ähnlich, jedoch aufgrund der geringen Anzahl untersuchter Schnitte nicht verlässlich (41). Demzufolge scheint A20 weniger mit akuten Abstoßungsreaktion assoziiert zu sein, sondern eher im Rahmen der chronischen Immunantwort aktiviert zu werden (41). Gefäßtransplantate dienen in Studien als adäquate Alternative zur Herztransplantation in Bezug auf die Untersuchung von Transplantatarteriosklerose (42). Siracuse et al. zeigten an murinen Aorta-auf-Carotis-Transplantaten, die ein vollständiges Mismatch enthielten, einen Zusammenhang zwischen Transplantatarteriosklerose und direkten vaskuloprotektiven Effekten von A20 auf Endothelzellen und glatte Gefäßmuskelzellen. Adenovirus-vermittelte Überexpression von A20 reduzierte die Transplantatarteriosklerose durch Verringerung der Inflammation im Transplantat und der Infiltration durch Makrophagen und Monozyten (42). Außerdem verstärkte A20-Überexpression die Expression der induzierbaren-Stickstoffmonoxid-Synthase (iNOS), wodurch die Apoptose

Neointima-bildender glatter Gefäßmuskelzellen vermittelt wurde (42). Paradox erschienen jedoch einerseits der Zusammenbruch der immunprivilegierten Media, bedingt durch A20-vermittelte Inhibition der Indolamin-2,3-Dioxygenase (IDO), und andererseits die verstärkte Infiltration der Transplantate durch T-Zellen (42). Letzteres konnte durch die verstärkte Präsenz CD25+/FoxP3+ Tregs erklärt werden (42). Daher verhindert A20 das immunvermittelte Remodeling der Gefäßtransplantate durch Verschiebung einer pathogenen Th1/Th17-dominierten hin zu einer immunregulatorischen Antwort (42). Ein ähnliches Studiendesign wählten auch Moll et al., die vollständig misgematchte murine Aorta-auf-Carotis-Transplantate zwischen einem A20-haploinsuffizienten und einem Wildtyp-Mausstamm generierten (43). In den A20-haploinsuffizienten Aortentransplantaten waren Intimahyperplasie als Zeichen einer ausgeprägteren Transplantatarteriosklerose und verschiedene durch NFκB transkribierte Proteine verstärkt nachweisbar (43). Haploinsuffizienz von A20 korrelierte mit mehr infiltrierenden Natürlichen Killerzellen (NK-Zellen), INFγ-produzierenden Th1-Zellen und die Apoptose in Endothelzellen fördernden Granzym-B+ CD4+ T-Zellen sowie einer geringeren Anzahl FoxP3+ Zellen im Transplantat (43). Umgekehrt hatte die A20-Haploinsuffizienz des Transplantatempfängers keinen Einfluss auf die Transplantatarteriosklerose (43). Diese Erkenntnisse könnten klinisch relevant sein, wenn Organspender bedingt durch Einzelnukleotid-Polymorphismen (SNPs) A20 vermindert exprimieren und diese Organe daher verstärkt zur Transplantatarteriosklerose neigen (43).

## 2.2 Nierentransplantation – Transplantationsimmunologie

### 2.2.1 Einführung und historischer Hintergrund

Die erste erfolgreiche Nierentransplantation (NTX) wurde im Jahr 1954 von John Murray zwischen eineiigen Zwillingen vorgenommen (44). Seither hat sich die Nierentransplantation als erfolgversprechendste Therapieoption für Patienten mit chronischer Niereninsuffizienz im Stadium 5 etabliert (1). Sie verbessert im Vergleich zur Dialyse Lebensqualität und Lebenserwartung (2). Gleichzeitig stellt sie auch aus ökonomischer Sicht die effektivste Therapieoption dar (3). Trotz der Fortschritte der letzten Jahre bezüglich der Transplantatüberlebenszeit besteht weiterhin das Risiko einer Verschlechterung der Transplantatfunktion, bedingt durch Abstoßungsreaktionen, toxische Nebenwirkungen der Immunsuppressiva oder chronische Transplantatdysfunktion (44). Innerhalb der letzten Jahre konnte, vor allem durch Fortschritte im Bereich der Immunsuppression, das Risiko für akute Abstoßungsreaktionen auf 15 bis 20 % vermindert und das 1-Jahres-Transplantatüberleben auf mehr als 95 % gesteigert werden (2, 3). Dagegen gestaltet sich die Verbesserung der Langzeitfunktion schwieriger (3). So blieb das 10-Jahres-Langzeitüberleben des Transplantats in den letzten Jahrzehnten nahezu unverändert (44). Im Rahmen der Betreuung von Patienten nach Nierentransplantation bleibt es daher weiterhin herausfordernd, ein Gleichgewicht zwischen Immuneffektor- und Immunsuppressormechanismen zu erreichen, welches das Transplantat mittels Immunsuppressiva vor Abstoßungsreaktionen schützt und gleichzeitig das Risiko unerwünschter Arzneimittelwirkungen und Infektionen minimiert.

### 2.2.2 Bedeutung der Alloantigene für die Immunantwort

#### 2.2.2.1 HLA-Antigene

T-Zellen können Antigene nur erkennen, wenn sie ihnen im Komplex mit Molekülen des Haupthistokompatibilitätskomplexes (MHC) präsentiert werden. Daher besteht die Funktion des MHCs in der Bindung von Peptidfragmenten und deren Präsentation auf der Zelloberfläche. Die Moleküle des MHCs werden beim Menschen als Humane Leukozytenantigene (HLA) bezeichnet (45). Von immunologischer Relevanz ist die Unterscheidung der Moleküle der HLA-Klasse-I von denen der HLA-Klasse-II. Ihre Gene sind im HLA-Lokus auf Chromosom 6 kodiert und werden kodominant vererbt (45). Beide HLA-Klassen binden das Peptid im Bereich einer Furche, deren Boden durch eine beta-Faltblattstruktur und deren beide Seiten durch jeweils eine  $\alpha$ -Helix gebildet werden. Der Boden enthält Ankerpositionen, an welche Peptidanteile mit bestimmten Aminosäuresequenzen binden können (46). HLA-Klasse-I-Moleküle bestehen aus einer größeren, membranverankerten polymorphen  $\alpha$ -Kette, die im HLA-Lokus kodiert ist, und einem nicht kovalent angelagerten  $\beta$ 2-Mikroglobulin (45). Die  $\alpha$ -Kette besteht aus den drei Domänen  $\alpha$ 1,  $\alpha$ 2 und  $\alpha$ 3. Die  $\alpha$ 1- und  $\alpha$ 2-Domänen bilden die

Peptidbindungsfurche, die  $\alpha 3$ -Domäne die CD8-Bindungsstelle (45, 46). Da die Peptidbindungsfurche an den Enden geschlossen ist, beschränkt sich die Antigenpräsentation auf Peptide mit einer Größe von 8 bis 12 Aminosäuren (46). Unterschieden werden die HLA-Klasse-I-Moleküle HLA A, HLA B und HLA C, deren  $\alpha$ -Ketten differieren (45). HLA-Klasse-I-Moleküle werden auf allen kernhaltigen Zellen exprimiert, präsentieren zytoplasmatische Antigene (z.B. körpereigen und viral) und werden von CD8+ T-Zellen erkannt (46).

HLA-Klasse-II-Moleküle bestehen aus je einer membranverankerten  $\alpha$ - und  $\beta$ -Kette, die assoziieren und jeweils zwei Domänen besitzen (46). Die Peptidbindungsfurche wird von der  $\alpha 1$ - und der  $\beta 1$ -Domäne gebildet und ist an ihren Enden offen, sodass Peptide mit einer Länge von 12 bis 25 Aminosäuren gebunden werden können (46). Die  $\beta 2$ -Domäne dient als CD4-Bindungsstelle (46). Unterschieden werden die Klasse-II-HLA-Moleküle HLA-DR, HLA-DP und HLA-DQ (45). Viele Menschen exprimieren eine zusätzliche  $\beta$ -Kette des HLA-DR (45, 46). Daher können aus den drei Gensätzen vier verschiedene Moleküle der HLA-Klasse-II entstehen (45). HLA-Klasse-II-Moleküle werden auf professionellen antigenpräsentierenden Zellen wie dendritischen Zellen, Makrophagen, Monozyten und B-Zellen exprimiert (46). Sie präsentieren extrazelluläre Proteine (z.B. körpereigen oder bakteriell) und werden von CD4+ T-Zellen erkannt (46).

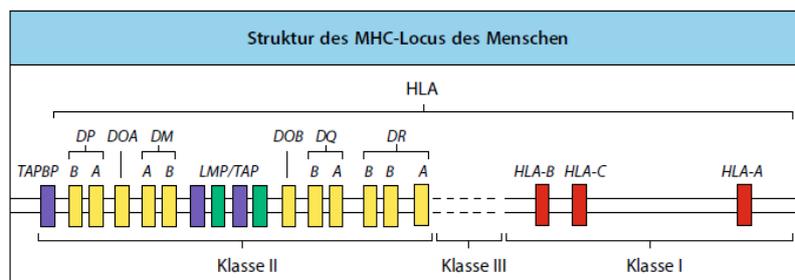


Abbildung 3: Struktur des MHC-Lokus des Menschen (45)

Dass zwei Menschen, bis auf eng verwandte, überwiegend unterschiedliche HLA-Merkmale tragen, ist Ausdruck der HLA-Vielfalt (46). Sie ist sowohl auf der Ebene des Individuums als auch auf jener der Population ausgeprägt und beruht auf Polygenie und Polymorphismus (45).

Durch Polygenie wird die HLA-Vielfalt innerhalb eines Individuums gesichert, indem jeder Mensch mindestens drei unterschiedliche HLA-Klasse-I-Moleküle und drei bis vier unterschiedliche HLA-Klasse-II-Moleküle exprimiert (45). Durch Heterozygotie für einzelne Gene oder den gesamten Haplotyp kann sich die HLA-Anzahl bei kodominanter Expression bis auf das Doppelte erhöhen (45). Der Polymorphismus, also die Variabilität an einem einzelnen Genlocus, sichert die HLA-Vielfalt auf Populationsebene (45). Mit Ausnahme des monomorphen HLA-DR $\alpha$ -Genlocus sind alle weiteren HLA-Genloki diejenigen mit dem höchsten bekannten Grad an Polymorphismus (45). Er beeinflusst das Spektrum der Peptide, die gebunden werden, deren Konformation und die direkte Wechselwirkung

des HLA-Rezeptors mit dem T-Zell-Rezeptor (45). Allelische Varianten betreffen vor allem die Peptidbindungsregion (45). Die Vielfalt ist derart groß, dass die meisten Menschen heterozygot für die HLA-Gene sind (45). Eine spezifische Allelkombination wird als Haplotyp vererbt (46).

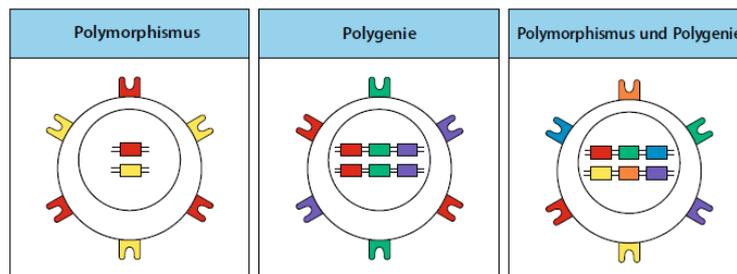


Abbildung 4: Polymorphismus und Polygenie der HLA-Moleküle (45)

Die Bezeichnung Haupthistokompatibilitätskomplex verweist bereits auf die Relevanz des MHC-Genlocus für die Gewebeverträglichkeit, also die Akzeptanz oder Abstoßung eines übertragenen Organs (45, 46). Liegen bei Organempfänger und Organspender unterschiedliche Polymorphismen im HLA-Lokus vor, können T-Zellen des Empfängers Komplexe aus fremden MHC-Allelen mit daran gebundenen Peptiden als Antigen erkennen, dadurch aktiviert werden und eine Immunantwort auslösen (46). Dies wird als Alloreaktivität bezeichnet (45). Die Anzahl der Nicht-Übereinstimmungen der HLA-Moleküle eines Empfänger-Spender-Paares, das sogenannte Mismatch, beeinflusst daher T- und B-Zell-vermittelte Immunantworten sowie das Langzeitüberleben des Transplantats (47). Im Rahmen der Nierentransplantation sind Verschiedenheiten in HLA-A, HLA-B und HLA-DR besonders relevant und werden auch bei der Allokation der Organe berücksichtigt (47). Werden die sechs möglichen HLA-Moleküle eines Empfänger-Spender-Paares verglichen, sind daher null bis sechs Mismatches möglich (47).

#### 2.2.2.2 Nicht-HLA-Antigene

Selbst bei HLA-identischen Empfänger-Spender-Paaren ist eine Immunsuppression zur Prävention von Abstoßungsreaktionen zwingend erforderlich, da Polymorphismen in zahlreichen anderen Genen ebenso eine T-Zell-Reaktion induzieren können (45). Peptidfragmente dieser intrazellulären Proteine liegen gebunden an HLA-Klasse-I-Moleküle vor und werden als Nebenhistokompatibilitätsantigene bezeichnet, da sie verglichen mit Haupthistokompatibilitätsantigenen eine Abstoßungsreaktion langsamer und in geringerem Ausmaß induzieren (45, 48). Nebenhistokompatibilitätsantigene können auf Autosomen und auf Gonosomen kodiert sein (45). Die autosomalen MHC-I-verbundenen Ketten A und B (MIC-A und MIC-B) werden auf Endothelzellen exprimiert und können antikörpervermittelte Abstoßungen triggern (49). H-Y-Nebenhistokompatibilitätsantigene sind auf dem Y-Chromosom lokalisiert und können eine Alloimmunantwort auslösen, wenn ein Organ eines

männlichen Spenders einer weiblichen Empfängerin transplantiert wird (49). Zudem scheinen Loss-of-Function-Mutationen, von denen jeder Mensch circa 20 trägt, eine Immunantwort gegen die jeweiligen Epitope des Spenders zu triggern, sofern bei dem Spender-Empfänger-Paar ein Mismatch in den Loss-of-Function-Mutationen besteht (3). Der Nachweis einer zunehmenden Anzahl an nicht-HLA-Antikörpern (z.B. Angiotensin-Rezeptor-Antikörper, Endothelzell-Antikörper, Glutathione-S-Transferase-T1-Antikörper, Agrin-Antikörper, Vimentin-Antikörper, LG-3-Antikörper, polyspezifische Autoantikörper gegen apoptotische Zellen, Fibronectin-Antikörper und Kollagen-Typ-4-Antikörper) weist auf die Präsenz weiterer alloantigener Strukturen hin, deren Relevanz für die Nierentransplantation noch nicht abschließend geklärt ist (2, 49). Insgesamt scheinen Nebenhistokompatibilitätsantigene das individuelle Nierentransplantatüberleben nur marginal zu beeinflussen (47).

Die nicht-HLA-Antigene des ABO-Blutgruppensystems sind bei der ABO-inkompatiblen Lebendniere spende von grundlegender Bedeutung. Da Kohlenhydratstrukturen auf Erythrozyten bakteriellen Zellwänden ähneln, entstehen gegen diese Strukturen kreuzreagierende Antikörper (46). Toleranzmechanismen verhindern eine Immunantwort gegen körpereigene Kohlenhydratstrukturen, sodass lediglich präformierte Isohämagglutinine gegen die fremden Blutgruppenstrukturen existieren (46). Da präformierte Antikörper eine hyperakute Abstoßung auslösen würden, kann eine ABO-inkompatible Lebendniere transplantation heute nach vorheriger Eliminierung der präformierten Antikörper gegen die Blutgruppenantigene des Spenders durchgeführt werden (47).

### 2.2.3 Evaluation des immunologischen Risikos vor NTX

Körperfremde HLA-Moleküle können als Alloantigene wirken und dadurch das Transplantat schädigen (50). Sensibilisierung bezeichnet die Produktion von Antikörpern gegen fremde HLA-Moleküle (50). Sie setzt eine Antigenexposition und eine funktionierende Immunantwort voraus (50). Die Antigenexposition kann durch Transfusion leukozytenkontaminierter Erythrozyten- oder Thrombozytenkonzentrate, Transplantation mit HLA-Mismatch sowie im Rahmen der Schwangerschaft erfolgen (51).

#### 2.2.3.1 Immunologisches Labor

##### 2.2.3.1.1 HLA-Typisierung

Zur Beurteilung des immunologischen Risikos von Transplantationskandidaten erfolgt zunächst die HLA-Typisierung. Die serologische Typisierung wird zunehmend von der molekulargenetischen Typisierung abgelöst, da deren Fehlerrate geringer ist und nicht von einer vollständigen Antigen-Antikörper-Reaktion abhängt (50, 52). Die molekulargenetische Typisierung geschieht heute hauptsächlich mittels PCR (50). Nachteilig ist jedoch, dass molekulargenetische Methoden nicht die

tatsächliche HLA-Expression auf der Zelloberfläche testen, weshalb bei immunisierten Patienten eine zusätzliche serologische Typisierung der für den Crossmatch verwendeten Spenderzellen erfolgen sollte (52). Früher wurden lediglich die Genloki von HLA-A, HLA-B, und HLA-DR typisiert (50). Inzwischen konnte auch das antigene Potenzial der HLA-Cw, HLA-DQ und HLA-DP nachgewiesen werden (50). Da besonders hochimmunisierte Patienten mit allelspezifischen Antikörpern von genauerer Typisierung profitieren, werden bei potenziellen Spendern im Rahmen der High-Resolution-Typisierung mittels molekulargenetischer Typisierung, Unterschiede auf Aminosäurebasis, die vor allem die Peptidbindungsstelle betreffen, untersucht (50, 52).

Die European Renal Best Practice-Leitlinien empfehlen, die Loki HLA-A, HLA-B und HLA-DR zu matchen. Bei bestehenden Antikörpern gegen HLA-DR, HLA-DQ und HLA-DP soll beim potenziellen Spender eine zusätzliche Typisierung dieser Loki erfolgen (52). Abzuwägen ist ein genaues Matching, welches das Risiko einer Immunisierung verringert und daher eine spätere Retransplantation erleichtert, gegen die längere Wartezeit auf ein Organ (52).

#### 2.2.3.1.2 Antikörperscreening und Identifikation

Um die Transplantation eines Organs, gegen das der Empfänger Antikörper produziert, zu vermeiden, erfolgt zuvor ein Antikörperscreening (50). Im Rahmen der Transplantation sind vor allem donorspezifische Antikörper (DSA) relevant, die durch Immunisierung entstehen. Sie können gegen HLA- und nicht-HLA-Moleküle gerichtet, zytotoxisch oder nicht-zytotoxisch und komplementaktivierend oder nicht-komplementaktivierend sein (47, 53). Da die Rolle von nicht-HLA-Antikörpern wie MIC-Antikörpern oder Angiotensin-1-Rezeptor-2-Antikörpern noch unzureichend untersucht ist, wird ihre Bestimmung von den European Renal Best Practice-Leitlinien nicht empfohlen (52). Zum Nachweis von HLA-DSA stehen zellbasierte oder sensitivere festphasenbasierte Methoden zur Verfügung (54). Mithilfe eines komplementabhängigen Zytotoxizitätstests (CDC), dem ältesten Prinzip zum Nachweis donorspezifischer zytotoxischer HLA-DSA, können Panel-reaktive Antikörper (PRA) bestimmt werden (47, 50). Wird auf ein Lymphozytenpanel einer Population, die der Spenderpopulation möglichst ähnlich ist, Empfänger-Serum gegeben, führt die Bindung zytotoxischer Empfänger-Antikörper nach Zugabe von Kaninchenkomplement zur Zellyse (50). PRA werden in Prozent angegeben und ermöglichen es, die Wahrscheinlichkeit eines positiven Crossmatches bei einem Organangebot abzuschätzen (47). Im Bead-basierten Festphasenassay lässt sich heute allein die Bindung der Antikörper an auf Mikrobeads gebundene rekombinante HLA-Antigene durchflusszytometrisch nachweisen (47, 50). Einerseits ermöglicht das den Nachweis niedrigtitriger und nicht-zytotoxischer Antikörper, die zwar nicht zur hyperakuten Abstoßung führen, aber das Risiko einer Abstoßungsreaktion erhöhen (47, 50, 54). Andererseits lässt sich dadurch das individuelle Antikörperrepertoire bestimmen, das zur Berechnung

der kalkulierten Panel-reaktiven Antikörper (cPRA) verwendet wird (3). Die Bestimmung der cPRA erfolgt durch den computergestützten Vergleich der individuellen Antikörperspezifitäten des Transplantationskandidaten mit der Häufigkeit der korrespondierenden HLA-Moleküle in einer Population, die jener der Spenderpopulation möglichst ähnlich ist (50).

#### 2.2.3.1.3 Crossmatch

Das Crossmatch ermittelt die Kompatibilität zwischen einem Empfänger-Spender-Paar (52). Im Unterschied zum Antikörperscreening werden hierbei alle Spender-HLA-Antigene berücksichtigt, unabhängig von der Höhe der Antigenprävalenz des Spenders in der Normalbevölkerung (50). Als Methoden stehen das CDC-Crossmatch, das FACS-Crossmatch und festphasenbasierte Assays zur Verfügung (47). Im CDC-Crossmatch werden zytotoxische HLA-Antikörper detektiert, die eine hyperakute Abstoßung auslösen können (51). Nicht-zytotoxische HLA-Antikörper, die nicht notwendigerweise zur hyperakuten Abstoßung führen, aber die Prognose des Transplantats verschlechtern, können per FACS-Crossmatch nachgewiesen werden (47). Indem die im Bead-basierten Festphasenassay bestimmten HLA-Antikörper des Empfängers und die HLA-Antigene möglicher Spender in eine Datenbank eingespeist und miteinander verglichen werden, kann heute die Organallokation durch ein virtuelles Crossmatch verbessert werden (49).

#### 2.2.3.1.4 Immunologisches Risiko

Bereits vor der Transplantation bestehende, präformierte Antikörper und im Verlauf nach Transplantation entstehende De-novo-Antikörper stellen die Hauptursache von Abstoßungsreaktionen und Transplantatversagen dar (55). Antikörperscreenings im Rahmen der Nachsorge nach Nierentransplantation detektieren bei 13 bis 30 % der Patienten De-novo-DSA (49). Nicht alle HLA-DSA bergen jedoch das gleiche Risiko (55). Die Beurteilung von Bindungsstärke, komplementbindender Eigenschaften und der IgG-Subklassen von HLA-DSA hat daher die Vorhersage von Transplantatschädigung und -versagen verbessert (55). Ob HLA-DSA Komplement binden oder nicht, wird durch die IgG-Subklasse bestimmt (55). HLA-Klasse-I-Antikörper gehören häufiger den komplementbindenden Subklassen IgG1 und IgG3 an (49, 55). HLA-Klasse-II-Antikörper sind meist nicht-komplementbindende Antikörper der Subklassen IgG2 und IgG4 und häufiger persistent (49, 55). Insbesondere der IgG3-Subklassenstatus von HLA-DSA kann klinische antikörpervermittelte Abstoßungen hervorrufen und daher zu einem schlechteren Transplantationsergebnis führen (55). Dagegen führen HLA-DSA der IgG4-Subklasse häufiger zu subklinischen antikörpervermittelten Abstoßungsreaktionen mit Anzeichen der chronischen Schädigung wie Transplantatglomerulopathie und interstitieller Fibrose (55). Inzwischen lassen sich auch die komplementbindenden Eigenschaften der HLA-DSA differenzieren. C1q-bindende HLA-DSA scheinen bereits kurz nach ihrem Auftreten das

Risiko eines Transplantatverlusts zu erhöhen und daher besonders ungünstig zu sein (49). C3d-bindende HLA-DSA sind noch nicht ausreichend untersucht, könnten aber im Vergleich zu C1q-bindenden Antikörpern ein besserer Prädiktor für Transplantatverlust sein, da C3d die vollständige Aktivierung der Komplementkaskade anzeigt (49).

Die Evaluation des immunologischen Risikos spielt im Zusammenhang mit der Transplantation zu unterschiedlichen Zeitpunkten eine Rolle (50). Ein niedriges immunologisches Risiko wird einer Minderheit von circa 30 % der Patienten zugewiesen (53). Diese Patienten weisen weder HLA-Antikörper noch HLA-DSA, anti-Angiotensin-1-Rezeptor-Antikörper oder einen positiven Enzyme-Linked-Immuno-Spot-Assay (ELISPOT) auf, der ein Maß für die alloantigenspezifische Reaktivität der T-Zellen darstellt (53). Einem mittleren immunologischen Risiko unterliegen Patienten mit negativem oder niedrigem Level an HLA-Antikörpern oder HLA-DSA, niedrigem bis mittlerem Level an Angiotensin-1-Rezeptor-Antikörpern und einem positiven ELISPOT (53). Liegen HLA-DSA, ein hohes Level an Angiotensin-1-Rezeptor-Antikörpern und ein positiver ELISPOT vor, besteht ein hohes Risiko für eine antikörpervermittelte Abstoßung (53). Unter diesen Bedingungen kann eine Desensibilisierung zur Elimination der Antikörper oder eine Teilnahme an speziellen Allokationsprogrammen für immunisierte Patienten sinnvoll sein (50). Das Risiko der Entwicklung von HLA-DSA steigt mit der Anzahl der HLA-Mismatches, bei inadäquater Immunsuppression beziehungsweise mangelnder Therapieadhärenz oder im Rahmen von Entzündungsreaktionen, wie viralen Infektionen, zellulären Rejektionen oder Ischämien (49). Darüber hinaus bestehen vor der Transplantation weitere Risikofaktoren für eine akute Abstoßungsreaktion (53). Das erhöhte Risiko bei African-Americans, bei Jugendlichen, durch PRA von mehr als 0 %, nach Schwangerschaften, erfolgloser Desensibilisierung und Delayed-Graft-Function ist gut untersucht (53). Weniger einflussreich scheinen ein jüngeres Empfängeralter, das mit einer stärkeren Immunantwort einhergeht und die Positivität von Angiotensin-1-Rezeptor-Antikörpern und T-Zell-ELISPOT zu sein (53). Die Evidenz des Einflusses eines höheren Spenderalters, des Geschlechts des Empfängers, langer kalter Ischämiezeiten und vorheriger Transfusionen ist nur schwach (53).

#### 2.2.4 Allokation

Die Allokation der Organe erfolgt unter Berücksichtigung immunologischer und nicht-immunologischer Kriterien (47). Zu den nicht-immunologischen Kriterien zählen Wartezeit, Distanz zwischen Spender und Empfänger und eine Bilanz der Eurotransplant-Länder (47). Die immunologischen Kriterien bilden der Grad der HLA-Übereinstimmung in den Loci HLA-A, HLA-B und HLA-DR sowie ein Korrekturfaktor für die Wahrscheinlichkeit, ein gutes HLA-Match zu erreichen (47).

Liegen bei einem Empfänger-Spender-Paar sechs gleiche HLA-Allele vor, handelt es sich um einen Full-House-Match (56). Dieser geht im Vergleich zu einem Organ, das in keinem Merkmal mit dem

Empfänger übereinstimmt mit einer 15 % besseren 10-Jahres-Transplantatüberlebensrate einher (47). Da die Wahrscheinlichkeit im Regelallokationssystem ein negatives Crossmatch zu erzielen bei hochimmunisierten Patienten besonders gering ist, besteht für sie die Möglichkeit einer Teilnahme an besonderen Programmen (47). Das Acceptable-Mismatch Programm ist für Patienten mit einem vPRA von mindestens 85 % und vorwiegend zytotoxischen HLA-Antikörpern geeignet (57). Durch genaue Bestimmung der HLA-Antigene oder Epitope, gegen die der Patient keine Antikörper bildet, wird so die Transplantationsrate hochimmunisierter Patienten erhöht bei gleichzeitig guten Ergebnissen (52). Um hochimmunisierten Patienten eine Lebendnierenspende zu ermöglichen, existieren in wenigen Ländern auch Paired-Exchange-Programme (52).

#### 2.2.5 Initiation der Immunantwort durch Aktivierung der angeborenen Immunabwehr

Jedes Spenderorgan wird im Rahmen der Transplantation durch Ischämie und Reperfusion geschädigt. Daher stellt der Ischämie- und Reperfusionsschaden eine Hauptursache der Transplantatschädigung dar (51). Je länger die Ischämiezeiten sind, desto höher ist das Risiko für Delayed-Graft-Function und Abstoßungsreaktionen (52). Einerseits bedingt die Ischämie die Umstellung auf einen anaeroben Stoffwechsel, wodurch der pH-Wert sinkt und das Komplementsystem aktiviert wird (51). Andererseits führt sie zum Zusammenbruch der Glykokalix von Endothelzellen, die günstige antithrombotische und komplementinhibierende Faktoren vermittelt (51). Die schnelle Reoxygenierung im Rahmen der Reperfusion begünstigt die Entstehung reaktiver Sauerstoffspezies und verstärkt zudem die Komplementaktivierung (51).

Die durch den Ischämie- und Reperfusionsschaden freigesetzten Schaden-assoziierten molekularen Muster (DAMPs) wie beispielsweise Interleukin-33 (IL-33), Interleukin-1 $\alpha$  (IL-1 $\alpha$ ), Hitzeschockproteine und Adenosintriphosphat (ATP) werden von Mustererkennungsrezeptoren (PRR) erkannt (47). PRRs, wie C1q, Mannose-bindendes Lektin (MBL) und C3b, werden von Zellen des angeborenen Immunsystems, wie Monozyten, dendritischen Zellen und NK-Zellen exprimiert und verstärken die Schädigung des Transplantats (47, 51).

Darüber hinaus triggert der Ischämie- und Reperfusionsschaden sowohl zellvermittelte Rejektionen als auch die Bildung donorspezifischer Antikörper (47). Werden normalerweise kryptische Antigene im Rahmen des Ischämie- und Reperfusionsschadens exponiert, können präexistierende IgM-Antikörper binden und zytotoxische Effekte einleiten (2). Daher kommt der Gewebeschädigung bei der Beschleunigung der antikörpervermittelten Abstoßung eine bedeutende Rolle zu (2).

#### 2.2.6 Von der angeborenen Immunabwehr zur adaptiven Immunantwort

Die Aktivierung der adaptiven Immunantwort setzt die Präsentation eines Antigens gegenüber B- und T-Zellen voraus. Die Präsentation der Antigene erfolgt direkt und indirekt (45). Im Rahmen der direkten Antigenpräsentation wandern dendritische Zellen des Spenders, sogenannte

Passagierleukozyten, über das Blut in die sekundären Lymphorgane des Empfängers und präsentieren den dortigen T-Zellen fremde Antigene im fremden HLA-Molekül (45, 47). Die indirekte Antigenpräsentation erfolgt durch unreife antigenpräsentierende Zellen des Empfängers, die in das Transplantat migrieren und körperfremde Antigene im Komplex mit dem körpereigenen HLA-Molekül präsentieren (47). Die direkte Präsentation ist besonders in den ersten Wochen nach der Transplantation wesentlich und verliert mit dem Absterben der antigenpräsentierenden Zellen des Spenders an Relevanz (47). Die Präsentation eines passenden Antigens gegenüber T-Zellen führt zu deren Aktivierung. Über Th1-Zellen wird die T-Zell-Antwort initiiert, die eine zelluläre Rejektion bedingen kann (47). Die Aktivierung von Th2-Zellen führt über die B-Zell-Hilfe zu einer B-Zell-Antwort, die eine antikörpervermittelte Rejektion auslösen kann (47). Einen Gegenpol zu den proinflammatorischen Th1- und Th2-Zellen bilden die Tregs. Einerseits entstehen Tregs im Thymus, andererseits kann ihre Entwicklung in der Peripherie aus naiven T-Zellen vor allem bei kontinuierlicher Stimulation mit geringen Antigendosen induziert werden (58). Sie können durch Produktion des Transforming-Growth-Faktors- $\beta$  (TGF- $\beta$ ) und Interleukin-10 (IL-10) die Immunantwort begrenzen sowie die Funktionen von CD4+ und CD8+ T-Effektorzellen, B-Zellen, Makrophagen und dendritischen Zellen supprimieren (47, 59). Die Akzeptanz eines Organs ist ein aktiver Prozess und wird maßgeblich durch Tregs beeinflusst (59). Daher wird ein Treg-Verhältnis von mindestens 30 % der T-Effektorzellen als günstig angesehen und könnte ein positiver Prädiktor für ein gutes Transplantations-Outcome sein, insbesondere bei Patienten mit Zeichen der subklinischen Rejektion (58, 59). Die Erhöhung der Anzahl der Tregs, sowohl durch niedrigdosierte IL-2-Applikation als auch durch Zelltherapie ist Gegenstand aktueller Forschung (58, 59). Toleranz, also ein Status in welchem das Immunsystem des Empfängers keine Antigene des Spenders angreift, tritt nur bei wenigen Nierentransplantierten nach komplikations- oder nicht-Adhärenz bedingtem Absetzen der Immunsuppressiva ein (3, 59).

### 2.2.7 Abstoßungsreaktionen

Abstoßungsreaktionen sind von herausragender klinischer Bedeutung, da sie zur Transplantatglomerulopathie führen und langfristig die Hauptursache des Transplantatverlustes darstellen (47, 51). In der Regel sind T- und B-Zell-vermittelte Immunantworten gemeinsam am Versagen eines Transplantats beteiligt und können auch zeitgleich auftreten (47).

#### 2.2.7.1 Antikörpervermittelte Abstoßungsreaktionen

Antikörpervermittelte Abstoßungen können zu unterschiedlichen Zeitpunkten auftreten sowie durch drei unterschiedliche Mechanismen (komplementvermittelte Zytotoxizität, antikörperabhängige zelluläre Zytotoxizität und direkte Endothelzellschädigung) vermittelt werden (49).

DSA sind bei der Pathogenese der antikörpervermittelten Abstoßung von großer Bedeutung. Sie erhöhen das Risiko eine antikörpervermittelte Abstoßung zu erleiden und können nach einer Transplantation neu auftreten (de-novo-DSA), persistieren oder nach Verschwinden erneut nachweisbar sein (60). Bei 10 bis 35 % der Patienten entstehen innerhalb des ersten Jahres nach Transplantation de-novo-HLA-DSA (3). Die Hälfte dieser Patienten weist histologische Zeichen der antikörpervermittelten Abstoßung auf (3). Das Auftreten antikörpervermittelter Abstoßungen in Abwesenheit von DSA wird über die Absorption der DSA durch das Transplantat erklärt (2). Bei der Mehrzahl der Patienten mit antikörpervermittelter Abstoßung sind HLA-DSA nachweisbar (2). Selten können auch nicht-HLA-DSA antikörpervermittelte Abstoßungen bedingen (60). Die Eigenschaften der DSA bestimmen den Mechanismus der Schädigung.

HLA-DSA der IgG1- und IgG3-Subklassen binden an HLA-Klasse-I-Moleküle auf Endothelzellen und vermitteln die komplementvermittelte Zytotoxizität (49). Die DSA werden von der Komplementkomponente C1q gebunden, woraufhin die Komplementkaskade unter Bildung des Komplementspaltprodukts C4d abläuft und der Membranangriffskomplex (MAC) entsteht (47). Der MAC bedingt den Untergang der Zelle durch extrazellulär getriggerte Nekrose und Apoptose, die Induktion der Zytokinexpression und die Rekrutierung von CD4+ Zellen über die Aktivierung des nicht-kanonischen NFκB-Signalwegs (51). C1q-bindende DSA vermitteln eine schwerere Transplantatschädigung und einen früheren Transplantatverlust als nicht-C1q-bindende DSA (49). Die komplementvermittelte Zytotoxizität ist vor allem bei akuten Abstoßungsreaktionen von Bedeutung (49). Als morphologisches Korrelat der Aktivierung des klassischen Weges der Komplementkaskade zeigt sich in der Fluoreszenzmikroskopie die C4d-Positivität peritubulärer Kapillaren, also die kovalente Bindung von C4d an die endotheliale Basalmembran (47, 51).

DSA der Subklassen IgG2 sind nur schwach und DSA der Subklassen IgG4 nicht-komplementaktivierend. Sie binden an HLA-Klasse-II-Antigene auf Endothelzellen und vermitteln die antikörperabhängige zelluläre Zytotoxizität (49). Die Bindung von Zellen des angeborenen Immunsystems wie Makrophagen, NK-Zellen und Neutrophiler an den Fc-Rezeptor der DSA triggern die Degranulation und die Ausschüttung lytischer Enzyme, wodurch Gewebeschädigung und Zelltod vermittelt werden (49). Sie sind vor allem für subklinische und chronische Abstoßungen relevant (49). Die direkte Endothelzellschädigung geschieht durch nicht-komplementbindende Antikörper, die Endothelzellen aktivieren (49). Es kommt zur vermehrten Expression von HLA-Molekülen, der Sekretion von Zytokinen, der Produktion von VEGF, der Hochregulation von Fibroblasten-Wachstumsfaktor-Rezeptoren und ihrer Ligandenbindung (47, 49). Dies führt zur Endothelialitis und zur Proliferation der Endothelzellen (47, 49).

Eine antikörpervermittelte Abstoßung mit massiver Endothelschädigung führt zur Anheftung von Thrombozyten und einer thrombotischen Mikroangiopathie mit Fragmentozyten, Thrombopenie und

akutem Funktionsverlust des Transplantats (47). Zudem kommt es zu Ablagerungen in der extrazellulären Matrix, einem Schlüsselprozess in der Entstehung von Fibrose (3).

Antikörpervermittelte Abstoßungen lassen sich in hyperakut, beschleunigt, aktiv, chronisch aktiv und C4d-Positivität ohne Hinweis auf eine Rejektion einteilen.

Die hyperakute Abstoßung tritt innerhalb von Minuten bis 24 Stunden nach Transplantation bei Vorliegen hoher Titer präformierter HLA-Antikörper, ABO-Antikörper oder nicht-HLA-Antikörper, die gegen das Transplantat gerichtet sind, ein (45, 46, 49). Sie führt zu einer komplementabhängigen, irreversiblen vaskulären Rejektion, Transplantatthrombose und -nekrose sodass meist eine Transplantatnephrektomie indiziert ist (45, 49). Eine hyperakute Abstoßung lässt sich durch die präoperative Bestimmung der DSA im CDC-Crossmatch vermeiden (45). Die beschleunigte Abstoßung tritt innerhalb von 24 Stunden bis mehrere Tage nach Nierentransplantation ein und wird durch die Immunantwort der B-Gedächtniszellen ausgelöst, welche Antikörper im Rahmen der Memory-Antwort produzieren (47, 49). Ein CDC-Crossmatch kann diese Form der Abstoßung nicht vollständig ausschließen (49). Neuerdings besteht die Möglichkeit, zirkulierende B-Gedächtniszellen, welche HLA-DSA produzieren, im B-Zell-ELISPOT nachzuweisen (49).

Die histologischen Veränderungen des Nierentransplantats werden nach der BANFF-Klassifikation beurteilt (47). Seit der letzten Revision der Klassifikation im Jahr 2017 können Patienten, bei welchen sich DSA nicht nachweisen lassen, die aber eine C4d-Positivität oder positive molekulare Assays aufweisen, die Diagnosekriterien der antikörpervermittelten Abstoßung erfüllen (60). Diese molekularen Assays weisen die verstärkte Transkription antikörpervermittelter gewebeschaden-assoziiierter Gene nach (60).

Eine aktive antikörpervermittelte Abstoßung beruht meist auf der Bildung neuer, gegen die HLA-Moleküle des Transplantats gerichteter HLA-DSA (46, 47). Sie liegt vor, wenn ein akuter Gewebeschaden sowie der Nachweis einer bestehenden oder kürzlich zurückliegenden Antikörperinteraktion mit dem vaskulären Endothel des Transplantats bestehen, jedoch ohne morphologischen Nachweis eines chronischen Gefäßschadens (61). Darüber hinaus müssen DSA, die C4d-Positivität peritubulärer Kapillaren oder positive molekulare Assays vorliegen (60). Definiert wird der akute Gewebeschaden durch mikrovaskuläre Inflammation charakterisiert durch Glomerulitis oder peritubuläre Kapillaritis, Arteriitis, akute thrombotische Mikroangiopathie oder akuten Tubulusschaden, jeweils unter Ausschluss anderer potenzieller Ursachen (60, 61).

Die chronische antikörpervermittelte Abstoßung ist eine immunologisch vermittelte, langsame Funktionsverschlechterung des Nierentransplantats, die mit Proteinurie und Hypertonie einher geht (44). Ursächlich scheinen sowohl komplementvermittelte als auch komplementunabhängige Prozesse zu sein (49). Prädiktiv sind akute und unbehandelte subklinische antikörpervermittelte Abstoßungen (49). Sie liegt vor, wenn ein chronischer Gewebeschaden sowie der Nachweis einer

bestehenden oder kürzlich zurückliegenden Antikörperinteraktion mit dem vaskulären Endothel des Transplantats bestehen und zudem DSA, C4d-Positivität oder positive molekulare Assays vorliegen (60). Definiert wird der chronische Gewebeschaden durch Duplikatur der glomerulären Basalmembran (Transplantatglomerulopathie), eine Multilamellierung der Basalmembran peritubulärer Kapillaren oder eine neu aufgetretene arterielle Intimafibrose (60, 62). Sie ist meist irreversibel und im Vergleich zur akuten antikörpervermittelten Abstoßung nur schwer behandelbar (49).

Die C4d-Positivität ohne Nachweis einer Rejektion liegt vor, wenn die peritubulären Kapillaren eine C4d-Positivität zeigen, jedoch die Kriterien einer akuten oder chronischen Gewebeschädigung, wie sie für die Diagnose der aktiven oder chronisch aktiven Abstoßung nötig sind, nicht erfüllt werden (60). Darüber hinaus dürfen weder ein positiver molekularer Assay noch eine T-Zell-vermittelte Abstoßung oder Borderline-Veränderungen nachweisbar sein (60).

#### 2.2.7.2 T-Zell-vermittelte Abstoßungsreaktionen

Im Gegensatz zu antikörpervermittelten Abstoßungsreaktionen ist der Einfluss T-Zell-vermittelter Abstoßungen auf den Transplantatverlust gering (60). Werden naive T-Zellen durch Präsentation eines passenden Antigens in den sekundären lymphatischen Organen aktiviert, differenzieren sie zu T-Effektorzellen und erwerben die Fähigkeit, Kapillaren zu verlassen (46, 47). Die T-Zellen rezirkulieren und werden durch die Entzündungssituation im Transplantat angezogen, woraufhin über Mechanismen des Homings die Extravasation vermittelt wird (46, 47). Zunächst rollen die T-Zellen, vermittelt durch Selektine und ihre Liganden, am Endothel peritubulärer Kapillaren entlang (46). Erfolgt währenddessen eine Aktivierung durch Chemokine, kommt es zu einer Konformationsänderung der Integrine (46). Diese Konformationsänderung bedingt eine verstärkte Adhäsion der T-Zelle am Endothel, welche Voraussetzung für die Diapedese ins Interstitium ist (46). Diese antigenspezifischen T-Zellen rekrutieren nicht-antigenspezifische, INF $\gamma$ -produzierende T-Zellen und mononukleäre Zellen wie Monozyten und Makrophagen, welche die weitere Immunantwort vermitteln (47). T-Zell-vermittelte Abstoßungen werden durch CD4+ und CD8+ T-Zellen vermittelt (47). T-Zell-vermittelte Abstoßungen können sich sowohl im tubulointerstitiellen Gewebe als auch an den Gefäßen manifestieren (60). Allerdings sind interstitielle Inflammation und Tubulitis keine spezifischen Merkmale einer T-Zell-vermittelten Abstoßung, da sie unter anderem auch bei der BK-Nephropathie und Pyelonephritiden bestehen (62). Dagegen ist die erst später auftretende vaskuläre Rejektion mit Endothelialitis pathognomonisch (62).

Histologisch werden Borderline-Veränderungen, akute und chronisch aktive T-Zell-vermittelte Rejektionen unterschieden (60).

Borderline-Veränderungen, charakterisiert durch milde Tubulitis mit interstitieller Inflammation ohne Arteriitis, sind verdächtig für eine T-Zell-vermittelte Abstoßung (60, 62). Ihre klinische Bedeutung ist noch nicht abschließend geklärt (62).

Akute T-Zell-vermittelte Abstoßungen treten bei 10 bis 15 % der Patienten innerhalb weniger Monate nach Nierentransplantation auf und führen, wenn nicht behandelt, nur selten zum unmittelbaren Transplantatverlust (3). Ob akute T-Zell-vermittelte Abstoßungen einen unabhängigen Risikofaktor für den langfristigen Transplantatverlust darstellen, ist hingegen noch unzureichend untersucht (3). Akute T-Zell-vermittelte Abstoßungen lassen sich in Grad I bis III einteilen (60). Grad I geht mit einer interstitiellen Inflammation im nichtsklerotischen kortikalen Parenchym und Tubulitis einher (60). Abstoßungen vom Grad II sind charakterisiert durch eine Arteriitis der Intima, jene vom Grad III durch eine transmurale Arteriitis und/oder eine fibrinoide Nekrose der glatten Gefäßmuskulatur von Arterien und Arteriitis der Intima mit Infiltration mononukleärer Zellen (60).

Die chronisch aktive T-Zell-vermittelte Abstoßung vom Grad I geht mit einer interstitiellen Inflammation im sklerotischen Parenchym und Tubulitis einher (60). Die chronische Transplantatarteriopathie stellt Grad II dar und ist durch arterielle Intimafibrose mit Infiltration mononukleärer Zellen und die Bildung einer Neointima charakterisiert (60).

#### 2.2.8 Einfluss der Immunantwort auf die Transplantatfunktion

Das Einjahresüberleben nach Nierentransplantation ist innerhalb der letzten 25 Jahre deutlich gestiegen und liegt heute bei nahezu 100 % (3, 63). Der Anteil langfristiger Transplantatverluste ist jedoch relativ konstant geblieben, sodass nach Nierentransplantation weiterhin circa 5 % der Organe jährlich verloren werden (3). Insgesamt liegt der Median der kumulativen Halbwertszeit bei 9 Jahren nach Leichennierentransplantation und 12 Jahren nach Lebendnierenspende (3). Hauptursächlich für den Organverlust ist die Fibrosierung, die im Rahmen einer kontinuierlichen Immunantwort stetig voranschreitet (3). Darauf folgt die Rekurrenz der Grunderkrankung, wobei vor allem Komplementdefekte und Glomerulonephritiden relevant zu sein scheinen (3). Circa ein Drittel der Transplantatverluste sind auf mangelnde Therapieadhärenz zurückzuführen, welche durch hohe intraindividuelle Talspiegel die Bildung von de-novo-DSA begünstigt (3). Die meisten Patienten versterben jedoch mit funktionierendem Transplantat, weshalb kardiovaskuläre Ereignisse und maligne Erkrankungen weiterhin die wichtigsten Ursachen der Mortalität nach Nierentransplantation darstellen (47).

Fehlende und verzögerte Funktionsaufnahme stellen Formen des akuten Nierenversagens nach Nierentransplantation dar (47). Eine fehlende Funktionsaufnahme erleiden 1 bis 2 % der Patienten (47). Die verzögerte Funktionsaufnahme ist charakterisiert durch ein akutes Nierenversagen, das innerhalb der ersten Woche nach Transplantation die Dialyse erfordert (3). Die Inzidenz wird in

US-amerikanischen Transplantationszentren auf durchschnittlich 31 % beziffert, wobei sie nach Leichennierentransplantationen deutlich höher ist als nach Lebendnierenspenden (47, 64). Pathogenetisch bedeutend sind sowohl spender- als auch empfängerspezifische Faktoren (64). Der Hirntod des Spenders, Ischämie und Reperfusion bedingen einen proinflammatorischen Status mit Freisetzung von DAMPs und darauffolgender Aktivierung der angeborenen und erworbenen Immunität (47, 64). Dies führt unmittelbar zu einem signifikanten Parenchymverlust durch eine regulierte Nekrose von Tubuluszellen, wodurch die funktionelle Reserve des Transplantats vermindert wird (47). Ein erhöhtes Risiko für eine verzögerte Funktionsaufnahme stellen daher die Leichennierentransplantation, ein höheres Spenderalter, lange kalte Ischämiezeiten und ein akutes Nierenversagen des Spenders dar, wohingegen das Risiko nach Erhalt einer jüngeren Spenderniere niedriger ist (62). Daher ist die verzögerte Funktionsaufnahme mit einem geringeren Ausgangswert der Nierenfunktion, vermehrten Abstoßungsreaktionen und einem geringeren Transplantatüberleben assoziiert (64).

Die chronische Transplantatschädigung kann immunologisch oder nicht-immunologisch bedingt sein (65). Immunologische Ursachen sind wiederholte akute sowie chronische Abstoßungsreaktionen, wobei antikörpervermittelten Abstoßungen eine deutlich größere Bedeutung zukommt als T-Zell-vermittelten Rejektionen (45, 65). Die Transplantatglomerulopathie als Zeichen der chronischen antikörpervermittelten Rejektion zeigt sich bei 10 bis 15 % der Patienten mit Transplantatfunktionsverschlechterung oder Transplantatversagen (65). Nicht-immunologisch bedingte Ursachen können durch Calcineurininhibitortoxizität, Rekurrenz glomerulärer Grunderkrankungen oder BK-Nephropathie bedingt sein (65). Bei Patienten mit progressivem Transplantatversagen sind interstitielle Fibrose und Tubulusatrophie, als Zeichen einer chronischen Schädigung, die häufigsten histologisch diagnostizierten Veränderungen (65). Daher gestaltet es sich oftmals schwer festzustellen, inwiefern die chronische Transplantatschädigung durch spezifische Immunalloreaktivität, durch nicht-immunologisch bedingte Schädigungsmechanismen oder aber die Kombination beider Faktoren vermittelt wird (45).

### 2.2.9 Immunsuppression

Im Rahmen der Nierentransplantation eingesetzte immunsuppressive Therapieschemata unterscheiden zwischen Desensibilisierung, Induktions- und Erhaltungstherapie sowie der Therapie bei Transplantatabstoßung.

Desensibilisierungsprogramme werden vor Transplantation angewendet, um präformierte DSA und ABO-Antikörper aus der Zirkulation zu entfernen (52). Der monoklonale CD20-Antikörper Rituximab bindet Prä-B- und reife B-Zellen und wirkt über komplementabhängige Zytotoxizität, antikörperabhängige zelluläre Zytotoxizität und durch Apoptose vermittelten Zelltod

depletierend (66). Auch mittels Plasmapherese mit nachfolgender Verabreichung intravenöser Immunglobuline (IVIGs) kann die Reduktion präformierter Antikörper erreicht werden (52). IVIGs kompensieren einerseits den Verlust schützender Antikörper, andererseits wirken sie neutralisierend auf DSA sowie durch immunmodulatorische Eigenschaften komplementinhibierend und der Produktion von DSA entgegen (49, 52).

Die Induktionstherapie wird vor oder zum Zeitpunkt der Nierentransplantation begonnen (1). Eingesetzt werden verschiedene depletierende und nicht-depletierende Biologicals, die T-Zell-Antworten zum Zeitpunkt der Antigenpräsentation reduzieren (1). Aktuell gültige Leitlinien der KDIGO stammen aus dem Jahr 2010. Für Patienten der immunologischen Niedrigrisikogruppe wird der Einsatz eines IL-2-Rezeptor-Antagonisten empfohlen (1). Etabliert hat sich dafür der nicht-depletierende Antikörper Basiliximab, der gegen die  $\alpha$ -Kette des IL-2-Rezeptors gerichtet ist, welcher auf der Oberfläche von T-Zellen nach Antigenstimulation exprimiert wird (1, 44, 67). Für Patienten der immunologischen Hochrisikogruppe werden hingegen lymphozytendepletierende Medikamente vorgeschlagen, die verglichen mit IL-2-Rezeptor-Antagonisten Abstoßungsreaktionen stärker reduzieren, allerdings das Risiko für Infektionen und maligne Erkrankungen erhöhen (1). Eingesetzt werden beispielsweise Anti-Thymozyten-Globuline (ATG) und Alemtuzumab. ATG werden durch Immunisierung von Kaninchen gegen humane T-Zellen hergestellt, wodurch sich polyklonale Immunglobulinpräparate gegen diese Zellen gewinnen lassen (45). ATG binden unter anderem CD2, CD3, CD4 sowie CD8 und scheinen durch komplementabhängige Zytotoxizität, antikörperabhängige zelluläre Zytotoxizität und aktivierungsinduzierten Zelltod zur Depletion von T-Zellen zu führen (68, 69). Darüber hinaus scheinen sie das Verhältnis von T-Effektorzellen zu regulatorischen T-Zellen günstig zu beeinflussen (59). Da ATG aber nichthumane Antikörper enthalten, sind sie sehr immunogen und können Anaphylaxie oder Serumkrankheit induzieren (45). Der monoklonale Antikörper Alemtuzumab bindet CD52, welches in hohen Konzentrationen auf CD3+ und CD19+ Zellen vorhanden ist und in geringen Konzentrationen auf NK-Zellen, Monozyten und Makrophagen (70). Durch antikörperabhängige zelluläre sowie komplementabhängige Zytotoxizität wirkt er depletierend (45, 70). Im Vergleich zu ATG wurde jedoch ein höheres Risiko der Bildung von de-novo-DSA beobachtet (54).

Zur Erhaltungstherapie nach Nierentransplantation wird eine Kombination aus Calcineurininhibitor und Proliferationshemmer mit oder ohne Steroide empfohlen (1). Da innerhalb der ersten drei Monate das Risiko akuter Abstoßungsreaktionen am größten ist, werden Immunsuppressiva nach Transplantation schrittweise reduziert, bis zwei bis vier Monate nach Transplantation die niedrigste Erhaltungsdosis erreicht ist (1).

Calcineurininhibitoren werden vor oder während der Nierentransplantation begonnen und wirken vor allem auf T-Zellen, aber auch auf B-Zellen und Granulozyten (1, 45). Die Bindung von Ciclosporin oder

Tacrolimus an ein zytoplasmatisches Immunophilin führt zu einem Komplex, der die Aktivierung von Calcineurin durch Calmodulin blockiert, sodass der nukleäre Faktor aktivierter T-Zellen (NFAT) nicht dephosphoryliert wird und nicht in den Zellkern translozieren kann, um dort als Transkriptionsfaktor wirken zu können (45). Dadurch wird die Expression verschiedener Entzündungsmediatoren, wie IL-2, IL-3, IL-4, TNF $\alpha$  und des Granulozyten-Monozyten-Kolonie-stimulierenden-Faktors (GM-CSF) gehemmt (45). Da die Calcineurin-Konzentration in T-Zellen im Vergleich zu anderen Zellen geringer ist, wirken Calcineurininhibitoren besonders auf T-Zellen (45). Die verringerte IL-2-Produktion hemmt die T-Zell-Proliferation (45). Darüber hinaus wird durch die verminderte Produktion an Zytokinen auch die B-Zell-Hilfe gehemmt, die B-Zell-Proliferation verringert und ihre Apoptose gefördert (45). Über die Verringerung der Calcium-abhängigen Exozytose granulaassoziierter Serinesterasen erfolgt zudem eine Hemmung der Granulozyten (45). Heutzutage ist Tacrolimus Medikament der ersten Wahl, da verglichen mit Ciclosporin akute Abstoßungsreaktionen seltener auftreten und das Transplantatüberleben innerhalb des ersten Jahres nach Transplantation höher liegt (1). Mit Sirolimus steht ein weiteres Immunsuppressivum zur Verfügung, das nach Bindung eines Immunophilins die Aktivierung von mTOR hemmt (45). Dadurch werden T-Zellen in der G1-Phase arretiert und damit ihre Proliferation verhindert, die Differenzierung der T-Effektorzellen vermindert und ihre Apoptose gefördert (45). Darüber hinaus steigt die Anzahl an regulatorischen T-Zellen und T-Gedächtniszellen (45).

Unter den zur Immunsuppression nach Nierentransplantation eingesetzten Proliferationshemmern, kommt heute dem Zytostatikum Mycophenolat-Mofetil (MMF) die bedeutendste Rolle zu. Es stört die Purin-Synthese und betrifft daher die Proliferation sich teilender Zellen, darunter auch Lymphozyten (45). MMF wird zu Mycophenolsäure umgesetzt, welche als Inhibitor der Inosinmonophosphatdehydrogenase die Synthese von Guanodinmonophosphat inhibiert (45).

Steroide werden zum Zeitpunkt der Transplantation hochkonzentriert verabreicht und danach schrittweise reduziert (1). Ob auf Steroide im Verlauf vollständig verzichtet werden kann, wird aktuell diskutiert (1, 71, 72). Steroide haben eine breite antiinflammatorische Wirkung und regulieren circa 20 % der in Leukozyten exprimierten Proteine (45, 46). Sie passieren die Zellmembran und binden an zytoplasmatische Rezeptoren, die daraufhin in den Zellkern translozieren, um über die Bindung an Glukokortikoid-Response-Elemente die Transkription vieler verschiedener Gene zu fördern (45). Einerseits verringern Glukokortikoide die Produktion von Entzündungsmediatoren, wie Zytokinen (z.B. IL-1, IL-3, IL-4, IL-5, TNF $\alpha$ , GM-CSF, CXCL8) Prostaglandinen, Leukotrienen sowie Stickstoffmonoxid und inhibieren dadurch die proinflammatorische Wirkung von Makrophagen, Monozyten, Neutrophilen, NK-Zellen und T-Zellen (45, 46). Andererseits reduzieren Glukokortikoide die Emigration von Immunzellen aus der Zirkulation an den Ort der Entzündung durch Inhibition dafür

benötigter Adhäsionsmoleküle (45, 46). Darüber hinaus induzieren Glukokortikoide in Lymphozyten und Eosinophilen die Apoptose (45).

Zur Therapie akuter zellulärer Abstoßungsreaktionen werden Steroide und lymphozytendepletierende Antikörper eingesetzt (1). Akute antikörpervermittelte Abstoßungsreaktionen werden mit Plasmapherese oder Immunadsorption, IVIGs, CD20-Antikörpern, lymphozytendepletierenden Antikörpern, Bortezomib einzeln oder in Kombination behandelt (1). Der Proteasomeninhibitor Bortezomib aktiviert in Plasmazellen die Apoptose und trägt dadurch zur Reduktion von DSA bei (49). Darüber hinaus bestehen Ansätze, therapeutisch mittels C1-Esteraseinhibitor oder dem monoklonalen Anti-C5-Antikörper Eculizumab die Komplementaktivierung einzuschränken (49, 51).

## 3 Material und Methoden

### 3.1 Material

Für die experimentellen Untersuchungen wurden die Räumlichkeiten der Arbeitsgruppen AG Weinmann-Menke und AG Schwarting der I. Medizinischen Klinik und Poliklinik der Universitätsmedizin Mainz genutzt. Die im Rahmen dieser Arbeit eingesetzten Laborgeräte, Verbrauchsartikel, Reagenzien, Primer, Antikörper etc. werden im Anhang aufgeführt. Dort werden auch alle verwendeten Lösungen und Puffer aufgelistet.

### 3.2 Methoden

#### 3.2.1 Register: Klinischer Verlauf vor und nach Nierentransplantation

##### 3.2.1.1 Patientenkollektiv

Das Patientenkollektiv besteht aus 48 Patienten, die in der Universitätsmedizin Mainz im Zeitraum von 2014 bis 2017 nierentransplantiert wurden. Im Rahmen dieser Studie wurde der klinische Verlauf dieser Patienten vor und nach Nierentransplantation systematisch in einem Register der I. Medizinischen Klinik der Universitätsmedizin Mainz erfasst.

##### 3.2.1.2 Struktur des Registers

Das Register ermöglicht die kontinuierliche und fortlaufende Dateneingabe. Es bietet daher eine Datengrundlage für unterschiedliche Untersuchungen und ermöglicht die Evaluation der Therapie sowie Rückschlüsse auf präventive und rehabilitative Maßnahmen.

Grundlage des Registers ist das Datenbankmanagementsystem PostgreSQL für relationale Datenbanksysteme in der Version 6.0.0 bis 8.2.2. Durch die graphische Benutzeroberfläche (Datenbank-Front-End) können in entsprechenden Formularen standardisiert Daten eingegeben werden, wobei Kategorisierung und Validierung der Daten erfolgen. Zusätzlich besteht die Möglichkeit ergänzende patientenbezogene Informationen per Freitext einzugeben.

##### 3.2.1.3 Datenerfassung

Die in den Dokumentationssystemen der Universitätsmedizin Mainz erhobenen Befunde der Patienten werden in das Register überführt und somit retrospektiv erfasst. Erfasst werden Daten vor und nach Nierentransplantation. Die eingeschlossenen Patienten sind regelmäßig an die nephrologische Ambulanz der Universitätsmedizin Mainz angebunden, wobei sich die Vorstellungsintervalle an dem zeitlichen Abstand und dem klinischen Verlauf nach Nierentransplantation orientieren. Jeder Besuch

in der Ambulanz beinhaltet die standardisierte und detaillierte Erhebung des aktuellen Gesundheitszustands.

#### 3.2.1.4 Patientenliste

Über die Patientenliste lassen sich die erhobenen Befunde in unterschiedliche Eingabemasken eintragen und somit erfassen. Eingabemasken, die zur Verfügung stehen, sind nachfolgend aufgelistet:

- Patientenstammdaten
  - Geburtsdatum, ggf. Todesdatum, Geschlecht, pseudonymisierter Patientencode
- Nebendiagnosen
- Sonstige Medikation
  - Erfassung aller Medikamente (außer Immunsuppressiva) mit Einnahmezeitraum und Dosis
- Datum der Nierentransplantation
- HLA und Blutgruppe
- Laborparameter
  - u.a. Blutbild, Elektrolyte, Entzündungsparameter, Gerinnungsstatus, Nierenretentionsparameter, Infektionsserologie
- Immunsuppressive Medikation
  - Erfassung der Immunsuppressiva mit Einnahmezeitraum und Dosis
- Klinischer Verlauf
  - Körpergewicht, Blutdruck

#### 3.2.1.5 Transplantationsliste

Über die Transplantationsliste besteht die Möglichkeit, empfänger- und spenderbezogene Daten zu erfassen. Dazu stehen folgende Eingabemasken zur Verfügung:

- Nierentransplantation
  - Datum der NTX, Leichen- oder Lebendspende, Körpergröße und -gewicht, nephrologische Vorerkrankungen, Dialysedauer, Restdiurese, Outcome (Abstoßung, Reoperation)
- NTX Operation
  - Ischämiezeiten (kalt, warm, gesamt), Leichen- oder Lebendspende, Seitenlokalisierung des Spenderorgans, Anzahl der Arterien/Venen/Ureteren, Implantation rechts oder links, Größe des Spenderorgans

- NTX Spendervariablen
  - Geschlecht, Alter, Todesdatum, Todesursache, Größe, Gewicht, Blutgruppe, HLA, Diurese der letzten 24 Stunden, Diurese der letzten Stunde, Blutdruck, Herzfrequenz, Reanimation, Herzstillstand, Katecholamine
  - Medizinische Vorgeschichte (arterielle Hypertonie, Diabetes, Rauchen, Drogenabusus, Alkoholabusus, Herzinsuffizienz, Malignom, GFR, Erythrozyturie, Proteinurie)

Beispielhaft sollen hier die Eingabemasken zur Erfassung der Nierentransplantation und der NTX Spendervariablen dargestellt werden.

The screenshot shows a software interface for data entry titled "Nierentransplantation". It is organized into several panels:

- Patient:** Contains a section for "NTX" with a date dropdown set to "31.07.2018", a "Typ" dropdown, and input fields for "Größe [cm]" and "Gewicht [kg]". Below this is an "ECOG" dropdown menu.
- Outcome:** Features a date dropdown set to "09.10.2018" and two checkboxes labeled "Abstoßung" and "Re-Operation".
- Nephrologische Vorerkrankungen:** Includes a table with the header "Diagnose" and several empty rows. Below the table are input fields for "Restdiurese [ml]" and "Dialysedauer [Monate]". A yellow sticky note with the text "ToDo: Control mit Dialysezeiten" is attached to this section.
- Bottom Section:** Contains a table with columns "Datum" and "Klassifikation" and a large text area labeled "Notiz".

At the bottom right, there are two buttons: "Erfassen" (blue) and "Abbrechen" (grey).

Abbildung 5: Eingabemaske „Nierentransplantation“ des Registers

Abbildung 6: Eingabemaske „NTX Spendervariablen“ des Registers

### 3.2.1.6 Komplikationen nach Nierentransplantation

Komplikationen nach Nierentransplantation wurden ebenfalls erfasst. Die dokumentierten Daten beinhalten:

- präformierte Antikörper vor NTX, donorspezifische Antikörper nach NTX, Notwendigkeit der Dialyse nach NTX, Abstoßungsreaktionen (Biopsieergebnisse nach BANFF), Lymphozelen/Urinome/Reflux/Nierenarterienstenosen/Harnleiterstenosen mit konservativer oder operativer Sanierung, fehlende Transplantatfunktion, Revisionsoperationen, CMV-Virämie/Erkrankung, BK-Virämie/Nephropathie, Transplantatnephrektomie

### 3.2.1.7 Auswertung

Eine hohe Datenqualität wird gewährleistet durch manuelle Prüfung der im SAP vorhandenen Patientenakten und Datenbankabfragen zur Überprüfung auf Vollständigkeit. Die statistische Auswertung der erhobenen Daten erfolgt datenbankintern durch Abfragen in SQL (Structured Query Language). Zur statistischen Auswertung werden die Daten in GraphPad Prism in den Versionen 8.3.0 bis 9.1.1. und SPSS der Version 23 exportiert.

### 3.2.2 FACS-Analyse: A20-Expression in PBMCs vor und im Verlauf nach NTX

#### 3.2.2.1 Patientenkollektiv

Das Patientenkollektiv besteht aus 48 Patienten, die in der Universitätsmedizin Mainz im Zeitraum von 2014 bis 2017 nierentransplantiert wurden und deren klinische Transplantationsparameter im Register gemäß den Erläuterungen in Abschnitt 3.2.1 erfasst wurden. Darüber hinaus bestanden keine Ein- und Ausschlusskriterien.

#### 3.2.2.2 Kontrollkollektiv

Das Kontrollkollektiv besteht aus 16 gesunden Probanden. Die Probanden wurden über Ablauf, Ziel und Zweck der Studie informiert. Alle Probanden haben sich nach umfassender Aufklärung freiwillig zur Entnahme und Verarbeitung der Vollblutproben bereiterklärt. Es wurde auf die Anonymität der Daten, Schweigepflicht und den Datenschutz hingewiesen und eine schriftliche Einverständniserklärung zur Verwendung der Daten im Rahmen anonymisierter wissenschaftlicher Studien eingeholt. Im Screening-Interview wurde die Eignung des Probanden für die Teilnahme an der Studie geprüft.

Um eine Vergleichbarkeit zwischen Patientenkollektiv und Kontrollkollektiv zu gewährleisten, wurde bei der Auswahl der Kontrollprobanden auf Einflussfaktoren geachtet. Die Gleichverteilung von Alter und Geschlecht innerhalb der beiden Kollektive wurde angestrebt.

Als Ausschlusskriterien wurden eine vorbestehende Immunsuppression, Autoimmunerkrankungen und akute Infektionen definiert.

#### 3.2.2.3 Probengewinnung

Dem Patientenkollektiv wurde zu drei unterschiedlichen Zeitpunkten jeweils 30 ml Blut in gängiger Venenpunktionstechnik in EDTA-Röhrchen entnommen. Die Zeitpunkte der Probeentnahme sind nachfolgend aufgelistet:

1. Probe

Bei der stationären Aufnahme zur Nierentransplantation und vor Beginn der Immunsuppression

2. Probe

4 - 7 Tage nach Nierentransplantation im Rahmen des stationären Aufenthaltes nach Nierentransplantation

3. Probe

2 - 6 Monate nach Nierentransplantation im Rahmen der Nachsorge in der Nierentransplantationsambulanz der Universitätsmedizin Mainz

Bei 39 Patienten wurden Probe 1 - 3 entnommen und untersucht. Bei 9 Patienten wurden nur Probe 1 und Probe 2 entnommen und untersucht.

Den Kontrollprobanden wurden einmalig 20 ml Blut in gängiger Venenpunktionstechnik in EDTA-Röhrchen entnommen.

#### 3.2.2.4 Isolation mononukleärer Zellen des peripheren Blutes (PBMCs)

Die Isolation mononukleärer Zellen des peripheren Blutes erfolgte innerhalb von 24 Stunden nach Blutentnahme, um die Lebensfähigkeit der im Blut enthaltenen Zellen zu gewährleisten.

##### 3.2.2.4.1 Prinzip

Periphere Blutlymphozyten können aus EDTA-Blut isoliert werden. Die Isolation basiert auf dem Prinzip der Dichtegradientenzentrifugation. Dabei werden die Zellen durch Zentrifugation durch das hydrophile Kolloid Ficoll® entsprechend ihrer Dichte aufgetrennt. Da das Trennmedium eine Dichte von 1,078 g/ml aufweist, sammeln sich Zellen mit einer Dichte unterhalb dieses Wertes, wie Monozyten und Lymphozyten, oberhalb des Trennmediums. Liegt die Dichte von Zellen hingegen oberhalb von 1,078 g/ml, wie dies bei Erythrozyten und Granulozyten der Fall ist, sammeln sich diese unterhalb des Trennmediums. Auf diese Weise lassen sich die unterschiedlichen Zellsorten der Vollblutprobe voneinander trennen. Nach der Zentrifugation lässt sich die milchige Zellschicht oberhalb des Trennmediums, bestehend aus Monozyten und Lymphozyten, mit der Pipette aufnehmen (45).

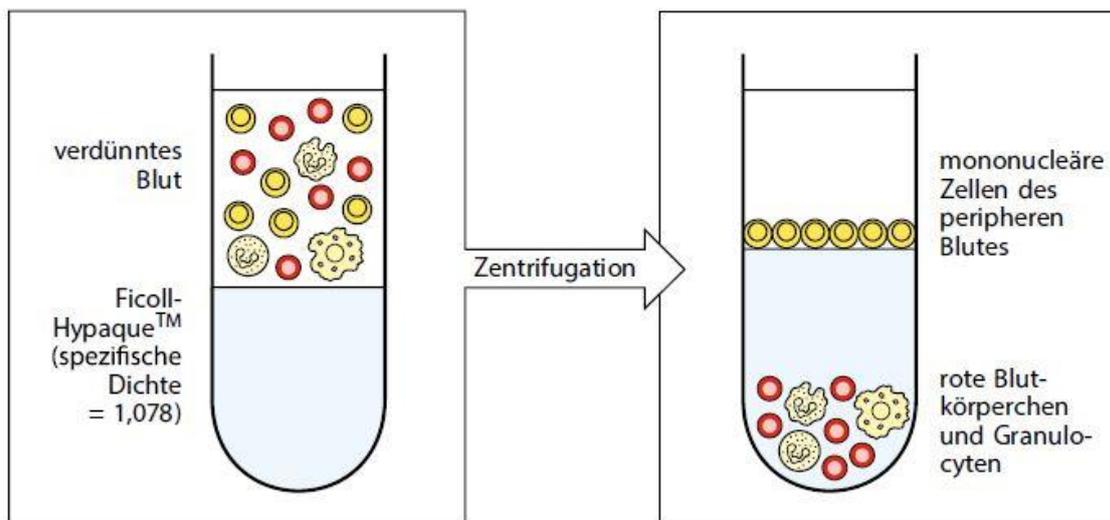


Abbildung 7: Isolation von PBMCs mittels Ficoll®-Dichtegradientenzentrifugation (45)

##### 3.2.2.4.2 Durchführung

Die Isolation der PBMCs wird im sterilen Umfeld durchgeführt. Das entnommene EDTA-Blut wird in ein 50 ml Zentrifugenröhrchen überführt und mit der gleichen Menge PBS verdünnt. Die benötigte Menge Ficoll® wird in einem 50 ml Testtube vorgelegt. Darauf wird das mit PBS verdünnte Blut langsam aufgeschichtet. Nach 35-minütiger Zentrifugation ohne Bremse bei 2500 rpm sammeln sich die PBMCs

in der Grenzschicht zwischen Plasma und Ficoll®. Erythrozyten und Granulozyten befinden sich unterhalb des Trennmediums. Der Plasmaüberstand wird abpipettiert und verworfen. Die Schicht der PBMCs wird mit der Pipette aufgenommen und in ein separates 50 ml Zentrifugenröhrchen gegeben. Dieses wird bis auf 50 ml mit PBS aufgefüllt und fünf Minuten bei 1500 rpm zentrifugiert. Anschließend wird der Überstand abgekippt. Danach werden die Zellen fünf Minuten lang mit 5 ml ACK-Lyse-Puffer inkubiert, um die Lyse eventuell verbliebener Erythrozyten zu bewirken. Dann wird das Zentrifugenröhrchen erneut bis auf 50 ml mit PBS aufgefüllt und fünf Minuten bei 1500 rpm zentrifugiert. Nachfolgend wird ein Waschgang durchgeführt. Dazu wird der Überstand abgekippt, das Zentrifugenröhrchen bis auf 50 ml mit PBS gefüllt und 5 Minuten bei 1500 rpm zentrifugiert. Nach Abkippen des Überstandes werden die Zellen in 2 ml Gefriermedium, bestehend aus RPMI, 10 % FCS und 10 % DMSO, aufgenommen. Je ein Milliliter dieser Suspension wird in ein Gefrieröhrchen überführt und bei -80 °C eingefroren.

### 3.2.2.5 FACS-Analyse: A20-Expression in PBMCs

#### 3.2.2.5.1 Prinzip

Mittels Durchflusszytometrie können Zellen anhand ihrer Größe, ihrer Granularität und ihrer Fluoreszenz unterschieden werden (73). Die FACS-Analyse (Fluorescence-activated Cell Sorting) erlaubt zusätzlich das Sortieren und Zählen von Zellen (45).

Zunächst werden bestimmte oberflächliche oder innere Proteine von Zellen mittels fluoreszenzmarkierter Antikörper markiert (73). Im Durchflusszytometer werden die immunfluoreszenzmarkierten Zellen dann durch eine Kapillare gepresst, wodurch sich die Zellen hintereinander anordnen (45). Im nächsten Schritt passieren die Zellen nacheinander einen Laserstrahl (45). Die Passage einer Zelle durch diesen Strahl führt zum einen zur Streuung des Lichts, zum anderen zur Anregung des Fluoreszenzfarbstoffs (73). Das Maß der Ablenkung des Laserlichts sowie des emittierten Lichts wird von Detektoren wahrgenommen und im zugehörigen Computer in elektrische Spannung übersetzt (45). Das Vorwärtsstreulicht wird mit dem Forward Scatter Detektor (FCS) wahrgenommen und ist proportional zur Zellgröße. Das Seitwärtsstreulicht wird mit dem Sideward Scatter Detektor (SSC) wahrgenommen und ist proportional zur Granularität und Komplexität einer Zelle (73). Das von Fluoreszenzfarbstoffen emittierte Licht wird ebenfalls von Detektoren wahrgenommen (73). Sollen in einer Zelle mehrere Proteine untersucht werden, so wird jedes dieser Proteine mit einem anderen Fluoreszenzfarbstoff markiert (45, 73). Da jeder Detektor für eine bestimmte Wellenlänge sensibel ist, können hierdurch in einem Vorgang unterschiedliche Proteine sichtbar gemacht werden (45, 73). Mithilfe verschiedener Diagramme lassen sich anschließend die Fluoreszenzsignale der markierten Strukturen gegeneinander auftragen und auswerten (45).

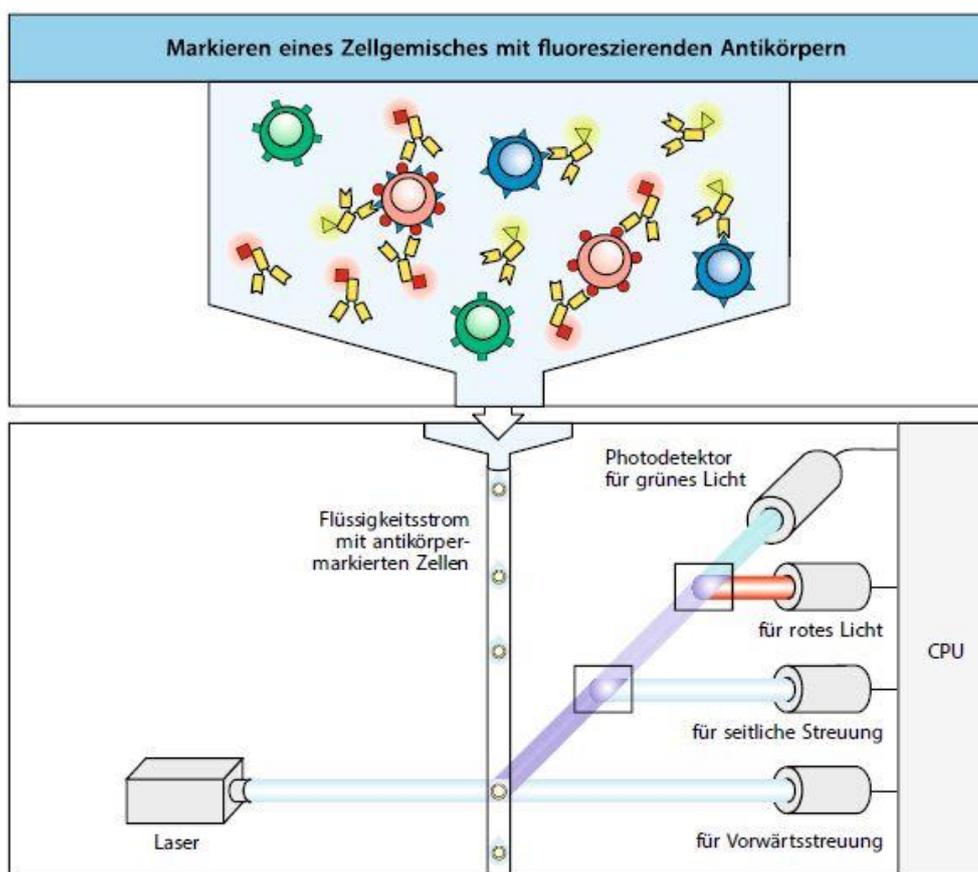


Abbildung 8: Schema einer FACS-Analyse (45)

### 3.2.2.5.2 Vorbereitung der PBMCs für die Durchflusszytometrie

Die Vorbereitung der konservierten Proben erfolgt im sterilen Umfeld. Jede Probe wird aufgetaut und in ein 50 ml Zentrifugenröhrchen mit 10 ml RPMI und 10 % FCS überführt. Danach werden die Zentrifugenröhrchen für fünf Minuten bei 1500 rpm zentrifugiert und der Überstand verworfen. Anschließend werden die Zentrifugenröhrchen nochmals mit RPMI und 10 % FCS gefüllt, fünf Minuten bei 1500 rpm zentrifugiert und der Überstand verworfen. Dann wird das Zellpellet in 800 µl RPMI und 10 % FCS aufgenommen. Für die Stimulation der Zellen werden 700 µl in ein Well einer 12-Well-Platte gegeben. Dazu werden jeweils 300 µl RPMI und das Stimulationsmedium, bestehend aus 0,5 µl PMA, 1 µl Ionomycin und 0,6 µl Golgi-Stop, gegeben. Die verbliebenen 100 µl für Mix 2 werden ebenfalls in ein Well einer 12-Well-Platte gegeben, bleiben allerdings unstimuliert und werden daher nur mit jeweils 900 µl RPMI und 10 % FCS verdünnt. Die Zellen werden vier Stunden bei 37 Grad und 5 % CO<sub>2</sub> im Brutschank inkubiert.

Nach vier Stunden werden die Zellen aus dem Brutschank genommen, in RPMI aufgenommen und in ein 15 ml Zentrifugenröhrchen überführt. Danach werden die Zentrifugenröhrchen fünf Minuten bei 1500 rpm zentrifugiert und der Überstand verworfen. Nachfolgend werden die stimulierten Zellen für

die Mixe 1, 3, 3b, 4, 4b, 5 und 6 in 700 µl FACS-Puffer aufgenommen. Auf jedes Mixwell stimulierter Zellen werden dann 100 µl Zellen gegeben. Die unstimulierten Zellen für Mix 2 werden in 100 µl FACS-Puffer aufgenommen und in das entsprechende Well gegeben. Die verbliebenen Zellen werden für die Einzelfärbungen verwendet und dazu auf 13 Wells verteilt. Pro Patientenprobe entspricht die Anzahl der zu füllenden Wells der Anzahl der Färbungen beziehungsweise Mixe.

### 3.2.2.5.3 FACS-Färbung

#### **Mixe und Verdünnung der Antikörper**

Zunächst müssen die Mixe mit den verdünnten Antikörpern hergestellt werden. Nachfolgend sind die Mixe mit ihren Antikörpern in ihrer jeweiligen Verdünnung dargestellt.

#### **Einzelfärbungen**

Ungefärbte Zellen

CD4-FITC	1:5
CD11b-APC	1:5
CD19-APC	1:5
CD206-APC	1:5
CD4-APC	1:5
CD16-FITC	1:10
CD14-PE	1:10
CD11b-PE	1:10
CD3-PerCP	1:20
<i>A20-FITC</i>	<i>1:20</i>
<i>IL-10-PE</i>	<i>1:5</i>
<i>Sek. AK (Isotyp FITC)</i>	<i>1:20</i>

#### Mix 1 Verdünnung

CD4-FITC	1:5
CD11b-APC	1:5
<i>IL-10-PE</i>	<i>1:5</i>

#### Mix 2 (unstimulierte Zellen) Verdünnung

CD16-FITC	1:10
CD14-PE	1:10
CD206-APC	1:5

<u>Mix 3</u>	<u>Verdünnung</u>
CD11b-PE	1:10
CD4-APC	1:5
<i>A20-FITC</i>	1:20
<i>Sek. AK (Isotyp FITC)</i>	1:20

<u>Mix 3b</u>	<u>Verdünnung</u>
CD11b-PE	1:10
CD4-APC	1:5
<i>Sek. AK (Isotyp FITC)</i>	1:20

<u>Mix 4</u>	<u>Verdünnung</u>
CD14-PE	1:10
CD3-PerCP	1:20
CD19-APC	1:5
<i>A20-FITC</i>	1:20
<i>Sek. AK (Isotyp FITC)</i>	1:20

<u>Mix 4b</u>	<u>Verdünnung</u>
CD14-PE	1:10
CD3-PerCP	1:20
CD19-APC	1:5
<i>Sek. AK (Isotyp FITC)</i>	1:20

Ready to use Mix      Th1/Th2/Th17

CD4-PerCP  
*IL-17A-PE*  
*IFN-GMA-FITC*  
*IL-4-APC*

Ready to use Mix      Th17/Treg

CD4-PerCP  
 FoxP3-APC  
*IL-17A-PE*

Tabelle 1: Mixe und Verdünnungen der Antikörper der FACS-Analyse  
 Intrazelluläre Antikörper sind kursiv geschrieben, extrazelluläre normal. Die extrazellulären Antikörper werden mit FACS-Puffer verdünnt, die intrazellulären mit Saponin-Puffer.

## **Mixfärbungen**

Zuerst wird die extrazelluläre Färbung durchgeführt. Dazu werden die Zellsuspensionen in allen Wells drei Minuten bei 3000 rpm zentrifugiert. Dann werden 100 µl FC-Block in alle Wells gegeben und 10 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Nach dreiminütiger Zentrifugation bei 3000 rpm und Abkippen des Überstandes werden je 50 µl des extrazellulären Antikörpermixes (beziehungsweise bei den Einzelfärbungen ein einzelner Antikörper) auf die Zellen der entsprechenden Wells gegeben. Anschließend werden die Zellsuspensionen 30 Minuten bei 4 Grad inkubiert, dann drei Minuten bei 3000 rpm zentrifugiert und der Überstand verworfen. Danach erfolgt ein Waschgang mit FACS-Puffer und die dreiminütige Zentrifugation bei 3000 rpm. Nach Abkippen des Überstandes wird das Zellpellet in 100 µl Fix/Perm resuspendiert und über Nacht bei 4 °C inkubiert.

Am nächsten Tag wird die intrazelluläre Färbung durchgeführt. Dazu werden die Zellen nach Zentrifugation und Verwerfen des Überstands mit Saponinpuffer gewaschen, zentrifugiert und der Überstand verworfen. Dann werden zu den Zelllösungen der Mixe 1, 3, 4 und zu den Einzelfärbungen IL-10-PE und A20-FITC je 50 µl des jeweiligen intrazellulären Antikörpermixes gegeben, auf alle anderen Wells (alle restlichen Einzelfärbungen sowie Mixe 2, 3b, 4b) werden 50 µl Saponin gegeben. Die Zelllösungen werden anschließend 30 Minuten bei 4 Grad inkubiert. Nachfolgend werden die Platten zentrifugiert und der Überstand verworfen. Dann werden zu den Zellsuspensionen der Mixe 3b und 4b sowie zu der Einzelfärbung Sek. AK je 50 µl des jeweiligen intrazellulären Antikörpermixes gegeben, auf alle anderen Wells Saponinpuffer. Die Zellen werden danach 30 Minuten bei 4 Grad inkubiert, dann zentrifugiert und der Überstand verworfen. Nach zweimaligem Waschen der Zellen mit FACS-Puffer werden sie in 300 µl PFA 1 % resuspendiert und direkt in die FACS-Röhrchen gegeben.

## **Th1/Th2/Th17-Färbung**

Für diese Färbung wird der fertige „Human Th1/Th2/Th17 Phenotyping Kit“ mit den oben aufgeführten Antikörpern verwendet. Die Well-Platten werden fünf Minuten bei 3000 rpm zentrifugiert und der Überstand verworfen. Nachfolgend werden die Zellen in den Wells in 100 µl Cytifix Fixationspuffer resuspendiert und 15 Minuten bei Raumtemperatur im Dunkeln inkubiert. Anschließend folgt die Zentrifugation der Zelllösung und der Überstand wird verworfen. Danach wird die Zellsuspension zweimal mit FACS-Puffer gewaschen und jedes Pellet in je 100 µl Perm/Wash Puffer, der im Kit enthalten ist, resuspendiert und 15 Minuten bei Raumtemperatur im Dunkeln inkubiert. Nach Zentrifugation der Zelllösung wird auch hier der Überstand verworfen. Dann wird zu den Zellsuspensionen der zuvor mit Perm/Wash Puffer verdünnte Antikörper (1:4) gegeben und 30 Minuten bei Raumtemperatur im Dunkeln inkubiert. Anschließend wird die Zelllösung mit FACS-Puffer gewaschen, zentrifugiert und der Überstand wird verworfen. Die Zellen werden in je 100 µl 1 % PFA resuspendiert und im FACS-Röhrchen bei 4 °C im Kühlschrank gelagert.

### **Th17/Treg-Färbung**

Man verwendet für diese Färbung den fertigen „Human Th17/Treg Phenotyping Kit“, welcher die oben aufgeführten Antikörper enthält. Die Zellsuspension wird in den Well-Platten fünf Minuten bei 3000 rpm zentrifugiert und der Überstand verworfen. Dann wird das Pellet in je 100 µl Puffer A, der zuvor mit FACS-Puffer verdünnt wurde (1:10), resuspendiert und 15 Minuten bei Raumtemperatur im Dunkeln inkubiert. Nach Zentrifugieren der Zellsuspension wird der Überstand verworfen. Anschließend werden die Zellen zweimal mit FACS-Puffer gewaschen. Zum Permeabilisieren wird jedes Pellet mit je 100 µl Puffer C, bestehend aus FACS Puffer + im Kit enthaltenem Puffer B (1:50), für 30 Minuten im Dunkeln inkubiert. Nachfolgend werden die Zellen zentrifugiert und mit FACS-Puffer gewaschen. Der Überstand wird verworfen. Dann werden die Wells mit je 10 µl Th17/Treg Phenotyping Cocktail/FACS-Puffer (1:5) für 30 Minuten bei Raumtemperatur im Dunkeln inkubiert und anschließend mit FACS-Puffer gewaschen. Nachfolgend werden die Proben in je 300 µl 1 % PFA resuspendiert und im FACS-Röhrchen bei 4 °C im Kühlschrank gelagert.

#### 3.2.2.5.4 Durchführung der FACS-Analyse

Für jede Probe werden im Durchflusszytometer das Vorwärtsstreulicht, das Seitwärtsstreulicht und die Fluoreszenz erfasst. Dabei werden pro Probe 10 000 Zellen gemessen. Da viele Zellpopulationen selbst in ungefärbtem Zustand aufgrund ihrer chemischen Eigenschaften eine Autofluoreszenz aufweisen, wird zur Bestimmung des Ausmaßes der Autofluoreszenz eine Isotypenkontrolle mitgeführt. Zudem werden als Kontrollen ungefärbte Zellen analysiert.

#### 3.2.2.5.5 Statistische Auswertung

Die statistische Auswertung erfolgt mithilfe der Software GraphPad Prism in den Versionen 8.3.0 bis 9.1.1.

### 3.2.3 RT-qPCR und IHC: A20-Expression im Transplantatnierengewebe

#### 3.2.3.1 RT-qPCR: A20-Gesamt-mRNA-Expression im Transplantatnierengewebe

##### 3.2.3.1.1 Transplantatnierengewebe

Für die RT-qPCR wurde Gewebe aus 15 Transplantatnierenbiopsien verwendet. Diese wurden in der Abteilung für Nephrologie der I. Medizinischen Klinik der Universitätsmedizin Mainz im Rahmen der diagnostischen und therapeutischen Betreuung von Patienten nach Nierentransplantation durchgeführt. Das in dieser Studie verwendete Gewebe wurde demnach nicht direkt für diese Arbeit entnommen. Konserviert und zu Paraffinschnitten weiterverarbeitet wurde das Material in der Abteilung für Nephropathologie des Universitätsklinikums Erlangen. Die bereits fertig konservierten Paraffinschnitte werden für diese Arbeit weiterverwendet.

##### 3.2.3.1.2 Entparaffinierung und Isolation von mRNA aus Transplantatnierengewebe

Die 10 µm dicken formalinfixierten, paraffin-eingebetteten Schnitte werden zunächst entparaffiniert. Dazu wird die Deparaffinization Solution der Firma Qiagen verwendet. Die Entparaffinierung erfolgt gemäß den Vorgaben des Herstellers.

Darauf folgt die RNA-Isolation mittels „RNeasy FFPE-Kit“ der Firma Qiagen, ebenfalls wie im Protokoll des Herstellers angegeben.

Das Prinzip sieht nach Freisetzung von RNA durch Hinzufügen von Proteinase K eine Inkubationsphase bei höheren Temperaturen zur partiellen Aufhebung der Quervernetzung zwischen den freigesetzten Nukleinsäuren vor. Danach wird DNase zur Entfernung von DNA hinzugegeben. Ein spezielles Puffersystem und das Hinzufügen von Ethanol führen zu einer Anreicherung von mRNA und besseren Bindungseigenschaften dieser mRNA an das nachfolgend verwendete Membransystem. Nach Auftragen des Lysats auf eine Silikon-Gel-Membran wird die darin gelöste mRNA selektiv an die Membran gebunden. Danach werden Kontaminationen abgewaschen. Abschließend wird die mRNA in RNase freiem Wasser eluiert (74).

### RNeasy FFPE Procedure

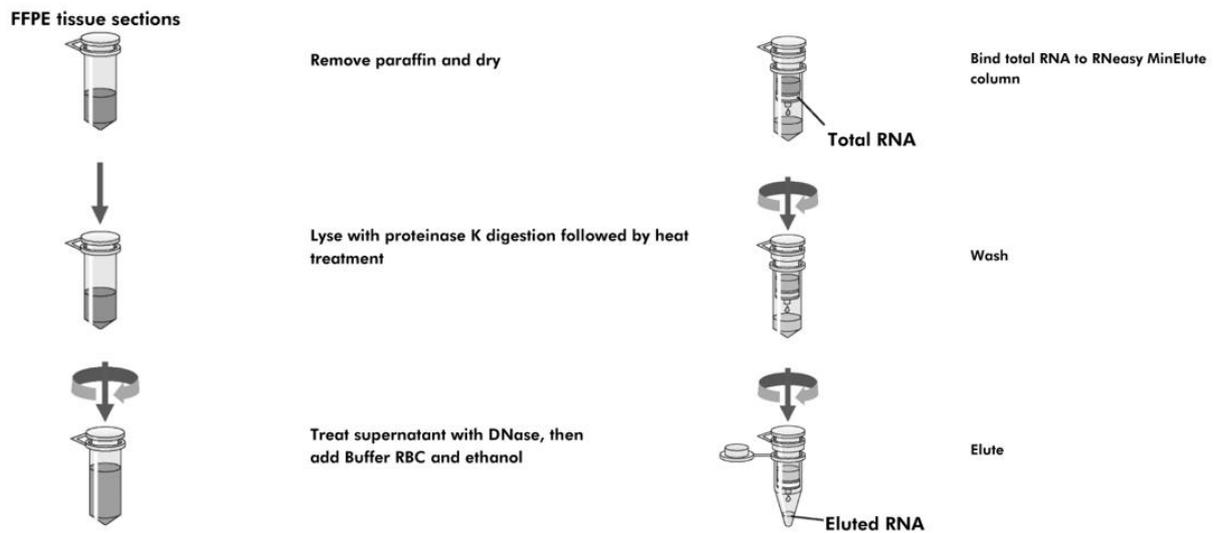


Abbildung 9: Prinzip der Entparaffinierung und mRNA-Isolation mittels Qiagen-Kits (74)

#### 3.2.3.1.3 RT-qPCR: A20-Gesamt-mRNA-Expression im Transplantatnierengewebe

#### 3.2.3.1.4 Prinzip

Die RT-qPCR ermöglicht den quantitativen mRNA-Nachweis in Echtzeit. Zunächst wird dazu die enthaltene mRNA unter Verwendung einer reversen Transkriptase in cDNA umgeschrieben. Danach erfolgt die Amplifikation der cDNA im Thermocycler, der die temperaturabhängigen Schritte der PCR vollautomatisiert durchführt. Während der Denaturierung bei (ca. 95 °C) wird die als Doppelstrang vorliegende cDNA-Matrize in ihre Einzelstränge aufgetrennt. Darauf folgt das Annealing bei ca. 55°C. Hierbei flankieren spezifische Oligonukleotide (Primer) den zu replizierenden einzelsträngigen Nukleinsäureabschnitt und bieten mit ihrem 3'OH-Ende der im nächsten Schritt verwendeten DNA-Polymerase einen Startpunkt. Zuletzt folgt die Elongation, bei der die Synthese eines komplementären DNA Strangs unter Verwendung einer DNA-Polymerase erfolgt. Die Anzahl der Zyklen kann individuell festgelegt werden (75).

Wird diese Methode um die Verwendung fluoreszenzmarkierter DNA-Sonden erweitert, ermöglicht dies den quantitativen cDNA-Nachweis in Echtzeit. Dadurch kommt diese Methode ohne auf die PCR folgende Nachweismethoden wie beispielsweise die Agarosegelelektrophorese aus. Wir verwendeten den interkalierenden Farbstoff SYBR Green I, der nach Bindung an doppelsträngige DNA und Anregung mit blauem Licht deutlich stärker grün fluoresziert, als im ungebundenen Zustand (Absorption 494 nm, Emission 521 nm). Mit fortschreitender PCR-Reaktion kommt es daher zu einem Fluoreszenzanstieg, der proportional zur amplifizierten DNA ist. Mittels Schmelzkurvenanalyse lässt sich anschließend die Menge der in den Proben initial vorhandenen mRNA bestimmen (75, 76).

### 3.2.3.1.5 Durchführung

Zur Durchführung werden der „Quantitect SYBR Green RT-PCR-Kit“ sowie die QuantiTect Primer Kits „humanes beta-Actin“ und „humanes N2A“ der Firma Qiagen verwendet. Die RT-qPCR erfolgt gemäß den Angaben des Herstellers. Dazu wird nach Bestimmung der mRNA-Konzentration mittels NanoDrop™ ein Mastermix mit einem Gesamtvolumen von 20 µl angesetzt, der sich wie unten aufgeführt zusammensetzt. Zur relativen Quantifizierung wird das Housekeeping-Gen Beta-2-Aktin verwendet. Es wird konstant exprimiert und dient somit als Referenzgen der Normierung der Expressionsanalyse. Als Negativkontrolle werden RNase freies Wasser und als Positivkontrolle RNA aus HK2-Zellen und humanen Tubulusepithelzellen mitgeführt.

SYBR Green (2x)	10 µl
RT Mix	0,2 µl
Primer Mix	2 µl
RNase freies H <sub>2</sub> O	2,8 µl
Probe (100 ng in 5 µl)	5 µl

Tabelle 2: Zusammensetzung des Master Mix

Für den PCR-Lauf dient nachfolgend dargestelltes Standardprotokoll. Es werden 40 Zyklen durchgeführt.

Step	Time	Temp	Ramp Rate
1) Reverse Transkription	20 min	50 °C	20°C/sec
2) PCR initiale Aktivierung	15 min	95°C	20°C/sec
3) Denaturierung	15 sec	94°C	20°C/sec
4) Annealing	20 sec	55 °C	20°C/sec
5) Extension	20 sec	72 °C	2°C/sec
6) Cycling (Schritte 3 - 4)	40 Zyklen		
7) Datenerhebung	5 sec		20°C/sec

Tabelle 3: Standardprotokoll für den PCR-Lauf

### 3.2.3.1.6 Statistische Auswertung

Zur statistischen Auswertung wird zur Normalisierung die relative A20-Gesamt-mRNA-Expression mithilfe des delta-CP-Werts berechnet. Dazu wird als Housekeeping Gen Beta-2-Aktin verwendet. Die statistischen Tests und Grafiken werden mittels GraphPad Prism in den Versionen 8.3.0 bis 9.1.1 erstellt.

### 3.2.3.2 Immunhistochemie: A20-Expression im Transplantatnierengewebe

#### 3.2.3.2.1 Transplantatnierengewebe

Für die Immunhistochemie wurde Gewebe aus 38 Transplantatnierenbiopsien verwendet. Diese wurden in der Abteilung für Nephrologie der I. Medizinischen Klinik der Universitätsmedizin Mainz im Rahmen der diagnostischen und therapeutischen Betreuung von Patienten nach Nierentransplantation durchgeführt. Das in dieser Studie verwendete Gewebe wurde demnach nicht direkt für diese Arbeit entnommen. Konserviert und zu Paraffinschnitten weiterverarbeitet wurde das Material in der Abteilung für Nephropathologie des Universitätsklinikums Erlangen. Die bereits fertig konservierten Paraffinschnitte werden für diese Arbeit weiterverwendet.

#### 3.2.3.2.2 Prinzip der Immunhistochemie (ABC-Methode)

Die Immunhistochemie (IHC) ist eine Methode zur Darstellung spezifischer Antigene innerhalb eines Gewebes mithilfe markierter Antikörper. Man unterscheidet die direkte und die indirekte Methode. Bei der direkten Methode ist der primäre Antikörper direkt an das Amplifikationssystem gebunden. Verglichen mit der indirekten Immunhistochemie sind bei dieser Methode weniger Färbeschritte nötig. Zudem geht sie mit einer geringeren Hintergrundfärbung einher. Allerdings wird stets ein spezifisch markierter primärer Antikörper benötigt.

Bei der indirekten Methode bindet der primäre Antikörper an das Antigen. Der sekundäre Antikörper, ein Anti-Immunglobulin gegen die artspezifische Region des Primärantikörpers, ist an ein Amplifikationssystem gekoppelt. Voraussetzung ist, dass das Antigen sowie der primäre und der sekundäre Antikörper aus verschiedenen Tierspezies stammen. Da der sekundäre Antikörper an alle artspezifischen Regionen des Primärantikörpers bindet, wird bei der indirekten Immunhistochemie kein primärer, direkt an das Amplifikationssystem gekoppelter Antikörper benötigt. Im Vergleich zur direkten Immunhistochemie ist diese Methode sensitiver und vielseitiger, da unterschiedlichste Antikörper aus der Tierspezies des primären Antikörpers mit dem gleichen sekundären Antikörper aus der Tierspezies des sekundären Antikörpers gekoppelt werden können. Zudem wird durch tertiäre Anteile, die an den Sekundärantikörper binden und der Signalverstärkung dienen, eine höhere Sensitivität erreicht, was insbesondere bei geringen Antigenmengen von Vorteil ist.

Bei der Avidin-Biotin-Komplex-Methode (ABC-Methode), einer häufig angewandten Methode der indirekten Immunhistochemie, wird ein biotinylierter sekundärer Antikörper verwendet. Das Glykoprotein Avidin besitzt eine hohe Affinität zu Biotin und kann daher den biotinylierten sekundären Antikörper binden. Wird Avidin mit dem Amplifikator Peroxidase markiert, kann das Substrat Diaminobenzidin (DAB) in ein bräunliches, unlösliches Präzipitat umgesetzt werden. Dadurch lässt sich das Antigen sichtbar machen.

Für immunhistochemische Färbungen eignen sich Paraffinschnitte. Diese Präparate zeichnen sich durch gut erhaltene Strukturen aus. Daher bleiben auch antigene Strukturen erhalten, die vom Primärantikörper erkannt werden. Zur Vermeidung von Zell- und Gewebeüberlagerung sollte die Schnittdicke maximal 4 µm betragen (77, 78).

#### 3.2.3.2.3 Durchführung

Die Paraffinschnitte werden über Nacht bei 42 °C oder 2h bei 56 °C im Wärmeschrank erwärmt. Dann werden die Schnitte in Xylol und in einer absteigenden Alkoholreihe in Glasküvetten entparaffiniert und anschließend bis zum Färben für maximal 2 Tage bei 4 °C in Aqua dest. gelagert.

Xylol III	10 min
Xylol II	10 min
Xylol I	10 min
Ethanol 100 %	10 min
Ethanol 95 %	10 min
Ethanol 70 %	10 min
Aqua dest.	

Zur Rückgewinnung antigener Strukturen werden die entparaffinierten Schnitte für 60 Minuten in einem Behälter mit 0,01 molarem Citratpuffer, der sich im 95°C warmen Wasserbad befindet, inkubiert. Danach werden die Schnitte mit Waschpuffer in der Glasküvette gewaschen. Anschließend lässt man sie für 30 Minuten abkühlen. Das Blocken der endogenen Peroxidase erfolgt in einer Methanollösung, die 3 % H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> enthält, für 30 Minuten bei Raumtemperatur. Dadurch wird beim nachfolgenden enzymatischen Nachweis über peroxidasemarkierte Sekundärantikörper die Hintergrundfärbung durch endogene Peroxidase reduziert. Dann werden die Schnitte 5 Minuten lang gewaschen. Im nächsten Schritt werden Avidin und Biotin 1:2 mit Waschpuffer verdünnt. Anschließend werden zunächst 50 - 100 µl Avidin auf die Schnitte pipettiert und diese 20 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Nach einem Waschvorgang von 5 Minuten werden 50 - 100 µl Biotin auf die Schnitte pipettiert, gefolgt von einer Inkubation bei Raumtemperatur über 20 Minuten. Nach einem weiteren Waschvorgang von 5 Minuten werden die Schnitte mit Blocking-Lösung (5 % Rabbit Serum (Normal), 10 % BSA in 1 x PBS) für 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Dies dient der Blockade unspezifischer Bindungsstellen und der Reduktion der Hintergrundfärbung. Schließlich wird der Primärantikörper anti-human-A20 im Verhältnis 1:50 mit 0,1 % BSA in 1 x PBS aufgetragen und über Nacht bei 4 °C inkubiert. Am nächsten Tag werden die Schnitte für 5 Minuten gewaschen. Dann werden die Objektträger mit dem Sekundärantikörper Biotinylated rabbit anti-goat im Verhältnis 1:200 für 1h bei Raumtemperatur inkubiert. Während der Inkubationszeit und

30 Minuten vor Verwendung wird die ABC-Komplexlösung angesetzt (10 µl Avidin, 10 µl Biotin in 1000 µl PBS). Nach einem Waschvorgang von 5 Minuten werden die Objektträger mit der ABC-Komplexlösung für 1h bei Raumtemperatur inkubiert. Dann erfolgt ein weiterer Waschgang von 5 Minuten. Unter mikroskopischer Beobachtung wird dann durch Zugabe von DAB-Lösung (2 Tropfen DAB, 1 Tropfen H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, 1 Tropfen Puffer in 2500 µl destilliertem Wasser) die Immunreaktion sichtbar gemacht. Sobald eine ausreichende Färbung der Zellen beobachtet werden kann, wird die Reaktion durch Zugabe von Leitungswasser gestoppt. Dann werden die Schnitte in Hämalaun für 15 - 60 Sekunden gegengefärbt. Zuletzt werden die Schnitte in einer Entwässerungsreihe dehydriert. Dazu werden sie jeweils 10 Minuten nachfolgend in 70 % Ethanol, 90 % Ethanol und 100 % Ethanol sowie 3 x 10 Minuten in Xylol gestellt. Um die Gewebeschnitte aufzubewahren werden sie mit Permount Eindeckmedium und Deckgläsern fixiert.

## 4 Ergebnisse

### 4.1 Register: Klinischer Verlauf vor und nach Nierentransplantation

Das Patientenkollektiv umfasst insgesamt 48 Patienten, die in den Jahren 2014 bis 2017 an der Universitätsmedizin Mainz nierentransplantiert und für diese Studie rekrutiert wurden. Die Auswertung beschränkt sich auf den Zeitraum des ersten Jahres nach Transplantation. Das gesunde Kontrollkollektiv umfasst 16 Patienten. Aufgrund der geringen Fallzahl erfolgt die statistische Auswertung der Daten rein deskriptiv. Nachfolgende Tabelle fasst die Charakteristika der Kollektive zusammen.

Charakteristikum	Patientenkollektiv n=48	Kontrollkollektiv n=16
<b>Alter (in Jahren)</b>		
Mittelwert	51,73	52,63
25% Perzentile	42,50	39,25
Median	56,50	56,00
75% Perzentile	61,75	64,75
Alter ≥ 65, abs. (%)	10 (20,8)	4 (25)
Weiblich, abs. (%)	17 (35,4)	8 (50)
Männlich, abs. (%)	31 (64,6)	8 (50)
Leichennierentransplantationen, abs. (%)	39 (81,2)	
Lebendnierenspenden, abs. (%)	9 (18,8)	
<b>Nephrologische Grunderkrankung, abs. (%)</b>		
Glomeruläre Krankheiten	17 (35,4)	
Zystische Nierenkrankheit	9 (18,8)	
<b>Vorerkrankungen, abs. (%)</b>		
Arterielle Hypertonie	37 (77,1)	
Diabetes mellitus	8 (16,7)	
<b>Ischämiezeiten (Mittelwert in Minuten)</b>		
Kalte Ischämiezeit	756,6	
Warme Ischämiezeit	39,4	
Nierenbiopsien, abs. (%)	11 (22,9)	
<b>Abstoßungsreaktionen, abs. (%)</b>		
Zellulär	6 (12,5)	
Humoral	1 (2,1)	
<b>Andere Komplikationen, abs. (%)</b>		
<b>Polyoma</b>		
Virämie	11 (22,9)	
Polyomanephropathie	3 (6,3)	
<b>CMV</b>		
Virämie	13 (27,1)	
CMV-Erkrankung	3 (6,3)	
<b>Postoperatives Hämatom</b>	6 (12,5)	
Konservative Therapie	5 (10,4)	
Operative Therapie	1 (2,1)	
<b>Lymphozele</b>	3 (6,3)	
Konservative Therapie	2 (4,2)	
Operative Therapie	1 (2,1)	
Verstorbene	0 (0)	

Tabelle 4: Charakteristika der Kollektive

Bei den angegebenen Werten handelt es sich um Mittelwert +/- Standardabweichung. Die prozentualen Werte addieren sich aufgrund von Rundung ggf. nicht zu 100.

#### 4.1.1 Alters- und Geschlechterverteilung der Kollektive

Das Patientenkollektiv setzt sich aus 31 Männern (64,6 %) und 17 Frauen (35,4 %) zusammen. Das Patientenalter lag zwischen 18 und 74 Jahren. Ein Anteil von 50 % der Patienten war zum Zeitpunkt der Transplantation zwischen 42 und 61 Jahre alt. Insgesamt scheint die Altersverteilung in der Gruppe der Frauen ungefähr einer Normalverteilung zu entsprechen, wohingegen sich in der Gruppe der Männer zusätzlich jeweils ein weiterer Peak im Bereich der überdurchschnittlich alten beziehungsweise jungen Patienten abzeichnet.

Im gesunden Kontrollkollektiv ist die Geschlechterverteilung mit acht weiblichen und acht männlichen Probanden identisch. Mittelwert und Median sind bei Patienten und Gesunden vergleichbar.

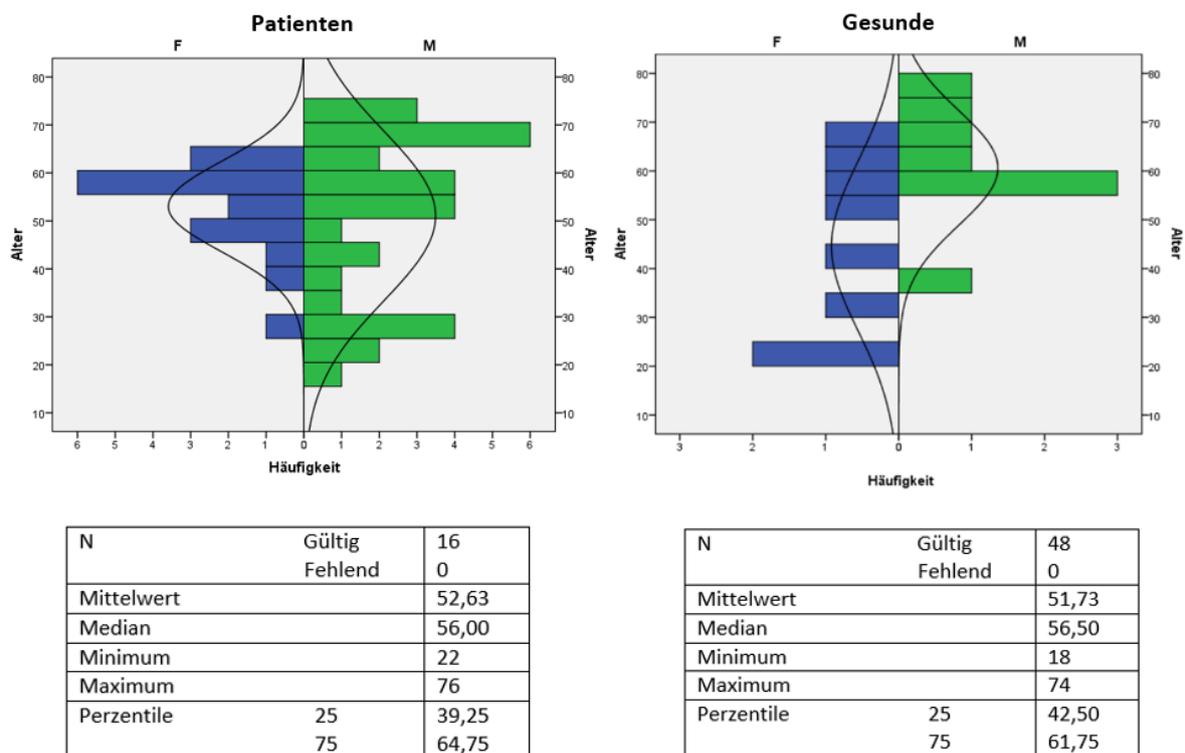


Abbildung 10: Alters- und Geschlechterverteilung der Kollektive

#### 4.1.2 Verhältnis von Leichennierentransplantationen zu Lebendnierenspenden

Das Patientenkollektiv besteht aus 39 Leichennierentransplantationen und 9 Lebendnierenspenden, von denen 5 ABO-inkompatibel durchgeführt wurden. Drei Patienten erhielten ihr zweites Nierentransplantat.

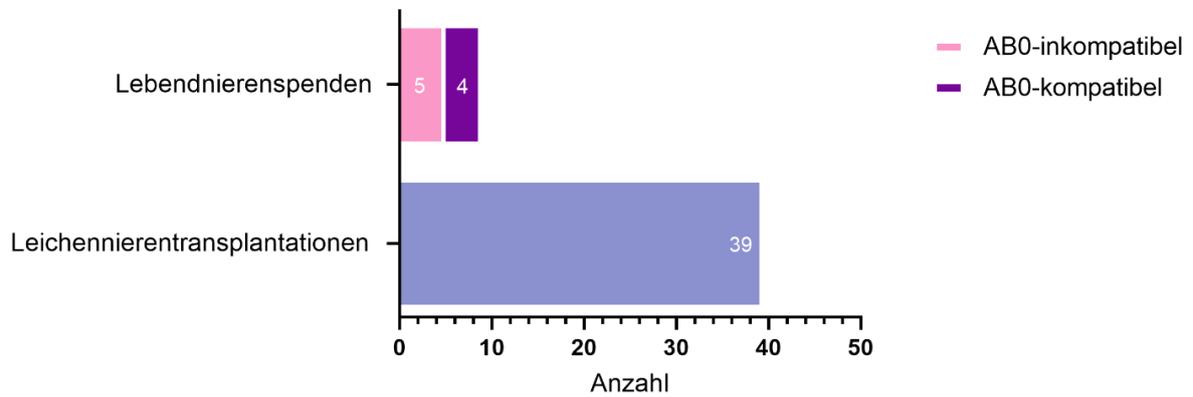


Abbildung 11: Anteil von Leichennierentransplantationen und Lebendnierenspenden

#### 4.1.3 Nephrologische Grunderkrankungen

Die Auswertung der Daten zur nephrologischen Grunderkrankung beziehungsweise der Ursache des Nierenversagens ist nachfolgend dargestellt. Mit 35,42 % der Patienten (n = 17) waren glomeruläre Erkrankungen die häufigste Ursache der terminalen Niereninsuffizienz. In 18,75 % (n = 9) waren zystische Nierenerkrankungen ursächlich. Vaskulitiden, eine diabetische Nephropathie, chronisches Transplantatversagen bzw. ein Alport-Syndrom lagen bei jeweils 6,25 % (n = 3) vor. Ein Anteil von 20,83 % (n = 10) wies andere Ursachen des Nierenversagens auf (Refluxnephropathie, Schrumpfnieren unklarer Genese, retroperitoneale Fibrose, toxisches Nierenversagen, Nephrosklerose, Nierenhypoplasie, Nierenbecken-Karzinom).

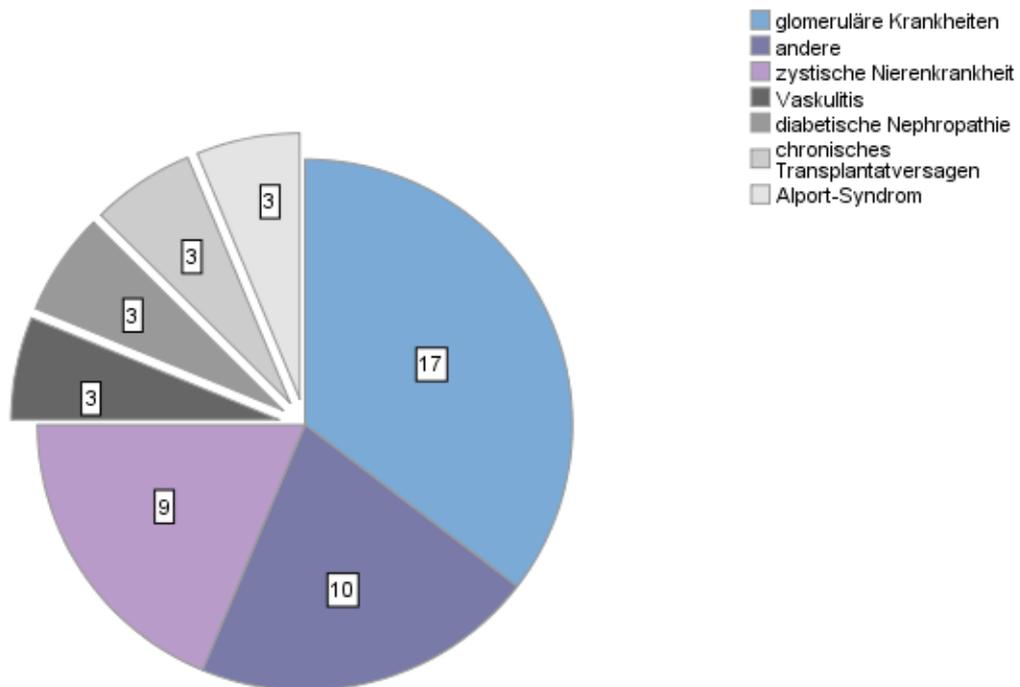


Abbildung 12: Nephrologische Grunderkrankungen  
Bei den angegebenen Werten handelt es sich um die absoluten Häufigkeiten der jeweiligen Erkrankung.

#### 4.1.4 Kardiovaskuläre Risikofaktoren

Bei der Auswertung wurden Vorerkrankungen der Patienten berücksichtigt, die das kardiovaskuläre Risiko erhöhen. Am häufigsten lag bei 77 % der Patienten eine arterielle Hypertonie vor. Einen Diabetes mellitus wiesen 16 % der Patienten auf. Die Prävalenzen weiterer kardiovaskulärer Risikofaktoren wie KHK mit 2 % und pAVK mit 6 % waren deutlich niedriger.

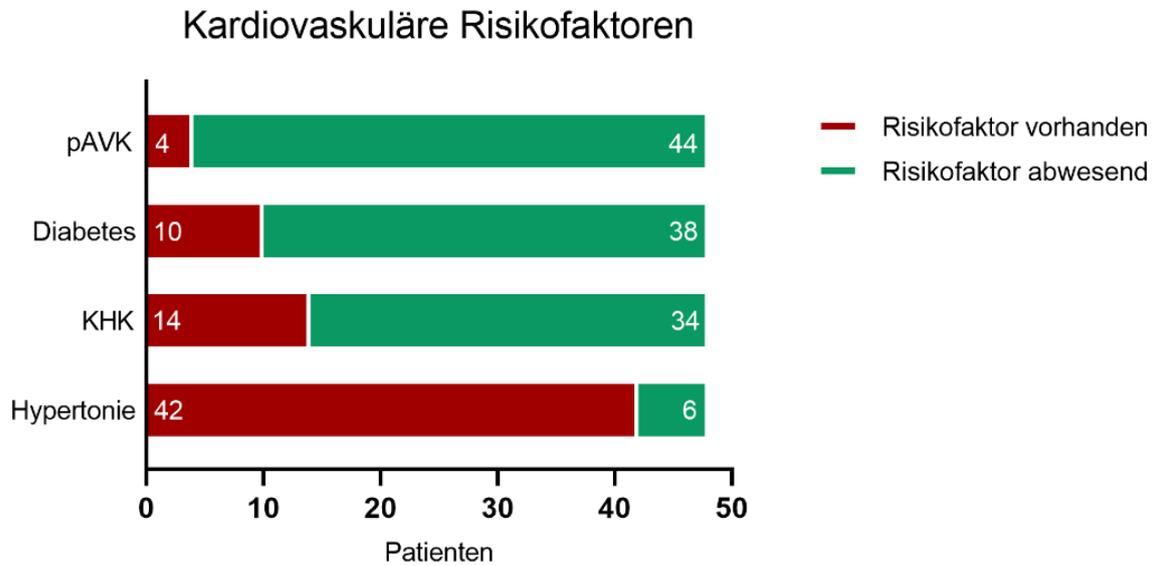


Abbildung 13: Kardiovaskuläre Risikofaktoren

#### 4.1.5 Ischämiezeiten

Die Verteilung der kalten Ischämiezeit innerhalb der Gruppe der Patienten mit Leichennierentransplantation sowie die warme Ischämiezeit im Gesamtkollektiv der Transplantierten sind nachfolgend aufgeführt.

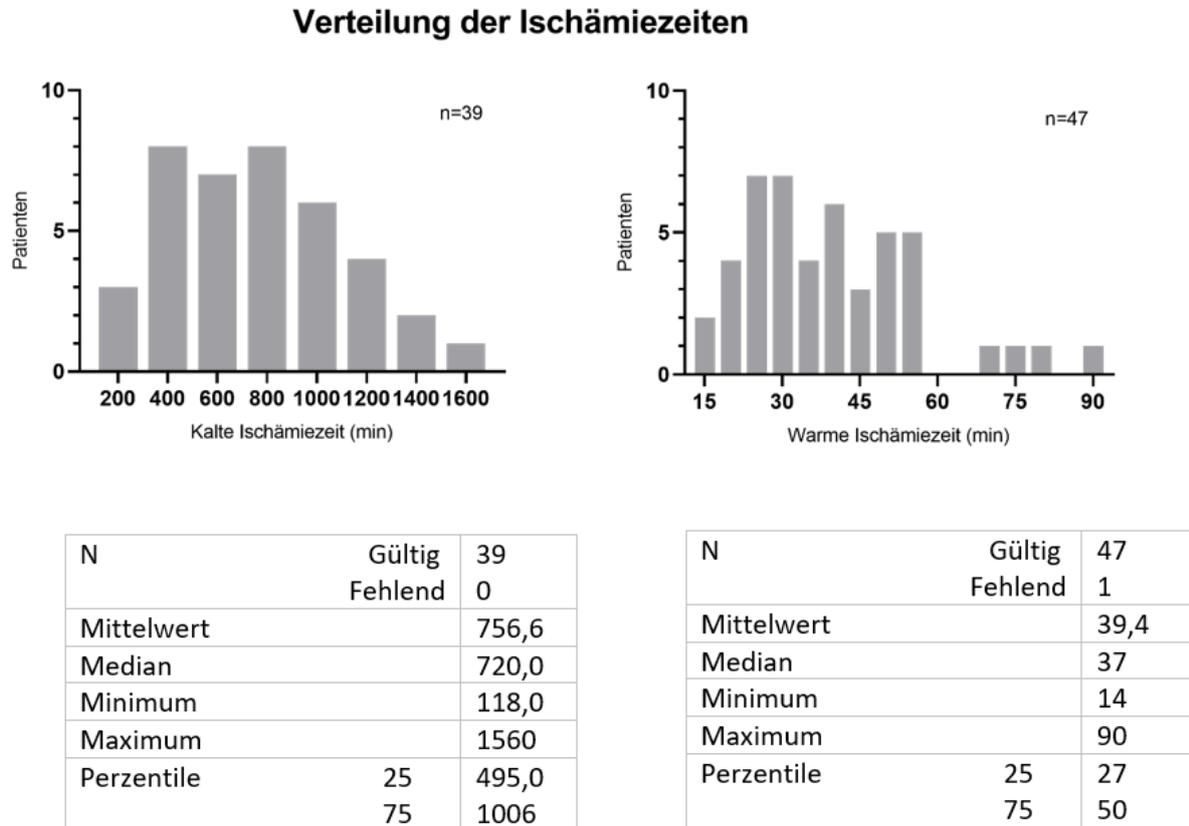


Abbildung 14: Verteilung der Ischämiezeiten

#### 4.1.6 Kreatinin, CRP und Leukozytenzahl

Nachfolgend werden CRP, Kreatinin und Leukozytenzahl unmittelbar vor Nierentransplantation (1. Probe), innerhalb Tag 4 bis 7 nach Nierentransplantation (2. Probe) und 2 bis 6 Monate nach Nierentransplantation (3. Probe) dargestellt. Die Unterschiede zwischen den Gruppen wurden mittels des nichtparametrischen Kruskal-Wallis-Tests auf statistische Signifikanz untersucht.

Der CRP-Verlauf zeigte einen signifikanten Anstieg des CRP-Werts unmittelbar nach Nierentransplantation, der zum Zeitpunkt 3 wieder signifikant rückläufig war.

Der Kreatininwert wies unmittelbar vor Nierentransplantation eine große Streuung auf und fiel nach Nierentransplantation signifikant ab.

Die Leukozytenzahl wies vor und im Verlauf nach Nierentransplantation keine signifikanten Unterschiede auf.

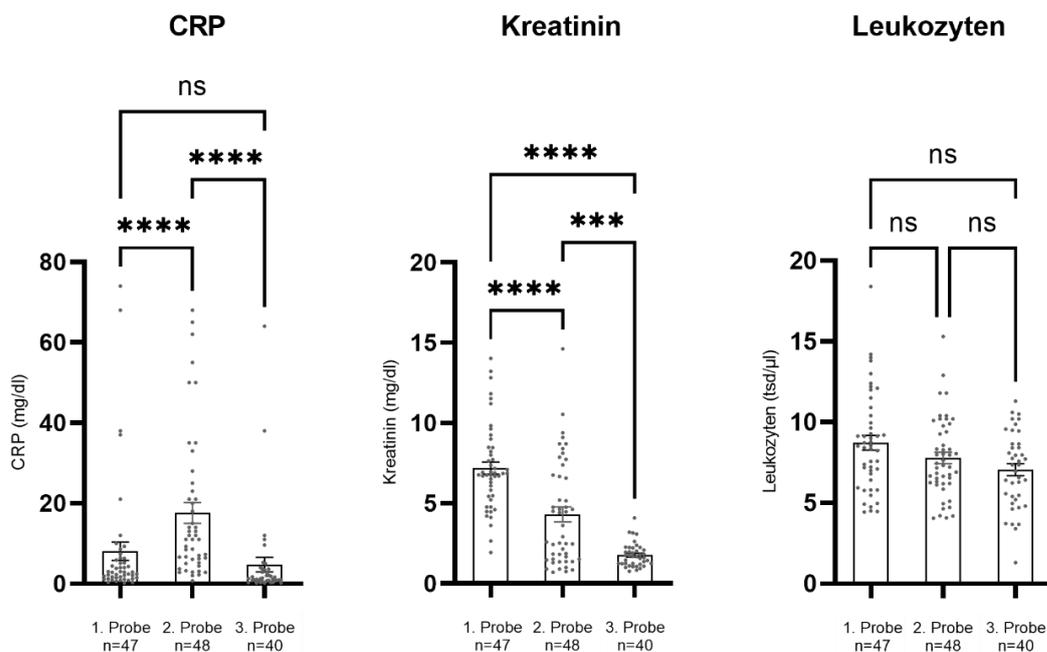


Abbildung 15: Verlauf von CRP, Kreatinin und Leukozytenzahl vor und nach NTX  
Aufgrund fehlender Werte variiert die Stichprobengröße in den einzelnen Gruppen.

#### 4.1.7 Komplikationen nach NTX

##### Nierenbiopsien

Der klinische Verlauf von 11 Patienten machte innerhalb des ersten Jahres nach Nierentransplantation eine Nierenbiopsie erforderlich. Drei dieser Patienten wurden zweimalig biopsiert. Sieben Patienten hatten eine Leichenniere erhalten, vier eine Lebendnierenspende. Damit war der Anteil der Biopsien in der Gruppe der Lebendnierenspenden mit 44,4 % größer als in der Gruppe der Leichennierentransplantationen (17,9 %). Von den vier Biopsien in der Gruppe der Lebendnierenspenden wurden drei bei ABO-inkompatibel Transplantierten und eine bei ABO-kompatibler Transplantation durchgeführt.

##### Abstoßungsreaktionen

Zelluläre Abstoßungsreaktionen ließen sich in der ersten Nierenbiopsie bei 6 Patienten nachweisen. Ein Patient dieser Gruppe zeigte gleichzeitig eine humorale Abstoßung.

Eine zweite Biopsie (n = 3) erhielten Patienten, deren erste Biopsie bereits eine zelluläre Rejektion gezeigt hatte. Bei zwei Patienten war weiterhin eine zelluläre Abstoßungsreaktion nachweisbar, bei einem Patienten war keine erkennbar.

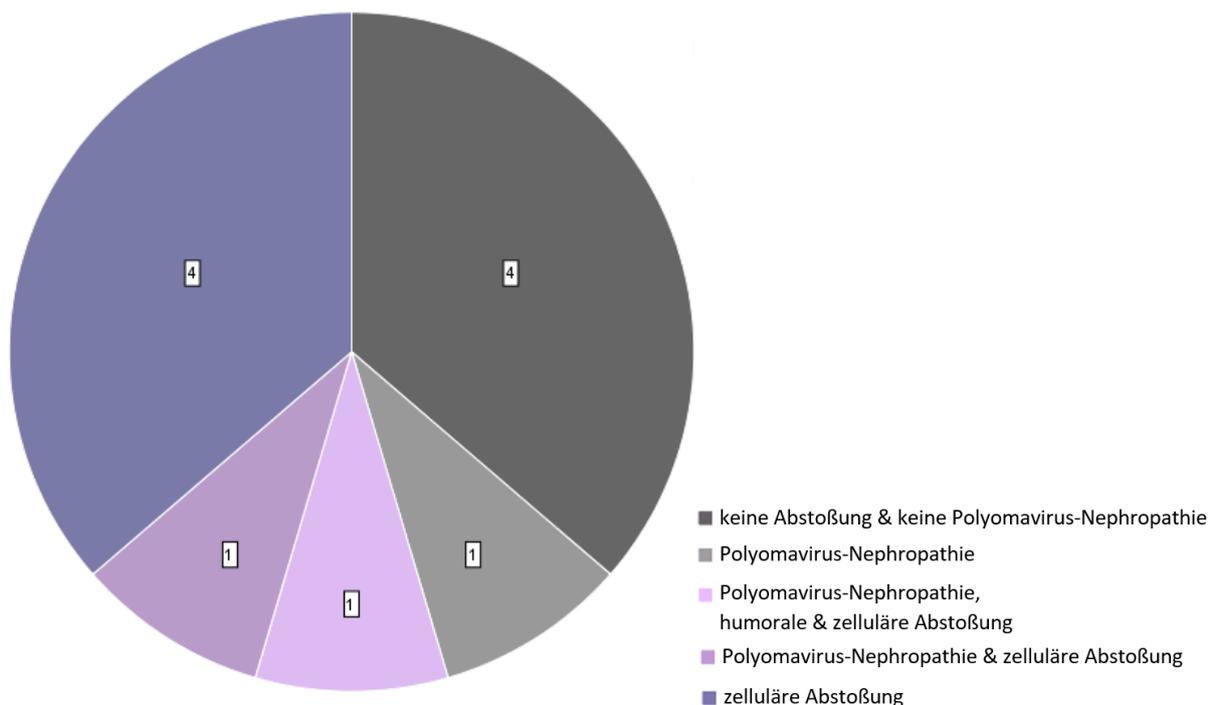


Abbildung 16: Histologie der ersten Nierenbiopsie nach Nierentransplantation  
Bei den angegebenen Werten handelt es sich um die absoluten Häufigkeiten der jeweiligen Histologie

## Abstoßungsreaktionen und Matchbefund

Nachfolgend wird die Anzahl der Mismatches bei Patienten mit und ohne Abstoßungsreaktion im Verlauf des ersten Jahres nach Nierentransplantation dargestellt. Insgesamt besteht ein Trend zu mehr Mismatches bei Patienten, die eine Abstoßungsreaktion entwickelten (Mittelwert 3,833) im Vergleich zu Patienten, die keine Abstoßungsreaktion entwickelten (Mittelwert 3,143). Im Mann-Whitney-U-Test erreichen die Unterschiede dennoch keine statistische Signifikanz ( $p = 0,3371$ ).

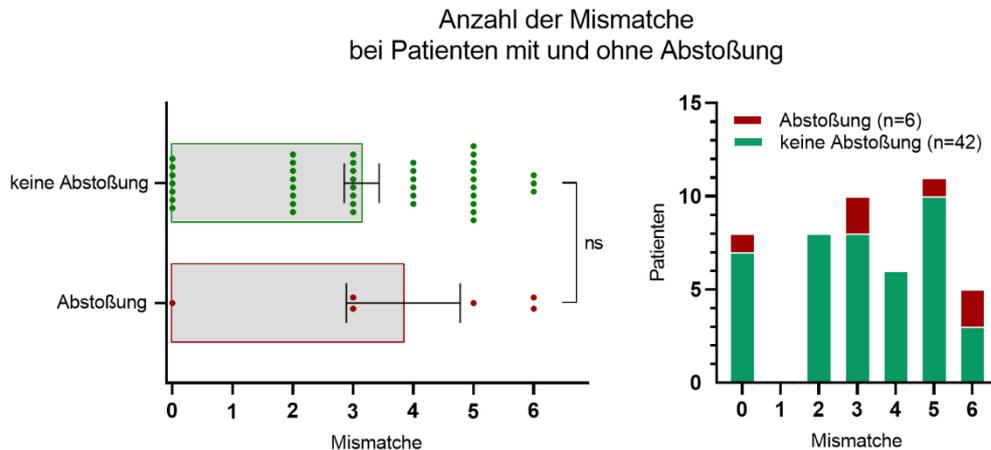


Abbildung 17: Anzahl der Mismatche bei Patienten mit und ohne Abstoßungsreaktion innerhalb des ersten Jahres nach Nierentransplantation

## Infektionen

Innerhalb des ersten Jahres nach Nierentransplantation entwickelten 13 Patienten eine CMV-Virämie. Im Verlauf kam es bei drei dieser Patienten zu einer manifesten CMV-Erkrankung. Ein Patient entwickelte isolierte gastrointestinale Symptome, einer eine Pneumonie und der dritte Patient wies sowohl gastrointestinale Symptome als auch eine Pneumonie, eine Leukopenie sowie eine Funktionsverschlechterung des Nierentransplantats auf.

Eine BK-Virämie war bei 11 Patienten innerhalb des ersten Jahres nach Nierentransplantation nachweisbar. Eine histologisch gesicherte BK-Nephropathie entwickelten drei dieser Patienten.

### Vaskuläre Komplikationen

Vaskuläre Komplikationen im Sinne eines postoperativen Hämatoms zeigten sich bei insgesamt 6 Patienten. Bei 5 Patienten war ein konservatives Procedere ausreichend, ein Patient wurde operativ saniert.

### Urologische Komplikationen

Eine Lymphozele wurde bei drei Patienten festgestellt. Eine konservative Therapie war bei zwei dieser Patienten ausreichend, eine operative Sanierung war bei einem Patienten notwendig. Harnleiterstenosen, Urinome, einen Reflux oder einen Harnstau entwickelte keiner der Patienten.

### Anteil Verstorbenen

Innerhalb des ersten Jahres nach Nierentransplantation ist keiner der 48 Patienten verstorben.

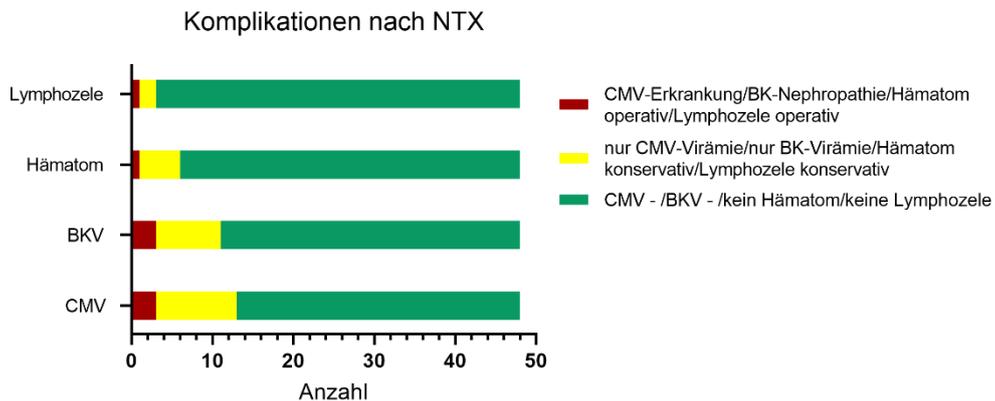


Abbildung 18: Komplikationen nach Nierentransplantation

## 4.2 FACS-Analyse: A20-Proteinexpression in PBMCs vor und im Verlauf nach NTX

### 4.2.1 Nachweis von A20 in zirkulierenden CD4+, CD3+, CD19+ und CD11b+ Zellen

Mittels FACS-Analyse konnte das Protein A20 in CD4+, CD3+, CD19+ und CD11b+ Zellen aus PBMCs erfolgreich nachgewiesen werden. Es wurden die prozentualen Anteile der A20-positiven Zellen in den jeweiligen Zellreihen ermittelt. Nachfolgend sind exemplarisch die FACS-Färbungen der CD4+ Zellen als Dotplots mit und ohne A20-Antikörper dargestellt.

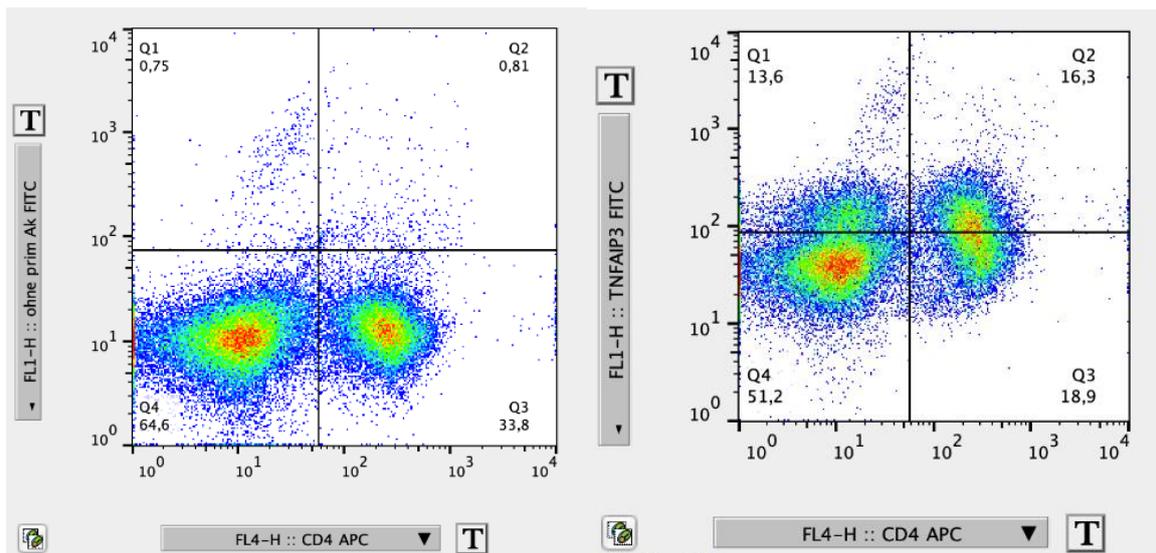


Abbildung 19: FACS-Färbung der CD4+ Zellen ohne (Isotypenkontrolle links) und mit (rechts) A20-Antikörper

#### 4.2.2 Anteil A20-positiver Zellen bei Gesunden, Dialysepatienten und Transplantierten

In der FACS-Analyse wurden die prozentualen Anteile der A20-positiven Zellen in den Populationen der CD3+, CD4+, CD19+ und CD11b+ Zellen in PBMCs bei Gesunden, Dialysepatienten und Transplantierten bestimmt. Die Probenanzahl n in den jeweiligen Gruppen variiert, da einzelne Proben aufgrund eines zu geringen Zellpellets oder eines fehlerbehafteten Färbeprozesses von der Auswertung ausgeschlossen wurden. Die Unterschiede zwischen den Gruppen wurden mittels des nichtparametrischen Kruskal-Wallis-Tests auf statistische Signifikanz untersucht. Das Signifikanzniveau wurde auf  $p < 0,05$  festgesetzt.

##### **Signifikant vermehrte A20-Expression bei Dialysepatienten im Vergleich zu Gesunden**

In allen 4 Zellreihen ergab sich bei Dialysepatienten eine deutlich vermehrte A20-Expression in CD4+, CD3+, CD19+ und CD11b+ Zellen im Vergleich zu Gesunden. Die statistische Testung erreichte für jede Zellreihe ein  $p < 0,0001$ . Damit exprimieren Dialysepatienten hochsignifikant mehr A20 in PBMCs als Gesunde.

##### **Signifikant vermehrte A20-Expression bei Transplantierten im Vergleich zu Gesunden**

In allen 4 Zellreihen ergab sich bei Transplantierten eine deutlich vermehrte A20-Expression in CD4+, CD3+, CD19+ und CD11b+ Zellen im Vergleich zu Gesunden. Die statistische Testung erreichte für jede Zellreihe ein  $p < 0,0001$ . Damit exprimieren Transplantierte hochsignifikant mehr A20 in PBMCs als Gesunde.

##### **Kein signifikanter Unterschied in der A20-Expression zwischen Dialysepatienten und Transplantierten**

In allen 4 Zellreihen ergab der Vergleich der A20-Expression in PBMCs von Dialysepatienten und Transplantierten in CD4+, CD3+, CD19+ und CD11b+ Zellen bei einem p-Wert von jeweils  $p > 0,9999$  keine signifikanten Unterschiede.

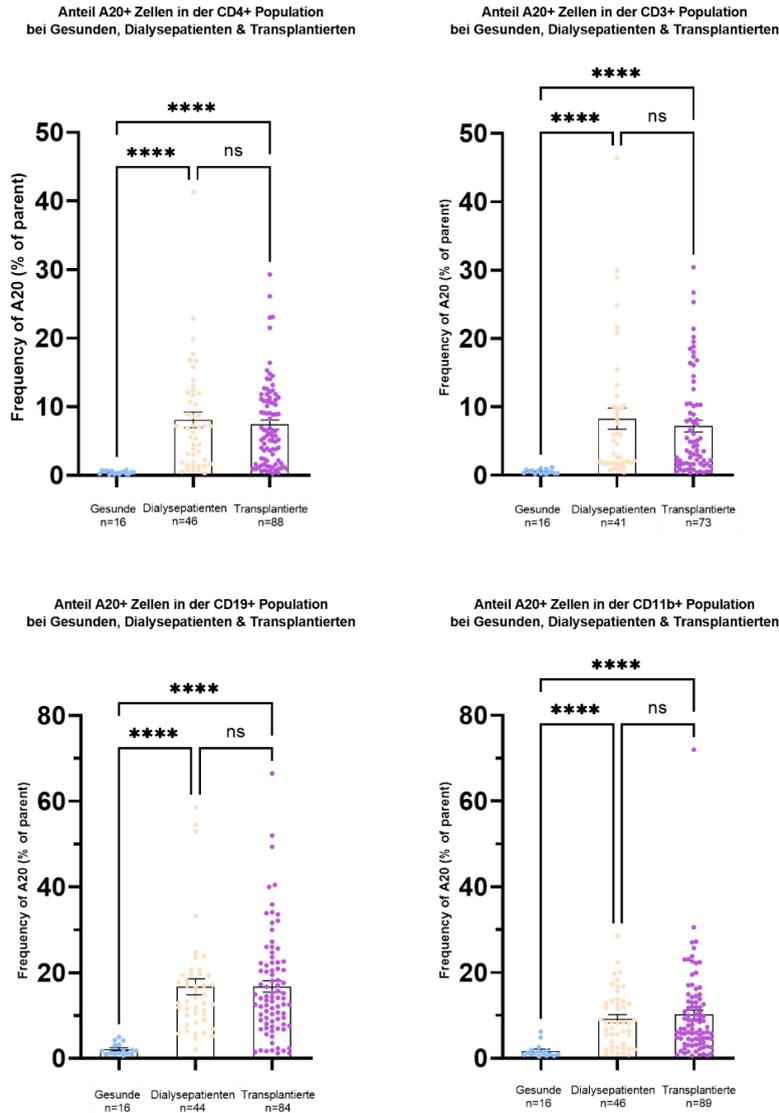


Abbildung 20: Anteil A20-positiver Zellen bei Gesunden, Dialysepatienten und Transplantierten in CD4+, CD3+, CD19+ und CD11b+ PBMCs (n = Probenanzahl). Signifikant (jeweils  $p < 0,0001$ ) vermehrter Anteil A20-positiver Zellen bei Dialysepatienten im Vergleich zu Gesunden sowie Transplantierten. Kein signifikanter Unterschied zwischen Dialysepatienten und Transplantierten ( $p > 0,9999$ ).

#### 4.2.3 Anteil A20-positiver Zellen bei Transplantierten mit und ohne Abstoßungsreaktion

Zusätzlich wurde das Patientenkollektiv bezüglich der Entwicklung von Abstoßungsreaktionen innerhalb des ersten Jahres nach Transplantation unterteilt. In die Gruppe der Patienten ohne Abstoßungsreaktion gehen die Proben 1 bis 3 aller Patienten ein, die transplantiert wurden und innerhalb des ersten Jahres nach Transplantation keine Abstoßungsreaktion entwickelten. In der Gruppe der Patienten mit Abstoßungsreaktion werden die Proben 1 bis 3 aller Patienten erfasst, die transplantiert wurden und innerhalb des ersten Jahres nach Transplantation eine bioptisch gesicherte Abstoßungsreaktion entwickelten. Nachfolgend wird die FACS-Analyse mit den prozentualen Anteilen der A20-positiven Zellen in den Populationen der CD3+, CD4+, CD19+ und CD11b+ Zellen dargestellt. Die Probenanzahl  $n$  in den jeweiligen Gruppen variiert, da einzelne Proben aufgrund eines zu geringen Zellpellets oder eines fehlerbehafteten Färbeprozesses von der Auswertung ausgeschlossen wurden. Die Unterschiede zwischen den Gruppen wurden mittels des nichtparametrischen Mann-Whitney-U-Tests auf statistische Signifikanz untersucht. Das Signifikanzniveau wurde auf  $p < 0,05$  festgesetzt.

Es zeigte sich eine signifikant vermehrte A20-Expression in CD4+ Zellen bei Patienten, die innerhalb des ersten Jahres nach Transplantation eine Abstoßungsreaktion entwickelten im Vergleich zu Patienten ohne Abstoßungsreaktion ( $p = 0,0240$ ).

Außerdem bestand ein Trend zu einer vermehrten A20-Expression in CD3+ Zellen bei Patienten, die innerhalb des ersten Jahres nach Transplantation eine Abstoßungsreaktion entwickelten im Vergleich zu Patienten ohne Abstoßungsreaktion ( $p = 0,0804$ ).

Es fand sich kein signifikanter Unterschied der A20-Expression in CD19+ ( $p = 0,3371$ ) und CD11b+ Zellen ( $p = 0,3025$ ) bei Patienten, die innerhalb des ersten Jahres nach Transplantation eine Abstoßungsreaktion entwickelten im Vergleich zu Patienten ohne Abstoßungsreaktion.

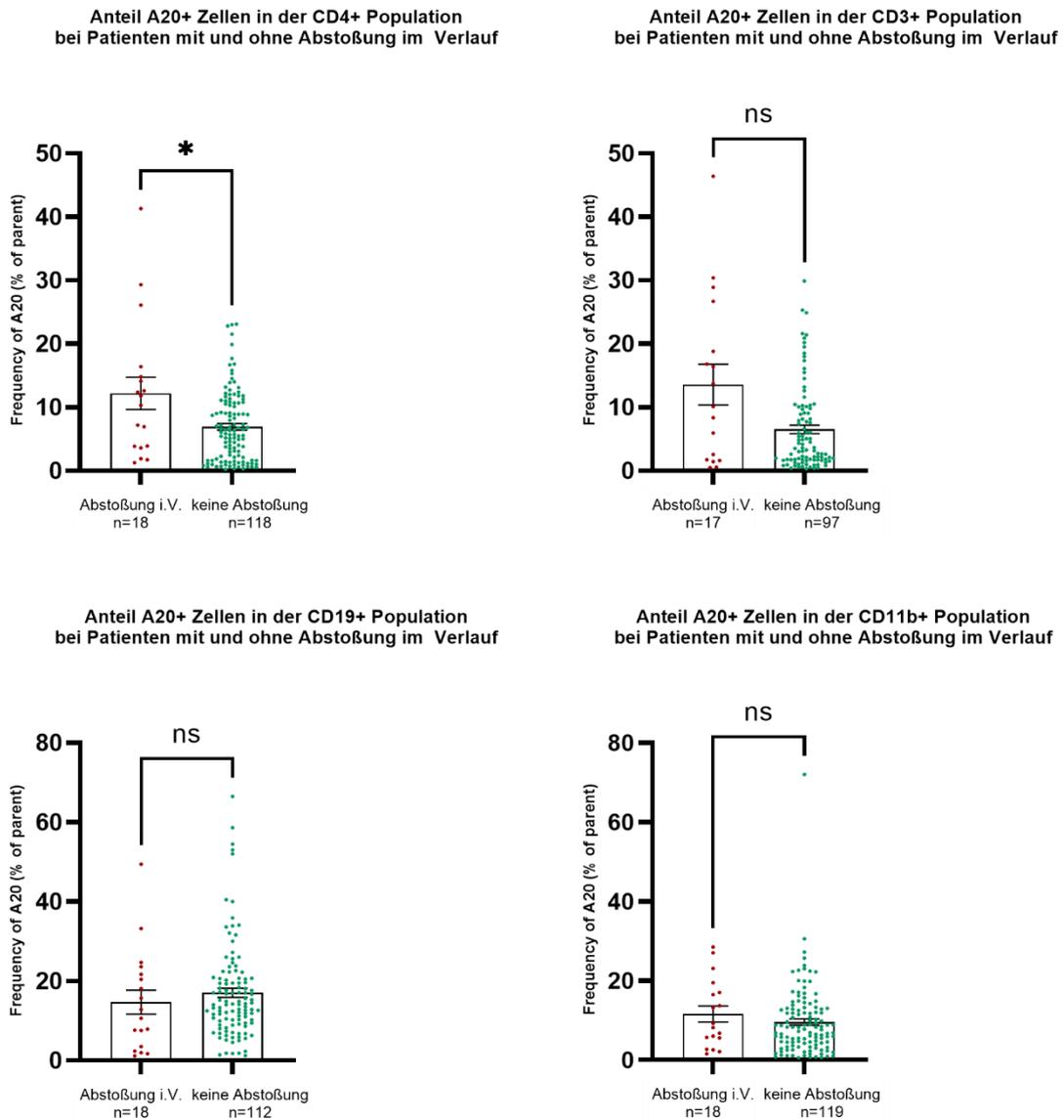


Abbildung 21: Anteil A20-positiver Zellen bei Patienten mit und ohne Abstoßungsreaktion im Verlauf des ersten Jahres nach Nierentransplantation (n = Probenanzahl). Signifikant vermehrte A20-Expression in CD4+ Zellen ( $p = 0,0240$ ) und Trend zu vermehrter A20-Expression in CD3+ Zellen ( $p = 0,0804$ ) bei Patienten mit Abstoßungsreaktion.

#### 4.2.4 Anteil A20-positiver Zellen – Nephrologische Grunderkrankungen im Vergleich

Im Rahmen dieser Studie wurden die nephrologischen Grunderkrankungen der Patienten erfasst und die jeweiligen Anteile bereits in Abschnitt 4.1.3 dargestellt. Nachfolgend wird die prozentuale A20-Expression in den Populationen der CD3+, CD4+, CD19+ und CD11b+ Zellen in Bezug zur nephrologischen Grunderkrankung dargestellt. In die Subgruppen gehen jeweils die Proben 1 bis 3 ein. Die Unterschiede zwischen den Gruppen wurden mittels des nichtparametrischen Kruskal-Wallis-Tests auf statistische Signifikanz untersucht. Das Signifikanzniveau wurde auf  $p < 0,05$  festgesetzt. Insgesamt zeigten Patienten mit verschiedenen nephrologischen Grunderkrankungen unterschiedliche Expressionsmuster in den diversen Zellpopulationen. Der Anteil A20+ Zellen war bei Patienten mit diabetischer Nephropathie in allen 4 Zellreihen im Vergleich zur Subgruppe mit der höchsten A20-Expression signifikant vermindert.

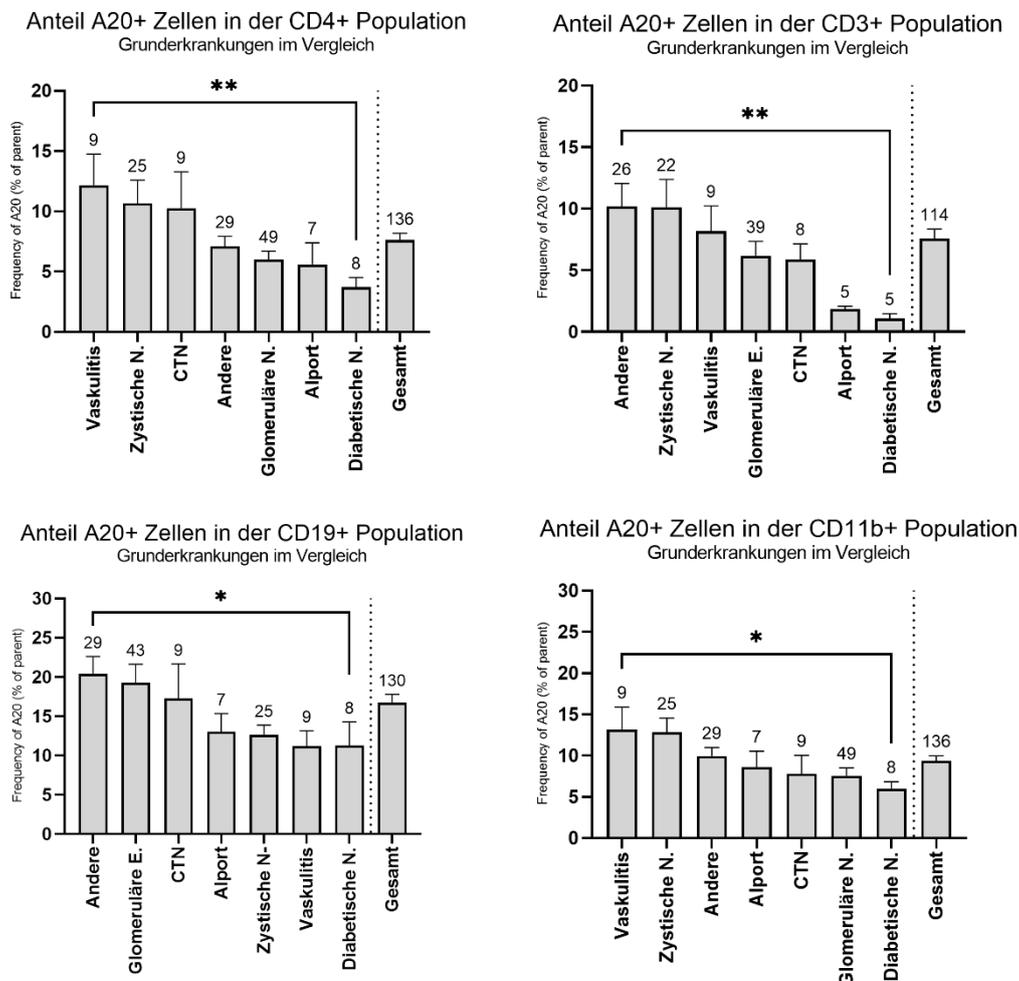


Abbildung 22: Anteil A20-positiver Zellen – Nephrologische Grunderkrankungen im Vergleich  
Signifikant verminderte A20-Expression bei Patienten mit diabetischer Nephropathie in CD4+ Zellen ( $p = 0,0083$ ), CD3+ Zellen ( $p = 0,0038$ ), CD19+ Zellen ( $p = 0,00343$ ) und CD11b+ Zellen ( $p = 0,0412$ ).

#### 4.2.5 Korrelation des Anteils A20-positiver Zellen mit klinischen Parametern

Untersucht wurde zudem der Zusammenhang zwischen verschiedenen klinischen Parametern und der prozentualen A20-Positivität in zirkulierenden CD4+, CD3+, CD19+ und CD11b+ Zellen. Als statistisches Mittel wurde der nichtparametrische Korrelationskoeffizient nach Spearman berechnet. Sofern nicht anders angegeben werden die einzelnen Parameter im Verhältnis zur A20-Positivität unabhängig des Abnahmezeitpunktes dargestellt. Das Signifikanzniveau wurde jeweils auf  $p < 0,05$  festgesetzt. Das Patientenalter korreliert bei einem  $p = 0,0231$  und einem Spearman  $r = 0,2127$  schwach positiv mit der A20-Positivität in CD3+ Zellen.

Zwischen der warmen Ischämiezeit und der A20-Positivität in CD4+ Zellen ergab sich bei einem  $p = 0,0481$  und einem Spearman  $r = 0,1717$  eine sehr schwache positive Korrelation. Bezüglich des Hämoglobinwerts zeigte sich bei einem  $p = 0,0285$  und einem Spearman  $r = -0,1945$  eine schwach negative Korrelation in Bezug auf die A20-Expression in CD19+ Zellen. Die Thrombozytenzahl erreichte bei einem  $p = 0,0199$  und einem Spearman  $r = 0,2018$  hingegen eine schwach positive Korrelation in Bezug auf die A20-Positivität in CD4+ Zellen. Der innerhalb der ersten 4 - 7 Tage nach Nierentransplantation erfasste Kreatininwert zeigte bei einem  $p = 0,0499$  und einem Spearman  $r = 0,3289$  eine schwach positive Korrelation bezüglich der A20-Expression in CD3+ Zellen. Signifikante Zusammenhänge zwischen der Dialysedauer, dem Matchbefund sowie dem CRP-Wert und der A20-Positivität in den jeweiligen Zellreihen fanden sich in der Korrelationsanalyse nicht.

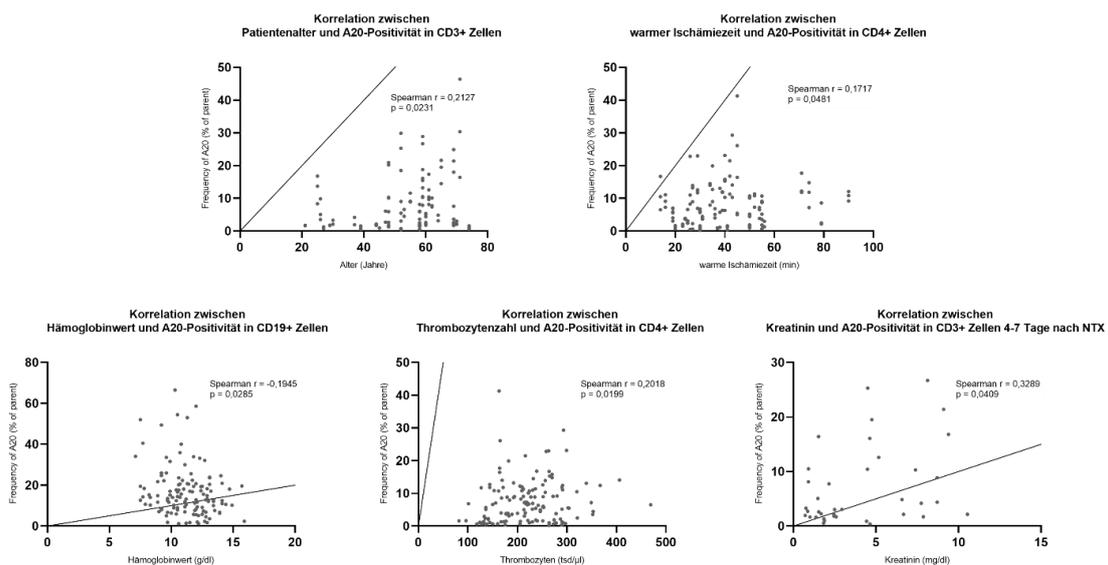


Abbildung 23: Korrelation der A20-Expression mit klinischen Transplantationsparametern

#### 4.2.6 Zytokine in CD4+ Zellen bei Gesunden, Dialysepatienten und Transplantierten

In der FACS-Analyse wurden die prozentualen Anteile IL-4+, FoxP3+, IL-17+, IL-10+ und IFN $\gamma$ + Zellen in der Population der CD4+ Zellen in PBMCs bei Gesunden, Dialysepatienten und Transplantierten bestimmt. Die Probenanzahl  $n$  in den jeweiligen Gruppen variiert, da einzelne Proben aufgrund eines zu geringen Zellpellets oder eines fehlerbehafteten Färbeprozesses von der Auswertung ausgeschlossen wurden. Die Unterschiede zwischen den Gruppen wurden mittels des nichtparametrischen Kruskal-Wallis-Tests auf statistische Signifikanz untersucht. Das Signifikanzniveau wurde auf  $p < 0,05$  festgesetzt.

Es ergab sich eine signifikant vermehrte IL-4-Expression in CD4+ Zellen bei Dialysepatienten ( $p = 0,0132$ ) und Transplantierten ( $p = 0,0125$ ) im Vergleich zu Gesunden. Der Unterschied zwischen Dialysepatienten und Transplantierten erreichte in der statistischen Testung keine Signifikanz ( $p > 0,9999$ ).

Dialysepatienten exprimierten zudem signifikant mehr FoxP3 in CD4+ Zellen als Gesunde ( $p = 0,0316$ ). Die Unterschiede zwischen Dialysepatienten und Transplantierten ( $p > 0,9999$ ) sowie Gesunden und Transplantierten ( $p = 0,1876$ ) erreichten in der statistischen Testung keine Signifikanz.

Dialysepatienten und Transplantierte exprimierten in CD4+ Zellen signifikant mehr IL-17 als Gesunde (jeweils  $p < 0,0001$ ). Die Unterschiede zwischen Dialysepatienten und Transplantierten erreichten in der statistischen Testung keine Signifikanz ( $p > 0,9999$ ).

Dialysepatienten ( $p = 0,0392$ ) und Transplantierte ( $p = 0,0030$ ) exprimierten signifikant mehr IL-10 in CD4+ Zellen als Gesunde. Die Unterschiede zwischen Dialysepatienten und Transplantierten erreichten in der statistischen Testung keine Signifikanz ( $p > 0,9999$ ).

Transplantierte exprimierten in CD4+ Zellen signifikant mehr IFN $\gamma$  als Gesunde ( $p = 0,0467$ ). Die Unterschiede zwischen Gesunden und Dialysepatienten ( $p = 0,4310$ ) sowie Dialysepatienten und Transplantierten ( $p > 0,9999$ ) erreichten in der statistischen Testung keine Signifikanz.

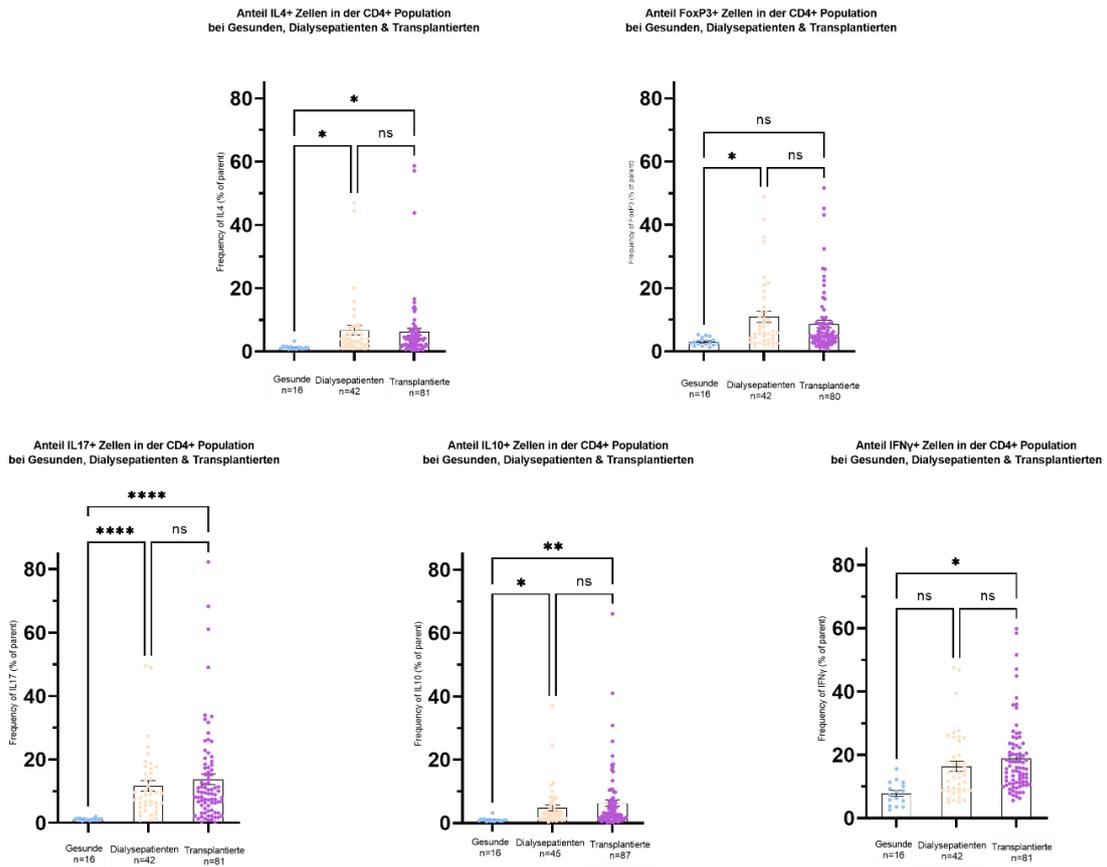


Abbildung 24: Zytokine in CD4+ Zellen bei Gesunden, Dialysepatienten und Transplantierten Dargestellt wird der Anteil IL-4/FoxP3/IL-17/IL-10/IFN $\gamma$  positiver Zellen in der Population der CD4+ Zellen (n = Probenanzahl).

#### 4.2.7 Zytokine in CD4+ Zellen bei Transplantierten mit und ohne Abstoßungsreaktion

Zusätzlich wurde das Patientenkollektiv nochmals bezüglich der Entwicklung von Abstoßungsreaktionen innerhalb des ersten Jahres nach Transplantation unterteilt. In die Gruppe der Patienten ohne Abstoßungsreaktion gehen die Proben 1 bis 3 aller Patienten ein, die transplantiert wurden und innerhalb des ersten Jahres nach Transplantation keine Abstoßungsreaktion entwickelten. In der Gruppe der Patienten mit Abstoßungsreaktion werden die Proben 1 bis 3 aller Patienten erfasst, die transplantiert wurden und innerhalb des ersten Jahres nach Transplantation eine biopsisch gesicherte Abstoßungsreaktion entwickelten. Nachfolgend wird die FACS-Analyse mit den prozentualen Anteilen der IL-4/FoxP3/IL-17/IL-10/IFN $\gamma$  positiven Zellen in der Population der CD4+ Zellen dargestellt. Die Probenanzahl n in den jeweiligen Gruppen variiert, da einzelne Proben aufgrund eines zu geringen Zellpellets oder eines fehlerbehafteten Färbeprozesses von der Auswertung ausgeschlossen wurden. Die Unterschiede zwischen den Gruppen wurden mittels des nichtparametrischen Mann-Whitney-U-Tests auf statistische Signifikanz untersucht. Keiner der Tests konnte das Signifikanzniveau von  $p < 0,05$  erreichen.

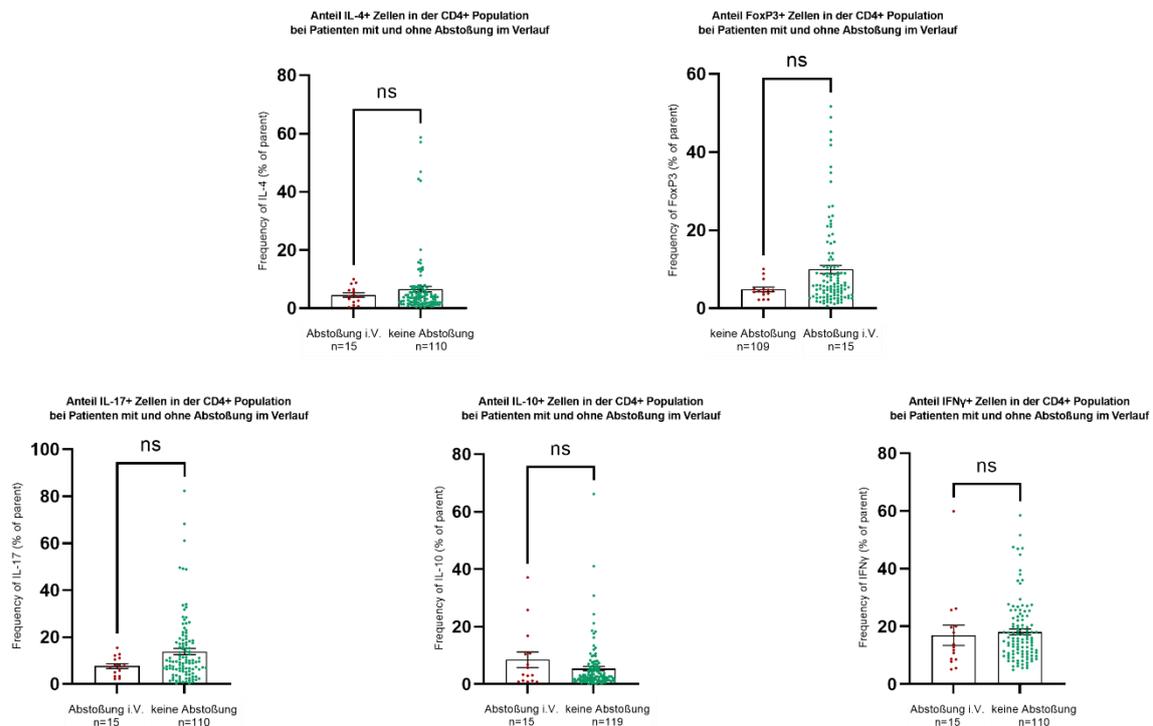


Abbildung 25: Zytokine in CD4+ Zellen bei Transplantierten mit und ohne Abstoßungsreaktion Dargestellt wird der Anteil IL-4/FoxP3/IL-17/IL-10/IFN $\gamma$ -positiver Zellen in der Population der CD4+ Zellen bei Patienten ohne und mit Abstoßungsreaktion im Verlauf des ersten Jahres nach Nierentransplantation. Es zeigten sich keine signifikanten Unterschiede (n = Probenanzahl).

#### 4.2.8 Korrelation des Anteils A20-positiver Zellen mit der Zytokinexpression

Abschließend wurden Zusammenhänge zwischen den Anteilen A20-positiver Zellen in den Populationen der CD3+, CD4+, CD19+ und CD11b+ Zellen und den prozentualen Anteilen IL-10+, INF $\gamma$ +, IL-17+, IL-4+ und FoxP3+ Zellen in der Population der CD4+ Zellen untersucht. Es sollten mögliche Unterschiede zwischen Gesunden, Dialysepatienten und Transplantierten beleuchtet werden. Als statistisches Mittel wurde der nichtparametrische Korrelationskoeffizient  $r$  nach Spearman berechnet. Das Signifikanzniveau wurde jeweils auf  $p < 0,05$  festgesetzt.

Nachfolgende Tabelle führt die Ergebnisse der Korrelationsanalyse mit den jeweils erreichten p-Werten und den jeweiligen Korrelationskoeffizienten in den drei verschiedenen Gruppen auf.

Hinsichtlich der proinflammatorischen Zytokine korrelierte die IL-17-Expression in CD4+ Zellen bei Transplantierten in allen vier untersuchten Zellreihen deutlich mit der A20-Expression. Bei Dialysepatienten zeigte sich ein solcher Zusammenhang nur in Bezug auf CD11b+ Zellen. Bei Gesunden bestand keinerlei Korrelation.

In Bezug auf die Expression von INF $\gamma$  und A20 zeigten sich in der Korrelationsanalyse keine oder nur schwache Signifikanzen, die auch keinem einheitlichen Muster zuordenbar waren.

Bezüglich der antiinflammatorischen Zytokine konnte in der Analyse bei Dialysepatienten und Transplantierten eine deutliche positive Korrelation zwischen der IL-10-Expression in CD4+ Zellen und der A20-Expression in allen vier untersuchten Zellreihen aufgezeigt werden. Im Gegensatz dazu fand sich bei Gesunden nur in Bezug auf die A20-Expression in T-Zellen eine signifikante Korrelation.

Die IL-4-Expression in CD4+ Zellen korrelierte bei Transplantierten mit der A20-Expression in T-Zellen und CD11b+ positiven Zellen. Bei Dialysepatienten konnte nur in Bezug auf die A20-Expression in CD11b+ Zellen eine Korrelation gefunden werden. Bei Gesunden zeigten sich in der Korrelationsanalyse keine Zusammenhänge.

Die FoxP3-Expression in CD4+ Zellen korrelierte, außer in CD11b+ Zellen von Transplantierten, nicht mit der A20-Expression in den untersuchten Zellreihen.

Gesunde

A20+	CD4+IL17+	CD4+IFN $\gamma$ +	CD4+IL-10+	CD4+IL4+	CD4+FoxP3+
CD3+	ns	ns	+ p = 0,0208 r = 0,5784	ns	ns
CD4+	ns	- p = 0,0368 r = -0,5298	+ p = 0,0193 r = 0,5839	ns	ns
CD19+	ns	- p = 0,0327 r = -0,5412	ns	ns	ns
CD11b+	ns	- p = 0,0425 r = -0,5166	ns	ns	ns

Dialysepatienten

A20+	CD4+IL17+	CD4+IFN $\gamma$ +	CD4+IL-10+	CD4+IL4+	CD4+FoxP3+
CD3+	ns	ns	++++ p < 0,0001 r = 0,6762	ns	ns
CD4+	ns	- p = 0,0478 r = -0,3072	++++ p < 0,0001 r = 0,6238	ns	ns
CD19+	ns	ns	++ p = 0,0019 r = 0,4595	ns	ns
CD11b+	+ p = 0,0154 r = 0,3717	ns	++++ p < 0,0001 r = 0,5742	+ p = 0,0338 r = 0,3282	ns

Transplantierte

A20+	CD4+IL17+	CD4+IFN $\gamma$ +	CD4+IL-10+	CD4+IL4+	CD4+FoxP3+
CD3+	++++ p < 0,0001 r = 0,4736	ns	++++ p < 0,0001 r = 0,7334	+++ p = 0,0002 r = 0,4493	ns
CD4+	+ p = 0,0118 r = 0,2802	ns	++++ p < 0,0001 r = 0,6910	++ p = 0,0016 r = 0,3472	ns
CD19+	+ p = 0,0102 r = 0,2929	+ p = 0,0118 r = 0,2873	++ p = 0,0010 r = 0,3567	ns	ns
CD11b+	++++ p < 0,0001 r = 0,4532	ns	++++ p < 0,0001 r = 0,5899	+++ p = 0,0001 r = 0,4112	+ p = 0,0162 r = 0,2681

Tabelle 5: Korrelation des Anteils A20-positiver Zellen mit der Zytokinexpression. Aufgeführt sind die jeweils erreichten p-Werte (p) und die Korrelationskoeffizienten nach Spearman (r). Nicht-signifikante Testungen werden mit ns gekennzeichnet. Proinflammatorische Zytokine sind rot, antiinflammatorische grün hinterlegt.

## 4.3 RT-qPCR und IHC: A20-Expression im Transplantatnierengewebe

### 4.3.1 RT-qPCR: A20-Gesamt-mRNA-Expression im Transplantatnierengewebe

In allen 15 Proben konnte die intrarenale Gesamtexpression von A20 mittels RT-qPCR nachgewiesen werden. Histopathologisch war in 8 Proben keine Abstoßungsreaktion zu sehen. Bei 4 Patienten lag eine Abstoßungsreaktion vor. Drei Proben stammen von Patienten, die vormals eine Abstoßungsreaktion hatten, die in dem von uns untersuchten Gewebe aber nicht mehr nachweisbar war (post-Abstoßung).

Nachfolgende Grafik stellt die anhand der delta CP-Werte gemessene relative A20-Gesamt-mRNA-Expression innerhalb der drei Gruppen dar. Zur Normalisierung wurde das nicht-regulierte Housekeeping-Gen beta-2-Aktin verwendet.

### Intrarenale A20-Expression auf mRNA-Ebene (RT-qPCR)

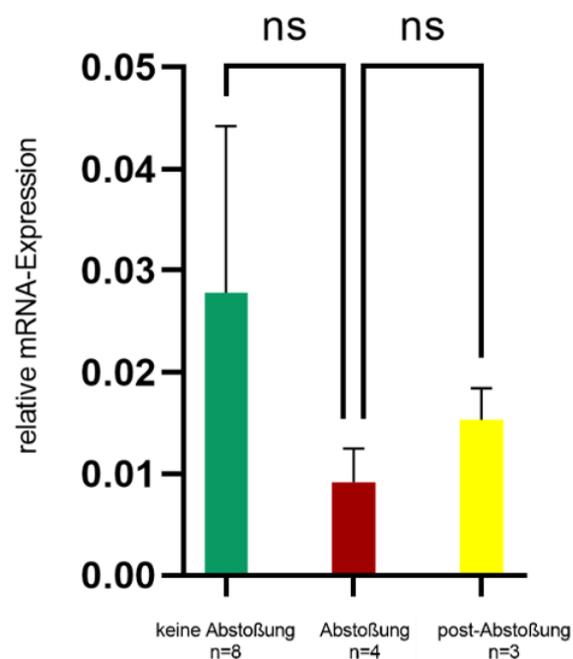


Abbildung 26: A20-mRNA-Gesamtexpression im Transplantatnierengewebe (RT-qPCR)

Es zeichnet sich eine reduzierte Gesamtexpression von A20 mRNA in Transplantatnierenbiopsien bei Vorliegen einer Abstoßungsreaktion ab. Nach einer stattgehabten Abstoßungsreaktion scheint zudem die A20 mRNA-Expression wieder anzusteigen.

Die Unterschiede zwischen den Gruppen wurden mithilfe des nichtparametrischen Mann-Whitney-U-Tests auf statistische Signifikanz untersucht. Es wurde ein Signifikanzniveau von  $p < 0,05$  festgelegt. Sowohl beim Vergleich der Gruppen Abstoßung vs. keine Abstoßung als auch Abstoßung vs. post-Abstoßung erreichten die Unterschiede jedoch keine statistische Signifikanz.

#### 4.3.2 IHC: A20-Proteinexpression im Transplantatnierengewebe

In 37 der 38 verwendeten Transplantatnierenbiopsien konnte A20 immunhistochemisch erfolgreich nachgewiesen werden. Beurteilt wurde die A20-Expression in den Tubulusepithelzellen und in intrarenalen Infiltraten. Differenziert wurde zudem, ob in der Biopsie eine Abstoßungsreaktion nachweisbar war oder nicht.

In 14 Biopsien war eine Abstoßungsreaktion nachweisbar, in 24 Biopsien war keine Abstoßungsreaktion nachweisbar.

Es zeichnet sich eine vermehrte Expression von A20 auf Proteinebene in Transplantatnierenbiopsien von Patienten bei Vorliegen einer Abstoßungsreaktion sowohl in den Tubulusepithelzellen als auch in den intrarenalen Infiltraten ab.

Die Unterschiede zwischen den Gruppen wurden mithilfe des nichtparametrischen Mann-Whitney-U-Tests auf statistische Signifikanz untersucht. Es wurde ein Signifikanzniveau von  $p < 0,05$  festgelegt. Die A20-Expression in den Tubulusepithelzellen zwischen den Gruppen mit und ohne Abstoßungsreaktion war im Mann-Whitney-U-Test nicht signifikant verschieden. Allerdings unterschied sich die A20-Expression in den intrarenalen Infiltraten zwischen den Gruppen mit und ohne Abstoßungsreaktion signifikant ( $p < 0,05$ ).

### Intrarenale A20-Expression auf Proteinebene

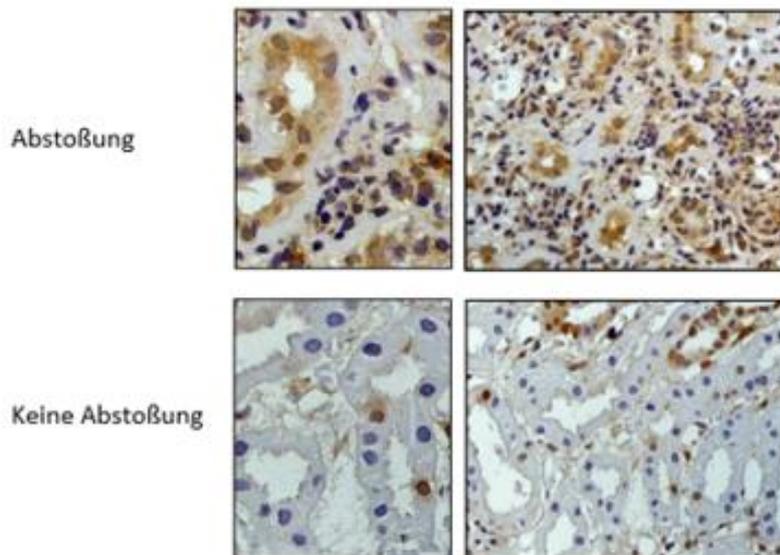
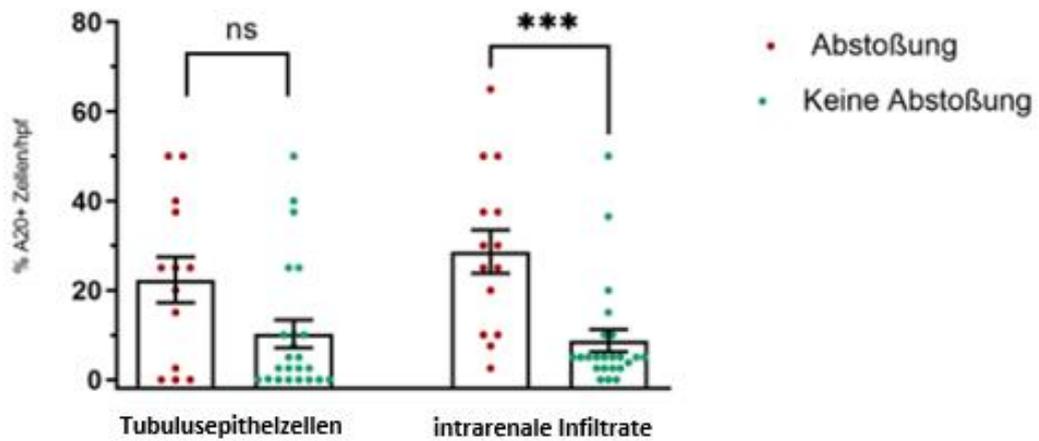


Abbildung 27: Immunhistochemie – Intrarenale A20-Expression auf Proteinebene  
 Signifikant vermehrte A20-Expression in intrarenalen Infiltraten bei Patienten mit  
 Abstoßungsreaktion im Vergleich zu Patienten ohne Abstoßungsreaktion.

## 5 Diskussion

Die Nierentransplantation ist die erfolgversprechendste Therapieoption für Patienten mit chronischer Niereninsuffizienz im Stadium 5 (1). Sie verbessert im Vergleich zur Dialyse Lebensqualität und Lebenserwartung (2). Trotz der Fortschritte der letzten Jahre bezüglich der Transplantatüberlebenszeit besteht weiterhin das Risiko, ein Transplantat durch akute oder chronisch vermittelte immunologische Schädigung vorzeitig zu verlieren (2, 3). Kommt es zu einer Transplantatfunktionsverschlechterung bleibt die invasive Nierenbiopsie aufgrund fehlender Biomarker des peripheren Blutes noch immer Goldstandard der Diagnostik.

Das Protein A20 beeinflusst als zentraler Inhibitor des Transkriptionsfaktors NF $\kappa$ B eine Vielzahl immunologischer Signalkaskaden. Die Funktion von A20 im Kontext der chronischen Niereninsuffizienz, der Dialyse und der Nierentransplantation ist jedoch noch unzureichend untersucht. Erste Studien legen eine Assoziation zwischen der Funktion und Expression von A20 und dem Ausmaß immunologisch-vermittelter Transplantatschädigung nahe.

Die im Rahmen dieser Arbeit anhand eines repräsentativen Studienkollektivs durchgeführten Untersuchungen der A20-Expression in der Zirkulation stützen die Hypothese, dass A20 in zirkulierenden CD4+ Zellen von Patienten, die eine Abstoßungsreaktionen entwickeln, verstärkt exprimiert wird. Auch in der Korrelationsanalyse fanden sich Hinweise darauf, dass eine verstärkte A20-Expression in T-Zellen einen Risikofaktor für eine Transplantatabstoßung darstellt. Unsere am intrarenalen Transplantatnierengewebe durchgeführten Untersuchungen untermauern die Hypothese, dass A20 intrarenal im Rahmen von Abstoßungsreaktion induziert wird.

Im Folgenden werden Vorzüge und Limitationen dieser Arbeit dargestellt, die vorliegenden Ergebnisse in Bezug zur aktuellen Literatur gesetzt und abschließend bewertet.

### 5.1 Register: Klinischer Verlauf vor und nach Nierentransplantation

Zunächst sollte ein Studienkollektiv gebildet werden, das in Bezug auf Alter, Geschlecht, den Anteil an Leichennierentransplantationen und Lebendnierenspenden, die nephrologische Grunderkrankung, kardiovaskuläre Risikofaktoren, die Ischämiezeiten, die Nierenfunktion nach Nierentransplantation, Abstoßungsreaktionen, Matchbefund und Komplikationen nach Nierentransplantation repräsentativ für das Gesamtkollektiv der Nierentransplantierten ist. Inwiefern das gelungen ist, wird nachfolgend dargestellt. Zunächst wird die Methodik, dann werden die Ergebnisse diskutiert.

### 5.1.1 Diskussion der Methoden

Dieser Arbeit gingen erste Studien unserer Arbeitsgruppe voraus, die ebenfalls Zusammenhänge zwischen der A20-Expression bei Nierentransplantierten und klinischen Transplantationsparametern anhand eines kleineren Studienkollektivs untersuchten (5). Die vorliegende Studie behandelt eine ähnliche Fragestellung, erweitert jedoch um eine mehr als doppelt so große Studienpopulation und ergänzt um eine gesunde Kontrollgruppe. Als günstig an dem hier gewählten Studiendesign erwies sich, dass alle eingeschlossenen Patienten in der nephrologischen Ambulanz der Universitätsmedizin Mainz nachbetreut wurden und die Dokumentation der Daten somit einheitlich und für alle Patienten nach dem gleichen Muster erfolgte. Als Nachteil ist die retrospektive Erfassung der klinischen Daten anzusehen.

### 5.1.2 Diskussion der Ergebnisse

#### 5.1.2.1 Vergleich von Patienten- und Kontrollkollektiv

Zur besseren Vergleichbarkeit der A20-Expression von Patienten- und Kontrollkollektiv wurde bei der Zusammenstellung der Kontrollgruppe auf eine ähnliche Verteilung von Alter und Geschlecht geachtet. Mit einem medianen Patientenalter von 56,50 Jahren im Patientenkollektiv und 56,00 Jahren im Kontrollkollektiv ist das in Bezug auf das Alter gut gelungen. Da das Patientenkollektiv zu 64,6 % aus Männern und 35,4 % aus Frauen und das Kontrollkollektiv jeweils zur Hälfte aus Männern und Frauen bestand, ist die Vergleichbarkeit der Kollektive in Bezug auf das Geschlecht eingeschränkt. Der noch unzureichend beleuchtete Einfluss des Geschlechts auf die A20-Expression lässt aktuell keine Beurteilung der Auswirkungen dieser unterschiedlichen Verteilung auf die vorliegenden Ergebnisse zu.

#### 5.1.2.2 Alter

In dieser Studie wiesen 50 % der Patienten ein Alter von 0 bis 55 Jahren auf, 29 % der Patienten waren zwischen 56 und 64 Jahre alt und 21 % der Patienten 65 Jahre alt oder älter. Im Gesamtkollektiv der 2019 in Deutschland Nierentransplantierten lag das Patientenalter bei 56 % der Patienten zwischen 0 und 55 Jahren, 23 % der Patienten waren zwischen 56 und 64 Jahren alt und 21 % der Patienten 65 Jahre alt oder älter (79).

Damit ist das Studienkollektiv in Bezug auf das Alter zum Zeitpunkt der Transplantation gut vergleichbar mit dem Gesamtkollektiv der Nierentransplantierten in Deutschland mit einer Tendenz zu einem minimal geringeren Anteil an Patienten unter 56 Jahren und einem etwas höheren Anteil an Patienten zwischen 56 und 64 Jahren.

#### 5.1.2.3 Geschlecht

Das Studienkollektiv war zu 64,6 % männlich und zu 34,4 % weiblich. In Deutschland waren im Jahr 2019 63 % der Nierentransplantatempfänger Männer und 37 % Frauen (79). Somit wird im Patientenkollektiv in Bezug auf das Empfängergeschlecht das Gesamtkollektiv der deutschlandweit Nierentransplantierten gut abgebildet.

#### 5.1.2.4 Lebendnierenspenden und Leichennierentransplantationen

Von den Teilnehmern dieser Studie hatten 18,8 % eine Lebendnierenspende und 81,3 % eine Leichennierenspende erhalten. In Deutschland wurden im Jahr 2020 23,6 % Lebendnierenspenden und 76,4 % Leichennierentransplantationen berichtet (80). Es zeigt sich eine Tendenz zu einem etwas geringeren Anteil an Lebendnierenspenden im Studienkollektiv. Insgesamt bleibt das Studienkollektiv aber vergleichbar mit dem gesamtdeutschen Kollektiv in Bezug auf den Anteil von Lebendnierenspenden und Leichennierentransplantationen.

#### 5.1.2.5 Nephrologische Grunderkrankung

Im Studienkollektiv führten primär glomeruläre Erkrankungen gefolgt von zystischen Nierenerkrankungen zur Indikation einer Nierentransplantation. In Gesamtdeutschland hingegen wurden zystische Nierenerkrankungen als häufigste zur Nierentransplantation führende Diagnosen dokumentiert, gefolgt vom chronischen nephritischen Syndrom (80). Glomeruläre Erkrankungen werden im gesamtdeutschen Kollektiv nicht als eigenständige Hauptdiagnose aufgeführt. In der vorliegenden Arbeit und im Bericht der DSO wurden einzelne Diagnosen zu differierenden übergeordneten Gruppen zusammengefasst. Dadurch wird ein direkter Vergleich der Ergebnisse dieser Arbeit mit dem gesamtdeutschen Kollektiv erschwert. Zusammenfassend sind zystische Nierenerkrankungen deutschlandweit häufige Ursachen, die eine Nierentransplantation indizieren.

#### 5.1.2.6 Kardiovaskuläre Risikofaktoren

Patienten, die ein Nierentransplantat erhalten haben, unterliegen im Vergleich zu Dialysepatienten einem geringeren Risiko kardiovaskuläre Ereignisse zu erleiden. Dennoch bleibt ihr Risiko im Vergleich zu Gesunden erhöht (81). So sind 50 % der Todesfälle nach Nierentransplantation durch kardiovaskuläre Ereignisse bedingt (82). Daher interessierte uns, wie kardiovaskuläre Risikofaktoren in unserem Studienkollektiv verteilt sind. Die Prävalenz der arteriellen Hypertonie lag im Studienkollektiv bei 87 %, die der KHK bei 29 % und jene der pAVK bei 8,3 %. Im Review von Neale et al. wurde die Prävalenz der arteriellen Hypertonie bei Patienten mit chronischer Niereninsuffizienz auf 85 % beziffert (81). Jene von Nierentransplantierten lag zwischen 55 und 93 % (81). Die Prävalenz der KHK bei sich in Evaluation für eine Nierentransplantation befindlichen Patienten belief sich auf 33 % und

die 10-Jahres kumulative Inzidenz von pAVK bei Nierentransplantierten auf 6 % (81). Damit entsprechen die Prävalenzen von arterieller Hypertonie, KHK und pAVK in unserem Studienkollektiv denen der internationalen Fachliteratur.

Im Patientenkollektiv wurden 3 Patienten aufgrund einer diabetischen Nephropathie nierentransplantiert. Innerhalb des Erhebungszeitraums konnte jedoch bei 10 Patienten ein Diabetes mellitus nachgewiesen werden. Daher ist davon auszugehen, dass bis zu 7 Patienten, entsprechend ca. 15 % der Patienten, einen Posttransplantationsdiabetes entwickelten. Diese Zahlen können auch durch die internationale Fachliteratur gestützt werden, in der die Häufigkeit eines Posttransplantationsdiabetes auf 4 bis 30 % beziffert wird (81, 82).

#### 5.1.2.7 Ischämiezeiten

Im Patientenkollektiv lag die mediane kalte Ischämiezeit bei 12 Stunden und die mediane warme Ischämiezeit bei 37 Minuten. Deutschlandweit wurde die kalte Ischämiezeit im Zeitraum von 2005 bis 2009 auf 13,4 Stunden beziffert (83). Da in den vergangenen Jahren eine Reduktion der kalten Ischämiezeit im Zeitverlauf auffiel und unsere Studie Nierentransplantationen der Jahre 2014 bis 2017 einschloss, ist die von uns ermittelte kalte Ischämiezeit mit dem gesamtdeutschen Kollektiv der Nierentransplantierten gut vergleichbar. Bezüglich der warmen Ischämiezeit existieren unseres Wissens keine offiziellen Zahlen für Deutschland. In einer niederländischen Studie, die Transplantationen der Jahre 1999 bis 2007 einschloss, lag die warme Ischämiezeit bei einem Mittelwert von 35 Minuten (83). Eine Mainzer Registerstudie, die Transplantationen der Jahre 2005 bis 2007 einschloss, bezifferte den Median der warmen Ischämiezeit auf 45 Minuten (84). In Bezug zu diesen Studien verhält sich die in der vorliegenden Arbeit ermittelte warme Ischämiezeit somit in etwa ähnlich.

#### 5.1.2.8 Kreatinin und CRP

Kreatinin und CRP gelten als wichtige klinische Verlaufsparemeter nach Nierentransplantation. Im Patientenkollektiv lag der Kreatininwert unmittelbar vor Nierentransplantation im Mittel bei 7,2 mg/dl und fiel nach Transplantation signifikant ab auf 4,3 mg/dl innerhalb der Tage 4 bis 7 und auf 1,8 mg/dl innerhalb des Zeitraums von 2 bis 6 Monaten. Die deutliche Streuung des Kreatinins vor Nierentransplantation kann durch Unterschiede im seit der letzten Dialyse vergangenen Zeitintervall erklärt werden. Auch bei Ramos-Barron et al. kam es 7 Tage nach Nierentransplantation zu einem Abfall des Kreatininwerts auf 3,8 mg/dl (85). Dieser liegt damit niedriger als jener in unserem Studienkollektiv. Aufgrund der unterschiedlichen Studiendesigns – im Rahmen unserer Studie wurden auch Kreatininwerte der Tage 4 bis 6 nach Transplantation erfasst – bleibt ein direkter Vergleich aber erschwert. Drei Monate nach Nierentransplantation werden in der Literatur Kreatininwerte von

1,6 bis 1,8 mg/dl berichtet (85, 86). Der von uns ermittelte Wert 2 bis 6 Monate nach Nierentransplantation entspricht somit gut den in der internationalen Literatur dokumentierten Werten.

Im Patientenkollektiv lag der Mittelwert des CRPs vor Nierentransplantation bei 8,1 mg/dl und stieg innerhalb der Tage 4 bis 7 nach Nierentransplantation signifikant an auf 17,6 mg/dl. 2 bis 6 Monate nach Nierentransplantation bestand mit einem CRP von 4,8 mg/dl ein Trend hin zu einem Abfall des CRPs. Auch Cueto-Manzano et al. registrierten vor Nierentransplantation ein CRP von 5 mg/dl und 6 Monate nach der Transplantation einen signifikanten Abfall des CRPs auf 3 mg/dl (87). Somit scheint die Nierentransplantation zu einer Besserung der bei Niereninsuffizienz vorliegenden chronischen Entzündungsreaktion zu führen (87). Dass sich in unserer Studie lediglich ein Trend hin zu einem Abfall des CRPs unterhalb des Ausgangsniveaus zeigte, ist möglicherweise durch den von uns zu breit gewählten Zeitpunkt der 3. Probennahme von 2 bis 6 Monaten nach NTX bedingt. Zukünftig sollten die Zeiträume der Probennahme zur besseren Ergebnisinterpretation enger gewählt werden.

#### 5.1.2.9 Abstoßungsreaktionen

Im Studienkollektiv entwickelten 12,5 % der Transplantierten innerhalb des ersten Jahres eine Abstoßungsreaktion. Bei all diesen Patienten war eine zelluläre Abstoßung nachweisbar. Bei einem Patienten (2,1 %) wurde zusätzlich eine humorale Abstoßung diagnostiziert. Insgesamt werden in der Literatur Abstoßungsreaktionen bei 10 bis 35 % der Patienten innerhalb des ersten Jahres nach Nierentransplantation dokumentiert (88). Zudem zeigten mehrere Studien eine kontinuierliche Reduktion der Abstoßungsraten innerhalb des ersten Jahres nach Nierentransplantation (88). Gemäß eines Cochrane-Reviews scheinen sich die Abstoßungsraten innerhalb des ersten Jahres nach Nierentransplantation aktuell auf ca. 10 % zu stabilisieren (88). Demnach entspricht die von uns ermittelte Abstoßungsrate gut den Angaben der aktuellen Literatur.

#### 5.1.2.10 Matchbefund

Im Rahmen dieser Studie zeigte sich ein Trend hin zu mehr Mismatches bei Patienten, die eine Abstoßungsreaktion erlitten im Vergleich zu Patienten ohne Abstoßungsreaktion. Die Ergebnisse erreichten jedoch keine statistische Signifikanz. Innerhalb des ersten Jahres nach Nierentransplantation steigen die Risiken der Entwicklung donorspezifischer Antikörper sowie eines Transplantatverlusts proportional mit der Anzahl der Mismatches an (89, 90). Daher könnte das Nichterreichen einer statistischen Signifikanz in unserer Studie durch das kleine Studienkollektiv bedingt sein, in welchem lediglich 6 Patienten innerhalb des ersten Jahres nach Nierentransplantation eine Abstoßungsreaktion entwickelten.

#### 5.1.2.11 CMV und BKV

Das Zytomegalievirus (CMV) bleibt im Rahmen der Nierentransplantation trotz medikamentöser Prophylaxe das Virus höchster Relevanz (91). Infektionen treten aufgrund der hohen Immunsuppression überwiegend innerhalb der ersten 100 Tage nach Transplantation auf (91). Im Patientenkollektiv entwickelten innerhalb des ersten Jahres nach Nierentransplantation 27,1 % der Patienten eine CMV-Virämie und 6,25 % eine manifeste CMV-Erkrankung. In der Literatur werden Prävalenzen einer CMV-Infektion von 17 bis 92 % und einer CMV-Erkrankung von bis zu 37 % beschrieben (91). Somit decken sich unsere Ergebnisse mit denen der Literatur.

Auch die durch das BK-Virus (BKV) verursachte Polyomavirus-Nephropathie stellt im Zusammenhang mit der Nierentransplantation eine gefürchtete Komplikation dar und tritt überwiegend innerhalb der ersten 2 Jahre nach Nierentransplantation auf (1). Sie geht mit einer schleichenden Funktionsverschlechterung des Transplantats und zum Teil mit einem vollständigen Verlust der Transplantatfunktion einher (92). In unserem Patientenkollektiv war bei 6,25 % der Transplantierten innerhalb des ersten Jahres nach Nierentransplantation eine Polyomavirusnephropathie nachweisbar. In der Literatur werden Häufigkeiten von 1 bis 10 % dokumentiert (92, 93). Auch hier stützen unsere Ergebnisse die der Fachliteratur.

#### 5.1.2.12 Urologische und chirurgische Komplikationen

Neben den immunologischen und infektiologischen Komplikationen sind auch urologische und chirurgische Komplikationen nach Nierentransplantation von Relevanz. In unserem Studienkollektiv war bei 12,5 % der Patienten ein postoperatives Hämatom nachweisbar. 83,3 % der Hämatome konnten konservativ behandelt werden. 16,7 % der Hämatome – entsprechend 1 Hämatom – also 2,1 % des Patientenkollektivs wurden operativ versorgt. In der Fachliteratur weist die Häufigkeit postoperativer Hämatome aufgrund einer uneinheitlichen Definition des Hämatoms eine große Schwankungsbreite auf (94). Es werden Prävalenzen zwischen 0,2 und 14 % dokumentiert (94). Auch in unserer Studie wurden die Kriterien eines postoperativen Hämatoms nicht eindeutig formuliert. Eine der größten Studien definierte das postoperative Hämatom als einen Abfall des Hämoglobinwerts um 2 g/dl innerhalb von 24 Stunden während der ersten 3 Tage nach Transplantation bei Vorhandensein eines Hämatoms von mindestens 33,2 cm<sup>3</sup> (94). In dieser Studie war bei 4,9 % der Patienten ein Hämatom nachweisbar, das bei 0,6 % der Studienpopulation operativ saniert werden musste (94). Insgesamt bleibt ein Vergleich unserer Daten mit denen der gegenwärtigen Literatur aufgrund der uneinheitlichen Definition des postoperativen Hämatoms erschwert.

Lymphozelen stellen die häufigste perirenale Flüssigkeitsansammlung nach Nierentransplantation dar und treten meist innerhalb der ersten 12 Wochen nach Nierentransplantation auf (95). In unserer Studie war bei 6,25 % der Patienten eine Lymphozele nachweisbar. 33 % der Lymphozelen mussten

operativ versorgt werden. Auch in Bezug auf die Lymphozele schwanken die Prävalenzen in der Literatur stark aufgrund uneinheitlicher Definition und diagnostischer Kriterien (95). Die berichteten Häufigkeiten liegen zwischen 0,6 % und 51 %. Somit sind unsere Ergebnisse im unteren Viertel dieses Schwankungsbereichs einzuordnen. Da ein Großteil der Lymphozelen asymptomatisch bleibt und viele Lymphozelen lediglich inzidentell diagnostiziert werden, ist davon auszugehen, dass in unserer Studie Lymphozelen nur erfasst wurden, sofern sie klinisch symptomatisch wurden (95).

Zusammenfassend weist das Patientenkollektiv dieser Studie große Ähnlichkeit mit dem deutschen beziehungsweise internationalen Gesamtkollektiv an Nierentransplantierten auf. Insofern lassen sich die Ergebnisse der FACS-Färbung gut auf das Gesamtkollektiv der Nierentransplantierten übertragen und dürften für eine große Patientengruppe von Relevanz sein. Aufgrund der relativ begrenzten Fallzahl von  $n = 48$  kann das Studienkollektiv zwar keinen Anspruch auf Repräsentativität erheben. Es stimmt jedoch in den wesentlichen Charakteristika gut mit dem deutschen beziehungsweise internationalen Gesamtkollektiv an Nierentransplantierten überein. Darüber hinaus bietet die gesunde Kontrollgruppe durch eine passende Altersverteilung eine wertvolle Vergleichsgrundlage.

## 5.2 FACS-Analyse: A20-Expression in PBMCs vor und im Verlauf nach NTX

Um die Funktion von A20 in der Zirkulation näher zu beleuchten und zu bewerten, ob A20 als potenzieller Biomarker für Transplantatschädigung oder Abstoßungsreaktionen dienen kann, wurde im nächsten Schritt mittels FACS-Analyse die A20-Expression auf Proteinebene in CD4+, CD3+, CD11b+ und CD19+ Zellen des peripheren Blutes untersucht. Anschließend wurden Zusammenhänge zwischen der gemessenen A20-Expression und klinischen Transplantationsparametern sowie dem Zytokinexpressionsmuster herausgearbeitet. Nachfolgend werden Stärken und Schwächen der von uns verwendeten Methodik erläutert und unsere Ergebnisse in Bezug zu ähnlichen Untersuchungen gesetzt und bewertet.

### 5.2.1 Diskussion der Methoden

Im Rahmen einer Pilotstudie unserer Arbeitsgruppe konnten bereits erste Erkenntnisse zur A20-Expression in PBMCs von Nierentransplantierten gewonnen werden (5). Methodisch wird in der vorliegenden Studie um ein größeres Kollektiv und eine Kontrollgruppe erweitert. Mit dem von uns konzipierten Studiendesign wird zudem, unseres Wissens erstmalig, die A20-Expression in PBMCs von Nierentransplantierten, mit der von Dialysepatienten und Gesunden verglichen.

Erfreulich war, dass trotz starker Immunsuppression unmittelbar nach Nierentransplantation ausreichend Zellmaterial zur Durchführung von FACS-Färbungen zur Verfügung stand.

Als Nachteil in Bezug auf die von uns verwendete Methodik ist trotz eines größeren Kollektivs im Vergleich zu der Pilotstudie unserer Arbeitsgruppe die noch immer relativ geringe Fallzahl von  $n = 48$  zu nennen. Die geringe Kollektivgröße bedingt eine nochmals niedrigere Fallzahl in den jeweiligen Subgruppen, sodass in der Gruppe der Patienten mit Abstoßungsreaktion lediglich eine Fallzahl von  $n = 6$  erreicht werden konnte, wodurch die Reliabilität der Ergebnisse eingeschränkt bleibt. Zudem erschwerte die geringe Kollektivgröße eine Darstellung der Unterschiede zwischen den einzelnen Subgruppen der nephrologischen Grunderkrankungen.

Da sich die Transplantierten von den Dialysepatienten nicht nur durch den Erhalt eines Nierentransplantats, sondern auch durch den Beginn einer Immunsuppression unterscheiden, können Verschiedenheiten zwischen den einzelnen Subgruppen nicht eindeutig der Transplantation zugeordnet werden, sondern könnten auch durch den Beginn einer Immunsuppression bedingt sein. Weiterhin von Nachteil war, dass keine PBMCs direkt während einer Abstoßungsreaktion gewonnen wurden. Studien, welche die A20-Expression vor, während und nach einer Abstoßungstherapie untersuchen, könnten die Funktion von A20 in Bezug auf Abstoßungsreaktionen besser beleuchten und bleiben abzuwarten.

## 5.2.2 Diskussion der Ergebnisse

### 5.2.2.1 Anteil A20-positiver Zellen bei Gesunden, Dialysepatienten und Transplantierten

A20 ließ sich in der FACS-Analyse in CD4+, CD3+, CD19+ und CD11b+ Zellen von Gesunden, Dialysepatienten und Transplantierten erfolgreich nachweisen. In allen 4 Zellreihen war der Anteil A20-positiver Zellen bei Transplantierten und Dialysepatienten signifikant höher als bei Gesunden. Signifikante Unterschiede zwischen Dialysepatienten und Transplantierten waren nicht nachweisbar. Die chronische Niereninsuffizienz und die Dialysetherapie gehen oftmals mit einer erhöhten entzündlichen Aktivität einher (96). Da A20 ein NFκB-induziertes Protein ist, erscheint der erhöhte Anteil A20-positiver Zellen bei Dialysepatienten und Transplantierten im Vergleich zu Gesunden gut erklärbar. Unterschiede zwischen dem Anteil A20-positiver Zellen bei Dialysepatienten und Transplantierten konnten, möglicherweise aufgrund der zu geringen Kollektivgröße, nicht herausgearbeitet werden. Hierzu bleiben größere Studien abzuwarten.

### 5.2.2.2 Anteil A20-positiver Zellen bei Transplantierten mit und ohne Abstoßungsreaktion

Unsere Untersuchungen ergaben bei Patienten, die innerhalb des ersten Jahres nach Nierentransplantation eine Abstoßungsreaktion entwickelten, eine signifikant vermehrte A20-Expression in CD4+ Zellen und einen Trend zu einer vermehrten A20-Expression in CD3+ Zellen, im Vergleich zu Patienten ohne Abstoßungsreaktion.

In der Pilotstudie unserer Arbeitsgruppen präsentierte sich die A20-Expression möglicherweise aufgrund der geringen Kohortenstärke sehr variabel (5). Allerdings konnte bereits anhand einer kleineren, der Gesamtpopulation entnommenen, Subpopulation ein Hinweis für eine vermehrte A20-Expression in CD4+ Zellen bei Patienten mit Abstoßungsreaktion gefunden werden (5). Die vorliegende Studie bestätigt diese ersten Erkenntnisse anhand eines größeren Patientenkollektivs und weist daher eine bessere Reliabilität auf.

Da A20 ein NFκB-induziertes Protein ist, könnte die Induktion der A20-Expression in T-Zellen im Rahmen von Abstoßungsreaktionen Ausdruck der mit einer Abstoßungsreaktion einhergehenden verstärkten Immunantwort sein. Auch könnte eine verstärkte Expression von A20 in T-Zellen im Rahmen von Abstoßungsreaktionen durch die antiinflammatorischen Eigenschaften des Proteins eine Transplantatschädigung begrenzen. Um diese zwei Aspekte besser zu beleuchten, bietet es sich an, die CD4+ Zellen näher zu charakterisieren.

In der vorliegenden Studie erbrachte der Vergleich der Zytokinexpression von IL-4, IL-10, IL-17 und IFNγ in CD4+ Zellen bei Patienten mit und ohne Abstoßungsreaktion innerhalb des ersten Jahres nach Nierentransplantation keine signifikanten Unterschiede. Lediglich bezüglich der Expression von FoxP3 zeigte sich ein Trend zu einer stärkeren Expression bei Patienten mit Abstoßungsreaktion. Generell

gelten FoxP3+ Zellen als Immunsuppressoren und scheinen im Kontext der Nierentransplantation eine tolerogene Immunantwort zu fördern (58). Dennoch besteht keine einfache Korrelation zwischen der Prävalenz von Abstoßungsreaktionen und der Menge an FoxP3+ Zellen (58). Vielmehr hängt die tolerogene Immunantwort von weiteren Faktoren, wie dem Verhältnis von Tregs zu T-Effektorzellen ab (58). Daher lässt der von uns registrierte Trend keine direkten Rückschlüsse darauf zu, ob die verstärkte A20-Expression in T-Zellen bei Abstoßungsreaktionen eine tolerogene Immunantwort fördert. Zukünftige Untersuchungen, welche die A20-Expression in weiteren T-Zell-Subgruppen analysieren, könnten neue Erkenntnisse zu dieser Thematik liefern.

#### 5.2.2.3 Korrelation des Anteils A20-positiver Zellen mit der Zytokinexpression

Im nächsten Schritt wurden Zusammenhänge zwischen der A20-Expression und dem Zytokinexpressionsmuster von CD4+ Zellen untersucht.

Insgesamt waren die Ergebnisse dieser Korrelationsanalyse sehr heterogen. Dennoch zeigten sich Unterschiede in der Stärke der Zusammenhänge bei den drei untersuchten Gruppen und den fünf untersuchten Zytokinen. Die Zusammenhänge waren bei Transplantierten am stärksten ausgeprägt, gefolgt von Dialysepatienten. Am geringsten waren sie bei Gesunden.

Die Korrelationsanalyse der proinflammatorischen Zytokine ließ zwischen INF $\gamma$  und A20 keine Zusammenhänge erkennen. Die IL-17-Expression hingegen korrelierte bei Transplantierten in allen vier Zellreihen mit der A20-Expression. Bei Dialysepatienten zeigte sich eine Korrelation nur in Bezug auf die A20-Expression in CD11b+ Zellen. Bei Gesunden fand sich keinerlei Zusammenhang. IL-17 werden im Kontext der Nierentransplantation proinflammatorische Effekte zugeschrieben. Dies betrifft insbesondere Abstoßungsreaktionen und die Vermittlung von Niereninflammation als Reaktion auf Ischämie- und Reperfusionsschaden (97). Die Korrelation und die verstärkte Expression von IL-17 und A20 bei Transplantierten legen nahe, dass A20 im Rahmen von Entzündungsreaktionen induziert wird, um eine übermäßige Inflammation zu begrenzen.

In Bezug auf die antiinflammatorischen Zytokine waren zwischen der Expression von FoxP3 und A20 keine Korrelationen nachweisbar. Dafür zeigten sich Zusammenhänge zwischen der Expression von IL-10 und A20. Bei Dialysepatienten und Transplantierten ging eine verstärkte IL-10-Expression in CD4+ Zellen mit einer verstärkten A20-Expression in allen vier untersuchten Zellreihen einher. Bei Gesunden war eine solche Korrelation nur in T-Zellen zu finden. IL-10 ist, wie A20 auch, ein NF $\kappa$ B-Inhibitor und wird hauptsächlich von Monozyten und Lymphozyten exprimiert (98). Es gilt als antiinflammatorisches Zytokin, das mit einer gewissen Latenz auf proinflammatorische Stimuli folgt, um Entzündungsreaktionen zu begrenzen (98). Mechanismen wie die Komplementaktivierung im Rahmen der Bioinkompatibilität während der Dialyse sind typische Stimuli für die Sekretion von IL-10 (98). Auch Urämie und eine verringerte glomeruläre Filtrationsrate (GFR) bedingen erhöhte

IL-10-Level (98). Dies könnten Erklärungen für die verstärkte Expression von A20 und IL-10 bei Dialysepatienten sein. Die Korrelation zwischen der Expression von A20 und IL-10 beziehungsweise die verstärkte Expression dieser beiden Proteine bei Transplantierten könnten einerseits durch die meist weiterhin reduzierte GFR und andererseits durch die chronische Immunreaktion gegen das Transplantat bedingt sein.

Positive Korrelationen zwischen der IL-4-Expression und der Expression von A20 in den vier untersuchten Populationen zeigten sich bei Transplantierten in Bezug auf CD3+, CD4+ und CD11b+ Zellen. Bei Dialysepatienten war eine Korrelation nur bei den CD11b+ Zellen nachweisbar. Bei Gesunden bestand diesbezüglich kein Zusammenhang. IL-4, ein Zytokin, das bevorzugt humorale Immunantworten kontrolliert, werden protektive Eigenschaften auf die Transplantatfunktion und das Transplantatüberleben zugeschrieben (99, 100). Die positive Korrelation von IL-4 und A20 bei Transplantierten könnte somit Ausdruck eines Versuchs sein, gegen das Transplantat gerichtete Immunreaktionen zu begrenzen.

Zusammenfassend korreliert bei Transplantierten die A20-Expression positiv mit der Expression des proinflammatorischen Zytokins IL-17 und der antiinflammatorischen Zytokine IL-4 und IL-10. Die Ergebnisse der Korrelationsanalyse stützen die Hypothese, dass A20 eine protektive Funktion gegenüber Transplantatschädigung zukommt.

#### 5.2.2.4 Anteil A20-positiver Zellen: Nephrologische Grunderkrankungen im Vergleich

In der Literatur befassen sich einige Studien mit der A20-Expression in PBMCs bei unterschiedlichen Grunderkrankungen (101-105). Darin finden sich Hinweise darauf, dass der Anteil A20-positiver Zellen in PBMCs je nach vorliegender Grunderkrankung variiert. Jedoch existieren unseres Wissens noch keine Studien, welche die A20-Expression bei Patienten mit Niereninsuffizienz beleuchten. Im Wissen um diesen Aspekt fragten auch wir uns, ob sich der Anteil A20-positiver Zellen bei den verschiedenen nephrologischen Grunderkrankungen unterscheidet.

In der vorliegenden Studie zeigte sich der Anteil A20-positiver Zellen bei Patienten mit diabetischer Nephropathie in allen 4 Zellreihen im Vergleich zur Subgruppe mit der höchsten A20-Expression signifikant vermindert. Einschränkend ist auch hier auf die geringe Fallzahl von  $n = 5 - 8$  in der Subgruppe der Patienten mit Diabetes mellitus zu verweisen.

Auch Cheng et al. bestimmten die A20-Expression in PBMCs von Patienten mit unterschiedlichen Formen des Diabetes mellitus und verglichen diese mit jener von Gesunden (102). Sowohl auf transkriptioneller als auch auf Proteinebene war die A20-Expression bei Patienten mit Diabetes mellitus im Vergleich zu Gesunden signifikant verringert (102). Dadurch wurde einer verminderten A20-Expression in PBMCs eine mögliche Rolle in der Pathogenese des Diabetes mellitus zugewiesen (102). Da Dysregulationen im NF $\kappa$ B-Signalweg bekanntermaßen Fehlfunktionen von

pankreatischen Betazellen mitbedingen, könnte A20 über diesen molekularen Mechanismus eine Rolle in der Pathogenese des Diabetes mellitus zukommen (102). Ein direkter Vergleich der Ergebnisse der vorliegenden Studie mit denen von Cheng et al. ist aufgrund der verschiedenen Studiendesigns jedoch nur begrenzt möglich. Da Cheng et al. die A20-Expression in der Gesamtheit der PBMCs bei Patienten mit Diabetes mellitus und Gesunden verglichen, wir hingegen diese in verschiedenen PBMC-Subpopulationen bei Patienten mit Diabetes mellitus der von Patienten mit Niereninsuffizienz anderer Genese gegenüberstellten, ist ein direkter Vergleich dieser zwei Studien nur begrenzt zielführend. Dennoch sprechen auch unsere Ergebnisse für eine eher erniedrigte A20-Expression bei Patienten mit Diabetes mellitus.

Bezüglich anderer nephrologischer Grunderkrankung ließen sich der vorliegenden Studie keine weiteren spezifischen Muster der A20-Expression entnehmen. In der Literatur finden sich Hinweise auf eine Reduktion der A20-Expression in PBMCs bei Patienten mit Autoimmunerkrankungen (101, 104). So wiesen Li et al. eine reduzierte A20-mRNA-Expression in PBMCs bei Patienten mit SLE im Vergleich zu Gesunden nach (101). Zudem exprimierten Patienten mit Lupusnephritis signifikant weniger A20-mRNA in PBMCs als Patienten ohne Lupusnephritis (101). Da in dem Kollektiv der vorliegenden Studie der Anteil an Patienten mit Lupusnephritis zu gering war, konnten wir mit unserer Studie keine weiteren Erkenntnisse gewinnen, die diesen Aspekt näher beleuchten.

Insgesamt bestätigt die vorliegende Studie, dass die A20-Expression in PBMCs abhängig ist von der vorliegenden Grunderkrankung und bei Diabetes mellitus im Vergleich zu Patienten mit Niereninsuffizienz anderer Genese reduziert ist.

#### 5.2.2.5 Korrelation des Anteils A20-positiver Zellen mit klinischen Parametern

Um weitere Erkenntnisse zur Funktion von A20 in der Zirkulation im Verlauf nach Nierentransplantation zu gewinnen, sollte im letzten Schritt untersucht werden, inwiefern Zusammenhänge zwischen dem Anteil A20-positiver Zellen und klinischen Transplantationsparametern bestehen.

Die Korrelationsanalyse erbrachte in Bezug auf die T-Zellen positive Korrelationen zwischen der A20-Positivität in CD3+ Zellen und dem Patientenalter sowie der A20-Positivität in CD3+ Zellen 4 bis 7 Tage nach Transplantation und dem Kreatininwert. In der Subpopulation der CD4+ Zellen war der Anteil A20-positiver Zellen positiv mit der warmen Ischämiezeit und der Thrombozytenzahl korreliert. Bezüglich der A20-Positivität in B-Zellen und dem Hämoglobinwert bestand eine negative Korrelation. Insgesamt handelte es sich bei den aufgeführten Korrelationen nur um schwach positive beziehungsweise negative Zusammenhänge.

In der Literatur finden sich Berichte etlicher Arbeitsgruppen, welche die Zusammenhänge zwischen der A20-Expression in PBMCs mit krankheitsassoziierten klinischen Parametern

korrelierten (5, 101, 103-105). Jiang et al. zeigten negative Korrelationen zwischen der A20-mRNA-Expression in PBMCs und den Krankheitsaktivitätsscores der Psoriasis wie Psoriasis Area Severity Index (PASI) und Body Surface Area (BSA) (104). Bezüglich des SLEs konnten Zhang et al. negative Korrelationen zwischen der A20-mRNA-Expression in PBMCs und dem SLE-Disease Activity Index (SLEDAI) sowie der Blutsenkungsgeschwindigkeit ausmachen (101). Zhang et al. untersuchten Zusammenhänge zwischen der A20-Proteinexpression in verschiedenen Subpopulationen der Monozyten von Patienten mit rheumatoider Arthritis (103). In deren Studie korrelierte die A20-Expression in intermediären Monozyten, denen eine proinflammatorische Rolle zugeschrieben wird, negativ mit der Höhe der CCP-Antikörper und jene in nichtklassischen Monozyten, die eher antiinflammatorische Eigenschaften aufweisen, positiv mit dem modifizierten Sharp-Gesamtscore (mTSS) (103). Auch in PBMCs von Patienten mit Hepatitis B und ihren Komplikationen wurde die A20-mRNA-Expression bestimmt (105). Bei Patienten mit Leberzirrhose korrelierte die A20-Expression positiv mit GOT und GPT sowie negativ mit Albumin, dem Hämoglobinwert und der Thrombozytenzahl. Patienten mit Komplikationen der Leberzirrhose, wie Varizenblutungen und Aszites, wiesen zudem höhere A20-Expressionsraten auf als Patienten mit kompensierter Leberzirrhose (105).

Insgesamt zeigt die aktuelle Literatur demnach kein einheitliches Muster, wie sich das Maß der A20-Expression in PBMCs und die Krankheitsaktivität zueinander verhalten. Bei Patienten mit SLE und Psoriasis scheint eine verminderte A20-Expression in PBMCs mit einem schwereren Erkrankungsverlauf assoziiert zu sein. Bei der rheumatoiden Arthritis ist kein einheitliches Muster erkennbar. Bei der Hepatitis B und ihren Komplikationen korreliert umgekehrt eine verstärkte A20-Expression in PBMCs mit einer höheren Krankheitsaktivität (101, 103-105).

Zusammenhänge zwischen der A20-Expression in PBMCs und Nierenerkrankungen oder Nierentransplantation sind noch unzureichend untersucht. Hierzu konnten bisher nur Dietrich et al. aus unserer Arbeitsgruppe erste Erkenntnisse gewinnen. In Bezug auf die A20-Expression in T-Zellen zeigte sich bei Dietrich et al. eine positive Korrelation zwischen der A20-Expression in CD4+ Zellen und dem Kreatininwert (5). Diese Korrelation konnte in der vorliegenden Studie jedoch nicht bestätigt werden. Die in der vorliegenden Studie gefundenen Korrelationen in Bezug auf die A20-Expression in T-Zellen lassen folgenden Schluss zu: Zunehmendes Patientenalter, steigende Kreatininwerte und lange Ischämiezeiten gelten als Risikofaktoren für die Entwicklung von Abstoßungsreaktionen und Transplantatdysfunktion (89). Demnach sind die positiven Korrelationen dieser klinischen Parameter mit der A20-Expression in T-Zellen Ausdruck eines erhöhten Risikos für eine Transplantatschädigung. Somit könnte A20 als potenzieller Biomarker einer Transplantatschädigung dienen.

In der vorliegenden Studie korrelierte die A20-Expression in CD19+ Zellen negativ mit dem Hämoglobinwert. Im Mausmodell ist die Defizienz von A20 in B-Zellen mit der Bildung autoreaktiver

Zellen assoziiert und führt zu einer verstärkten Sekretion proinflammatorischer Zytokine (10, 29). Daher wurden A20 in B-Zellen protektive Effekte gegenüber der Ausbildung von Autoimmunphänomenen sowie der Bildung autoreaktiver Zellen zugewiesen (10, 29). Über diesen Mechanismus könnte A20 in B-Zellen die Alloreaktivität begrenzen. Die von uns beschriebene Korrelation zwischen der Expression von A20 in B-Zellen und dem Hämoglobinwert könnte dadurch bedingt sein, dass Abstoßungsreaktionen zu einer Verschlechterung der Transplantatfunktion führen und diese wiederum oftmals mit einer Anämie einhergeht. Daher lassen unsere Ergebnisse den Schluss zu, dass A20 in B-Zellen eine protektive Funktion auf die Transplantatfunktion zukommt.

Die Ursache der in der vorliegenden Studie beobachteten positiven Korrelation zwischen der Thrombozytenzahl und der A20-Expression in CD4+ Zellen lässt sich nicht abschließend klären. In der Literatur existieren nur wenige Studien, welche die Funktion von Thrombozyten bei Nierentransplantierten untersuchten oder einen Zusammenhang zwischen der Thrombozytenzahl und der A20-Expression beleuchteten. Zwar ist eine Beeinträchtigung des hämostatischen Systems bei Patienten mit chronischer Niereninsuffizienz allgemeiner Konsens, bezüglich der absoluten Thrombozytenzahl und der Prognose der chronischen Niereninsuffizienz besteht jedoch kein eindeutiger Zusammenhang (106, 107). Ob ein kausaler Zusammenhang bei der von uns gefundenen Korrelation besteht, oder es sich hierbei lediglich um einen inzidentellen Zusammenhang handelt, lässt sich nicht abschließend beurteilen. Hierzu bleiben weitere Untersuchungen abzuwarten.

Zusammenfassend zeigen die Ergebnisse der FACS-Analyse eine verstärkte A20-Expression in CD4+ Zellen bei Patienten, die eine Abstoßungsreaktion entwickeln. Auch in der Korrelationsanalyse mit klinischen Transplantationsparametern fanden sich Hinweise darauf, dass eine verstärkte A20-Expression in T-Zellen einen Risikofaktor für eine Transplantatschädigung darstellt. Ein Anstieg der A20-Expression in zirkulierenden T-Zellen könnte daher ein Kompensationsmechanismus sein, der abstoßungsbedingte Gewebeschädigung begrenzt.

Darüber hinaus finden sich in dieser Studie Hinweise auf eine Abhängigkeit der A20-Expression von der vorliegenden nephrologischen Grunderkrankung. Insbesondere Patienten mit Diabetes mellitus scheinen A20 in zirkulierenden PBMCs reduziert zu exprimieren.

Insgesamt stellt sich die A20-Expression in der vorliegenden Studie nicht als unabhängiger Parameter einer Abstoßungsreaktion dar. Um die A20-Expression in zirkulierenden CD4+ Zellen als sicheren Biomarker einer Abstoßungsreaktion nutzen zu können, müssten zunächst Effekte weiterer Einflussfaktoren auf die A20-Expression untersucht werden.

### 5.3 RT-qPCR und IHC: A20-Expression im Transplantatnierengewebe

Um den direkten Einfluss der A20-Expression auf das Transplantatnierengewebe näher zu beschreiben, untersuchten wir abschließend die intrarenale A20-Expression auf transkriptioneller und auf Proteinebene. Im Folgenden werden zunächst Stärken und Schwächen der von uns verwendeten Methodik erörtert, bevor die Ergebnisse in Bezug zu ähnlichen Studien gesetzt werden.

#### 5.3.1 Diskussion der Methoden

##### 5.3.1.1 RT-qPCR: A20-Gesamt-mRNA-Expression im Transplantatnierengewebe

Diese Untersuchung sollte klären, ob Unterschiede der intrarenalen A20-Gesamt-mRNA-Expression bei Patienten ohne, mit und nach einer stattgehabten Abstoßungsreaktion bestehen. In allen 3 Subgruppen konnte A20 mRNA erfolgreich nachgewiesen werden. Es bestanden Trends zu einer verringerten A20-Gesamt-mRNA-Expression bei Patienten während einer Abstoßungsreaktion und zu einem Wiederanstieg der A20-Gesamt-mRNA-Expression nach stattgehabter Abstoßungsreaktion. Die Unterschiede zwischen den Subgruppen erreichten jedoch keine statistische Signifikanz. Die Vorzüge der von uns gewählten RT-qPCR-Methode liegen in der hohen Sensitivität der Methode. Demnach zeigen die Ergebnisse zuverlässig an, dass A20-mRNA im Nierengewebe in allen 3 Subgruppen exprimiert wird. Die relative Quantifizierung reduziert zudem die Varianz der Expressionsanalyse (108). Einschränkungen der Aussagekraft ergeben sich allerdings durch die geringe Kollektivgröße von  $n = 15$  und die nochmals niedrigeren Fallzahlen von  $n = 3, 4$  und  $8$  in den jeweiligen Subgruppen. Die Ergebnisse lassen daher nur eine deskriptive Bewertung zu. Außerdem könnte es im Rahmen des Entparaffinierungsprozesses zu einem mRNA-Verlust gekommen sein, wodurch die mRNA-Expression in unserer Studie eher falsch erniedrigt, als falsch erhöht ausfiele. Auch bleibt durch Bestimmung der Gesamt-mRNA-Expression letztlich unklar, aus welchen Zellen die mRNA stammt. Es wäre wünschenswert, wenn zukünftige Untersuchungen unterschieden, ob die mRNA von Tubulusepithelzellen, glomerulären Infiltraten, intrarenalen Infiltraten oder Endothelzellen exprimiert wurde.

##### 5.3.1.2 IHC: A20-Proteinexpression im Transplantatnierengewebe

Im nächsten Schritt sollte die Frage geklärt werden, ob signifikante Unterschiede in der intrarenalen A20-Expression auf Proteinebene bei Patienten mit und ohne Abstoßungsreaktion bestehen. Einerseits war das Protein A20 in Tubulusepithelzellen nachweisbar. Andererseits zeigte sich die A20-Expression auf Proteinebene in intrarenalen Infiltraten bei Patienten mit Abstoßungsreaktion signifikant erhöht im Vergleich zu Patienten ohne Abstoßungsreaktion.

Im Gegensatz zu den Ergebnissen der RT-qPCR ermöglichte es uns die Immunhistochemie, das Protein

A20 im analysierten Gewebeabschnitt genau zu lokalisieren. So war eine unterschiedliche Verteilung in intrarenalen Infiltraten und Tubulusepithelzellen auszumachen. Zudem ist unsere Studie mit einer Kollektivgröße von  $n = 38$  die bisher größte im Vergleich zu weiteren Studien, welche die A20-Expression immunhistochemisch im humanen Nierengewebe bestimmten (5, 36). Als Nachteile dieser Methode sind die Abhängigkeit der Ergebnisse von der Untersucherkompetenz sowie die nicht auszuschließende Beeinflussung durch unkontrollierte Faktoren wie Belichtung und den ausgewählten Präparateausschnitt zu nennen.

### 5.3.2 Diskussion der Ergebnisse

Insgesamt existieren nur wenige Studien, welche die A20-Expression am humanen Transplantatnierengewebe untersuchten.

Die immunhistochemischen Ergebnisse der vorliegenden Studie stützen die Erkenntnisse der Pilotstudie unserer Arbeitsgruppe, in der ebenfalls eine signifikant vermehrte A20-Expression in intrarenalen Infiltraten bei Patienten mit Abstoßungsreaktion nachweisbar war (5). Sie ergänzt um ein größeres Kollektiv, wodurch die Reliabilität der Ergebnisse verbessert wird. Auch Avihingsanon et al. wählten einen ähnlichen Versuchsaufbau, indem sie Transplantatnierenbiopsien bei Patienten mit und ohne Abstoßungsreaktion auf A20-Gesamt-mRNA-Expression und immunhistochemisch auf A20-Proteinexpression untersuchten (36). Im Gegensatz zu unseren Ergebnissen, deckten sich bei Avihingsanon et al. die Ergebnisse auf transkriptioneller und auf Proteinebene. Weder auf mRNA- noch auf Proteinebene war A20 bei Abwesenheit einer Abstoßungsreaktion nachweisbar. Im Falle einer Abstoßungsreaktion kam es jedoch zu einem Anstieg der Expression, die bei akuten Abstoßungsreaktionen signifikant stärker ausgeprägt war als bei chronischen (36). Bezüglich der Diskrepanz zwischen der A20-Expression auf transkriptioneller und auf Proteinebene in der vorliegenden Studie ist daher nochmals auf die geringe Kollektivgröße des zur PCR verwendeten Materials zu verweisen, wodurch unsere PCR-Ergebnisse weniger zuverlässig sind. Eine Folgestudie am humanen Transplantatnierengewebe von Avihingsanon sollte untersuchen, ob Zusammenhänge zwischen der A20-Gesamt-mRNA-Expression im Transplantatnierengewebe 15 Minuten nach Nierentransplantation und der Entwicklung einer verzögerten Transplantatfunktion oder einer Abstoßungsreaktionen bestehen (109). Mit zunehmender A20-mRNA-Expression stieg das Risiko einer verzögerten Transplantatfunktion, nicht jedoch das einer Abstoßungsreaktion (109). In der Zusammenschau weisen all diese Ergebnisse auf eine kurzfristige protektive Induktion von A20 als Ausdruck akuter Transplantatschädigung unterschiedlichster Genese hin und sprechen für einen unmittelbaren Anstieg der A20-Expression im Rahmen akuter Abstoßungsreaktionen.

Zusammenfassend untermauern die Ergebnisse der Untersuchungen am Transplantatnierengewebe die Hypothese, dass A20 im Rahmen von Abstoßungsreaktionen im humanen Transplantatnierengewebe verstärkt exprimiert wird, um eine Inhibition der inflammatorischen Signalwege zu verstärken. Zur genaueren Beurteilung der Funktion und Expression von A20 im Rahmen anderer Formen der renalen Gewebeschädigung bleiben weitere Studien abzuwarten.

## 6 Zusammenfassung

Die Nierentransplantation ist die erfolgsversprechendste Therapieoption für Patienten mit chronischer Niereninsuffizienz im Stadium 5. Dennoch besteht nach Transplantation ein Risiko, das Transplantat durch akute oder chronisch vermittelte immunologische Schädigung vorzeitig zu verlieren (2, 3). Das Protein A20, ein zentraler Inhibitor des Transkriptionsfaktors NF $\kappa$ B, beeinflusst eine Vielzahl immunologischer Signalkaskaden (4). Erste Untersuchungen legen eine Assoziation zwischen der Expression von A20 und dem Ausmaß immunologischer Transplantatschädigung nahe (5). Dennoch ist die Funktion von A20 im Kontext der chronischen Niereninsuffizienz, der Dialyse und der Nierentransplantation noch weitgehend unklar. Ziel dieser Studie war es daher, die Funktion des Proteins A20 vor und im Verlauf nach Nierentransplantation in zirkulierenden und intrarenalen Zellen anhand eines repräsentativen Studienkollektivs näher zu beleuchten.

Insgesamt wies das Studienkollektiv in Bezug auf die Alters- und Geschlechterverteilung, das Verhältnis von Leichennierentransplantationen und Lebendnierenspenden, die nephrologische Grunderkrankung, kardiovaskuläre Risikofaktoren, Ischämiezeiten und Komplikationen nach Nierentransplantation große Ähnlichkeit mit der Gesamtheit der Nierentransplantierten in Deutschland auf. In der FACS-Analyse zeigte sich eine signifikant vermehrte A20-Expression in CD3+, CD4+, CD19+ und CD11b+ Zellen von Transplantierten und Dialysepatienten im Vergleich zu Gesunden. Patienten, die innerhalb des ersten Jahres nach Nierentransplantation eine Abstoßungsreaktion erlitten, exprimierten signifikant vermehrt A20 in CD4+ Zellen verglichen mit Patienten ohne Abstoßungsreaktion. In Bezug auf die nephrologische Grunderkrankung war die A20-Expression bei Patienten mit diabetischer Nephropathie in allen 4 Zellreihen signifikant vermindert im Vergleich zur Subgruppe mit der höchsten A20-Expressionsrate. Die Korrelationsanalyse erbrachte in Bezug auf die T-Zellen positive Korrelationen zwischen der A20-Positivität in CD3+ Zellen und dem Patientenalter sowie der A20-Positivität in CD3+ Zellen 4 bis 7 Tage nach Transplantation und dem Kreatininwert. In der Subpopulation der CD4+ Zellen war die A20-Positivität positiv mit der warmen Ischämiezeit sowie der Thrombozytenzahl korreliert. Bezüglich der A20-Positivität in B-Zellen und dem Hämoglobinwert bestand eine negative Korrelation. Im intrarenalen Transplantatnierengewebe konnte A20 sowohl auf mRNA-Ebene als auch auf Proteinebene erfolgreich nachgewiesen werden. Die A20-mRNA-Gesamtexpression wies keine signifikanten Unterschiede bei Patienten mit, ohne und nach stattgehabter Abstoßungsreaktion auf. Immunhistochemisch war A20 sowohl in Tubulusepithelzellen als auch in intrarenalen Infiltraten nachweisbar. Auf Proteinebene zeigte sich die A20-Expression in intrarenalen Infiltraten bei Vorliegen einer Abstoßungsreaktion signifikant vermehrt im Vergleich zu Patienten ohne Abstoßungsreaktion.

Die Ergebnisse legen nahe, dass eine verstärkte A20-Expression in zirkulierenden T-Zellen auf ein erhöhtes Abstoßungsrisiko hindeutet. Auch in intrarenalen Infiltraten wird A20 bei Abstoßungsreaktionen induziert. Eine Induktion von A20 in diesen intrarenalen und zirkulierenden Zellen bei drohenden oder vorliegenden Abstoßungsreaktionen könnte daher ein Kompensationsmechanismus sein, durch den abstoßungsbedingte Gewebeschädigung begrenzt wird. A20 kann daher weiterhin als möglicher Biomarker einer Abstoßungsreaktion betrachtet werden. Bevor A20 als sicherer und unabhängiger Biomarker einer Abstoßungsreaktion in der klinischen Betreuung von Patienten nach Nierentransplantation eingesetzt werden kann, müssen zunächst jedoch Einflüsse der nephrologischen Grunderkrankung und nicht-immunologischer Transplantatschädigungsmechanismen auf die A20-Expression geklärt werden. Hierzu bleiben weitere Studien abzuwarten.

## 7 Literaturverzeichnis

1. Kidney Disease: Improving Global Outcomes (KDIGO) Transplant Work Group. KDIGO clinical practice guideline for the care of kidney transplant recipients. *American journal of transplantation : official journal of the American Society of Transplantation and the American Society of Transplant Surgeons*. 2009;9 Suppl 3:S1-155.
2. Cardinal H, Dieude M, Hebert MJ. The Emerging Importance of Non-HLA Autoantibodies in Kidney Transplant Complications. *Journal of the American Society of Nephrology : JASN*. 2017;28(2):400-6.
3. Wekerle T, Segev D, Lechler R, Oberbauer R. Strategies for long-term preservation of kidney graft function. *Lancet (London, England)*. 2017;389(10084):2152-62.
4. Ma A, Malynn BA. A20: linking a complex regulator of ubiquitylation to immunity and human disease. *Nature reviews Immunology*. 2012;12(11):774-85.
5. Dietrich T. Untersuchung des entzündungsregulierenden Zinkfingerproteins A20 im Verlauf nach Nierentransplantation [Dissertation]. Mainz: Universität; 2019.
6. Dixit VM, Green S, Sarma V, Holzman LB, Wolf FW, O'Rourke K, et al. Tumor Necrosis Factor- $\alpha$  Induction of Novel Gene Products in Human Endothelial Cells Including a Macrophage-specific Chemotaxin. *The Journal of biological chemistry*. 1990;265(5):2973-8.
7. Krikos A, Laherty CD, Dixit VM. Transcriptional activation of the tumor necrosis factor  $\alpha$ -inducible zinc finger protein, A20, is mediated by kappa B elements. *The Journal of biological chemistry*. 1992;267(25):17971-6.
8. Cooper JT, Stroka DM, Brostjan C, Palmetshofer A, Bach FH, Ferran C. A20 blocks endothelial cell activation through a NF-kappaB-dependent mechanism. *The Journal of biological chemistry*. 1996;271(30):18068-73.
9. Lee EG, Boone DL, Chai S, Libby SL, Chien M, Lodolce JP, et al. Failure to regulate TNF-induced NF-kappaB and cell death responses in A20-deficient mice. *Science*. 2000;289(5488):2350-4.
10. Das T, Chen Z, Hendriks RW, Kool M. A20/Tumor Necrosis Factor  $\alpha$ -Induced Protein 3 in Immune Cells Controls Development of

Autoinflammation and Autoimmunity: Lessons from Mouse Models. *Frontiers in immunology*. 2018;9:104.

11. Zhou Q, Wang HY, Schwartz DM, Stoffels M, Park YH, Zhang Y, et al. Loss-of-function mutations in TNFAIP3 leading to A20 haploinsufficiency cause an early-onset autoinflammatory disease. *Nature Genetics*. 2016;48(1):67-75.

12. Majumdar I, Paul J. The deubiquitinase A20 in immunopathology of autoimmune diseases. *Autoimmunity*. 2014;47(5):307-19.

13. Takai C, Matsumoto I, Inoue A, Umeda N, Tanaka Y, Kurashima Y, et al. Specific overexpression of tumour necrosis factor- $\alpha$ -induced protein (TNFAIP)9 in CD14(+) CD16(-) monocytes in patients with rheumatoid arthritis: comparative analysis with TNFAIP3. *Clinical and experimental immunology*. 2015;180(3):458-66.

14. Momtazi G, Lambrecht BN, Naranjo JR, Schock BC. Regulators of A20 (TNFAIP3): new drug-able targets in inflammation. *American journal of physiology Lung cellular and molecular physiology*. 2019;316(3):L456-L69.

15. Yuk JM, Kim TS, Kim SY, Lee HM, Han J, Dufour CR, et al. Orphan Nuclear Receptor ERR  $\alpha$  Controls Macrophage Metabolic Signaling and A20 Expression to Negatively Regulate TLR-Induced Inflammation. *Immunity*. 2015;43(1):80-91.

16. Aksentijevich I, Zhou Q. NF- $\kappa$ B Pathway in Autoinflammatory Diseases: Dysregulation of Protein Modifications by Ubiquitin Defines a New Category of Autoinflammatory Diseases. *Frontiers in immunology*. 2017;8(399):1-11.

17. Zammit NW, Siggs OM, Gray PE, Horikawa K, Langley DB, Walters SN, et al. Denisovan, modern human and mouse TNFAIP3 alleles tune A20 phosphorylation and immunity. *Nat Immunol*. 2019;20(10):1299-310.

18. Martens A, van Loo G. A20 phosphorylation controls A20 function. *Nat Immunol*. 2019;20(10):1261-2.

19. Catrysse L, Vereecke L, Beyaert R, van Loo G. A20 in inflammation and autoimmunity. *Trends Immunol*. 2014;35(1):22-31.

20. Mussbacher M, Salzmann M, Brostjan C, Hoesel B, Schoergenhofer C, Datler H, et al. Cell Type-Specific Roles of NF- $\kappa$ B

Linking Inflammation and Thrombosis. *Frontiers in immunology*. 2019;10(85):1-31.

21. Newton R, Shah S, Altonsy MO, Gerber AN. Glucocorticoid and cytokine crosstalk: Feedback, feedforward, and co-regulatory interactions determine repression or resistance. *The Journal of biological chemistry*. 2017;292(17):7163-72.

22. Liu J, Zhu L, Xie GL, Bao JF, Yu Q. Let-7 miRNAs Modulate the Activation of NF-kappaB by Targeting TNFAIP3 and Are Involved in the Pathogenesis of Lupus Nephritis. *PloS one*. 2015;10(6):1-11.

23. Kim SW, Ramasamy K, Bouamar H, Lin AP, Jiang D, Aguiar RC. MicroRNAs miR-125a and miR-125b constitutively activate the NF-kappaB pathway by targeting the tumor necrosis factor alpha-induced protein 3 (TNFAIP3, A20). *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2012;109(20):7865-70.

24. Hutti JE, Turk BE, Asara JM, Ma A, Cantley LC, Abbott DW. IkappaB kinase beta phosphorylates the K63 deubiquitinase A20 to cause feedback inhibition of the NF-kappaB pathway. *Molecular and cellular biology*. 2007;27(21):7451-61.

25. Shrikhande GV, Scali ST, da Silva CG, Damrauer SM, Csizmadia E, Putheti P, et al. O-glycosylation regulates ubiquitination and degradation of the anti-inflammatory protein A20 to accelerate atherosclerosis in diabetic ApoE-null mice. *PloS one*. 2010;5(12):e14240.

26. Giordano M, Roncagalli R, Bourdely P, Chasson L, Buferne M, Yamasaki S, et al. The tumor necrosis factor alpha-induced protein 3 (TNFAIP3, A20) imposes a brake on antitumor activity of CD8 T cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2014;111(30):11115-20.

27. Onizawa M, Oshima S, Schulze-Topphoff U, Oses-Prieto JA, Lu T, Tavares R, et al. The ubiquitin-modifying enzyme A20 restricts ubiquitination of the kinase RIPK3 and protects cells from necroptosis. *Nat Immunol*. 2015;16(6):618-29.

28. Matsuzawa Y, Oshima S, Takahara M, Maeyashiki C, Nemoto Y, Kobayashi M, et al. TNFAIP3 promotes survival of CD4 T cells by restricting MTOR and promoting autophagy. *Autophagy*. 2015;11(7):1052-62.

29. Tavares RM, Turer EE, Liu CL, Advincula R, Scapini P, Rhee L, et al. The ubiquitin modifying enzyme A20 restricts B cell survival and prevents autoimmunity. *Immunity*. 2010;33(2):181-91.
30. Hövelmeyer N, Reissig S, Xuan NT, Adams-Quack P, Lukas D, Nikolaev A, et al. A20 deficiency in B cells enhances B-cell proliferation and results in the development of autoantibodies. *European journal of immunology*. 2011;41(3):595-601.
31. Chu Y, Vahl JC, Kumar D, Heger K, Bertossi A, Wojtowicz E, et al. B cells lacking the tumor suppressor TNFAIP3/A20 display impaired differentiation and hyperactivation and cause inflammation and autoimmunity in aged mice. *Blood*. 2011;117(7):2227-36.
32. Lutz J, Luong LA, Strobl M, Deng M, Huang H, Anton M, et al. The A20 gene protects kidneys from ischaemia/reperfusion injury by suppressing pro-inflammatory activation. *Journal of molecular medicine (Berlin, Germany)*. 2008;86(12):1329-39.
33. Yang Z, Zhong Z, Li M, Xiong Y, Wang Y, Peng G, et al. Hypothermic machine perfusion increases A20 expression which protects renal cells against ischemia/reperfusion injury by suppressing inflammation, apoptosis and necroptosis. *International journal of molecular medicine*. 2016;38(1):161-71.
34. Won M, Park KA, Byun HS, Sohn KC, Kim YR, Jeon J, et al. Novel anti-apoptotic mechanism of A20 through targeting ASK1 to suppress TNF-induced JNK activation. *Cell death and differentiation*. 2010;17(12):1830-41.
35. Li ZL, Lv LL, Tang TT, Wang B, Feng Y, Zhou LT, et al. HIF-1alpha inducing exosomal microRNA-23a expression mediates the cross-talk between tubular epithelial cells and macrophages in tubulointerstitial inflammation. *Kidney international*. 2019;95(2):388-404.
36. Avihingsanon Y, Ma N, Csizmadia E, Wang C, Pavlakis M, Giraldo M, et al. Expression of protective genes in human renal allografts: a regulatory response to injury associated with graft rejection. *Transplantation*. 2002;73(7):1079-85.
37. Bodonyi-Kovacs G, Strom TB, Putheti P. A20—A Biomarker of Allograft Outcome: A Showcase in Kidney Transplantation. In: Ferran C, editor. *The Multiple Therapeutic Targets of A20*. New York, NY: Springer New York; 2014. p. 103-16.

38. Kunter U, Floege J, von Jürgensonn AS, Stojanovic T, Merkel S, Gröne HJ, et al. Expression of A20 in the vessel wall of rat-kidney allografts correlates with protection from transplant arteriosclerosis. *Transplantation*. 2003;75(1):3-9.
39. Teng D, Lu Y, Gao R, Xin Y, Cao G, Li X, et al. Conversion from cyclosporine to mycophenolate mofetil improves expression of A20 in the rat kidney allografts undergoing chronic rejection. *Transplantation proceedings*. 2006;38(7):2164-7.
40. Yang J, Xu MQ, Yan LN, Chen XB, Liu J. Zinc finger protein A20 protects rats against chronic liver allograft dysfunction. *World journal of gastroenterology*. 2012;18(27):3537-50.
41. Souza AI, Felkin LE, McCormack AM, Holder A, Barton PJ, Banner NR, et al. Sequential expression of three known protective genes in cardiac biopsies after transplantation. *Transplantation*. 2005;79(5):584-90.
42. Siracuse JJ, Fisher MD, da Silva CG, Peterson CR, Csizmadia E, Moll HP, et al. A20-mediated modulation of inflammatory and immune responses in aortic allografts and development of transplant arteriosclerosis. *Transplantation*. 2012;93(4):373-82.
43. Moll HP, Lee A, Peterson CR, Revuelta Cervantes J, Wojcik BM, Parulkar A, et al. A20 Haploinsufficiency Aggravates Transplant Arteriosclerosis in Mouse Vascular Allografts: Implications for Clinical Transplantation. *Transplantation*. 2016;100(11):106-16.
44. Reinold J, Rohn H, Witzke O, Feldkamp T. Vermeidung und Behandlung von T-Zell- und antikörpervermittelter Abstoßung. *Der Nephrologe*. 2018;13(3):154-60.
45. Murphy K, Weaver C. *Janeway Immunologie* [E-Book]. 9th ed. Berlin: Springer Spektrum; 2018.
46. Bröker B, Schütt C, Fleischer B. *Grundwissen Immunologie* [E-Book]. 4th ed. Berlin: Springer Spektrum; 2019.
47. Kuhlmann U, Böhler J, Luft FC, Alscher M, Kunzendorf U. *Nephrologie : Pathophysiologie, Klinik, Nierenersatzverfahren*. 6th ed. Stuttgart: Thieme; 2015.
48. Pabon MA, Navarro CE, Martin R, Rodriguez M, Martin I, Gaitan L, et al. Minor histocompatibility antigens as risk factor for poor

- prognosis in kidney transplantation. *Transplantation proceedings*. 2011;43(9):3319-23.
49. Zhang R. Donor-Specific Antibodies in Kidney Transplant Recipients. *Clinical journal of the American Society of Nephrology : CJASN*. 2018;13(1):182-92.
50. Reynolds BC, Tinckam KJ. Sensitization assessment before kidney transplantation. *Transplantation reviews (Orlando, Fla)*. 2017;31(1):18-28.
51. Biglarnia AR, Huber-Lang M, Mohlin C, Ekdahl KN, Nilsson B. The multifaceted role of complement in kidney transplantation. *Nature reviews Nephrology*. 2018;14(12):767-81.
52. The European Renal Best Practice (ERBP) Transplantation Guideline Development Group, Abramowicz D, Cochat P, Claas F, Dudley C, Harden P, et al. ERBP Guideline on the Management and Evaluation of the Kidney Donor and Recipient. *Nephrology, dialysis, transplantation : official publication of the European Dialysis and Transplant Association - European Renal Association*. 2013;28:ii1-71.
53. Pratschke J, Dragun D, Hauser IA, Horn S, Mueller TF, Schemmer P, et al. Immunological risk assessment: The key to individualized immunosuppression after kidney transplantation. *Transplant Rev*. 2016;30(2):77-84.
54. Mannon RB, Askar M, Jackson AM, Newell K, Mengel M. Meeting report of the STAR-Sensitization in Transplantation Assessment of Risk: Naive Abdominal Transplant Organ subgroup focus on kidney transplantation. *American journal of transplantation : official journal of the American Society of Transplantation and the American Society of Transplant Surgeons*. 2018;18(9):2120-34.
55. Lefaucheur C, Viglietti D, Mangiola M, Loupy A, Zeevi A. From Humoral Theory to Performant Risk Stratification in Kidney Transplantation. *Journal of immunology research*. 2017;2017:5201098.
56. Eurotransplant International Foundation. Eurotransplant Manual Chapter 4: Kidney (ETKAS and ESP) [eurotransplant.org, Version 8.2, last update: 19.11.2019] 2019 [cited 28.04.2020. Available from: <http://www.eurotransplant.org/wp-content/uploads/2020/01/H4-Kidney.pdf>.

57. Eurotransplant International Foundation. Eurotransplant Manual Chapter 10: Histocompatibility Testing [eurotransplant.org, Version 4.6, last update: 10.02.2020] 2020 [cited 28.04.2020. Available from: <http://www.eurotransplant.org/wp-content/uploads/2020/01/H10-Histocompatibility-v4.6.pdf>].
58. Alessandrini A, Turka LA. FOXP3-Positive Regulatory T Cells and Kidney Allograft Tolerance. *American journal of kidney diseases : the official journal of the National Kidney Foundation*. 2017;69(5):667-74.
59. Martin-Moreno PL, Tripathi S, Chandraker A. Regulatory T Cells and Kidney Transplantation. *Clinical journal of the American Society of Nephrology : CJASN*. 2018;13(11):1760-4.
60. Haas M, Loupy A, Lefaucheur C, Roufosse C, Glotz D, Seron D, et al. The Banff 2017 Kidney Meeting Report: Revised diagnostic criteria for chronic active T cell-mediated rejection, antibody-mediated rejection, and prospects for integrative endpoints for next-generation clinical trials. *American journal of transplantation : official journal of the American Society of Transplantation and the American Society of Transplant Surgeons*. 2018;18(2):293-307.
61. Haas M. The relationship between pathologic lesions of active and chronic antibody-mediated rejection in renal allografts. *American journal of transplantation : official journal of the American Society of Transplantation and the American Society of Transplant Surgeons*. 2018;18(12):2849-56.
62. Mühlfeld A. Nierentransplantation: Rejektion. In: Lehnert H, Schellong SM, Mössner J, Sieber CC, Swoboda W, Neubauer A, et al., editors. *DGIM Innere Medizin*. Berlin: Springer; 2015. p. 1-7.
63. Lutz J, Sollinger D, Weinmann-Menke J, Rieke A, Schamberger B. Nachsorge nach Nierentransplantation. *Der Nephrologe*. 2018;13(3):167-72.
64. Mannon RB. Delayed Graft Function: The AKI of Kidney Transplantation. *Nephron*. 2018;140(2):94-8.
65. Nankivell BJ, Kuypers DR. Diagnosis and prevention of chronic kidney allograft loss. *Lancet (London, England)*. 2011;378(9800):1428-37.

66. Fachinfo-Service. Fachinformation MabThera® i.v. [fachinfo.de, last update: 03/2020] 2020 [cited 28.04.2020. Available from: <https://www.fachinfo.de/api/fachinfo/pdf/002730>].
67. Fachinfo-Service. Fachinformation Simulect® [fachinfo.de, last update: 04/2018] 2018 [cited 28.04.2020. Available from: <https://www.fachinfo.de/api/fachinfo/pdf/003282>].
68. Fachinfo-Service. Fachinformation Thymoglobuline® 5mg/ml [fachinfo.de, last update: 04/2019] 2019 [cited 28.04.2020. Available from: <https://www.fachinfo.de/api/fachinfo/pdf/006337>].
69. Sanofi. Thymoglobulin® May Suppress the Immune Response Through Multiple Pathways [thymoglobulin.com, last update: 03/2018] 2018 [cited 28.04.2020. Available from: <https://www.thymoglobulin.com/about#seeHowItWorks>].
70. Fachinfo-Service. Fachinformation Lemtrada® 12mg [fachinfo.de, last update: 01/2020] 2020 [cited 28.04.2020. Available from: <https://www.fachinfo.de/api/fachinfo/pdf/014861>].
71. Heemann U, Abramowicz D, Spasovski G, Vanholder R. Endorsement of the Kidney Disease Improving Global Outcomes (KDIGO) guidelines on kidney transplantation: a European Renal Best Practice (ERBP) position statement. Nephrology, dialysis, transplantation : official publication of the European Dialysis and Transplant Association - European Renal Association. 2011;26(7):2099-106.
72. Haller MC, Royuela A, Nagler EV, Pascual J, Webster AC. Steroid avoidance or withdrawal for kidney transplant recipients. The Cochrane database of systematic reviews. 2016(8):Cd005632.
73. Sack U. Zelluläre Diagnostik und Therapie [E-Book]. Berlin: De Gruyter; 2015.
74. QIAGEN. RNeasy FFPE Handbook: For purification of total RNA from formalin-fixed, paraffin-embedded tissue sections [E-Book]. Hilden: QIAGEN; 2020. Available from: <https://www.qiagen.com/us/products/discovery-and-translational-research/dna-rna-purification/rna-purification/total-rna/rneasy-ffpe-kit/>.
75. Müller H-J, Prange DR. PCR - Polymerase-Kettenreaktion. 2nd ed. Berlin: Springer Spektrum; 2016.

76. QIAGEN. QuantiTect SYBR-Green RT-PCR Handbook: For quantitative, real-time one-step RT-PCR using SYBR Green I [E-Book]. Hilden: QIAGEN; 2011. Available from: <https://www.qiagen.com/de/products/discovery-and-translational-research/pcr-qpcr-dpcr/real-time-pcr-enzymes-and-kits/probe-based-one-step-qrt-pcr/quantitect-rt-pcr-kits/>.
77. Hsu SM, Raine L, Fanger H. Use of avidin-biotin-peroxidase complex (ABC) in immunoperoxidase techniques: a comparison between ABC and unlabeled antibody (PAP) procedures. The journal of histochemistry and cytochemistry : official journal of the Histochemistry Society. 1981;29(4):577-80.
78. Bratthauer GL. The Avidin-Biotin Complex(ABC) Method and Other Avidin-Biotin Binding Methods. In: Oliver C, Jamur MC, editors. Immunocytochemical Methods and Protocols. 3rd ed. New York: Humana Press; 2010. p. 175-84.
79. Deutsche Stiftung Organtransplantation. Tätigkeitsbericht 2019 - Niere - des Transplantationszentrums Universitätsklinikum Mainz [dso.de, last update: 06/2020] 2020 [cited 29.08.2021. Available from: <https://www.dso.de/BerichteTransplantationszentren/Mainz%20Niere%202019.pdf>.
80. Deutsche Stiftung Organtransplantation. DSO Jahresbericht Organspende und Transplantation in Deutschland 2020 [dso.de, last update: 04/2021] 2021 [cited 29.08.2021. Available from: <https://dso.de/SiteCollectionDocuments/DSO-Jahresbericht%202020.pdf>.
81. Neale J, Smith AC. Cardiovascular risk factors following renal transplant. World journal of transplantation. 2015;5(4):183-95.
82. Rysz J, Franczyk B, Radek M, Ciałkowska-Rysz A, Gluba-Brzózka A. Diabetes and Cardiovascular Risk in Renal Transplant Patients. International journal of molecular sciences. 2021;22(7):1-39.
83. van der Vliet JA, Warlé MC, Cheung CL, Teerenstra S, Hoitsma AJ. Influence of prolonged cold ischemia in renal transplantation. Clinical transplantation. 2011;25(6):E612-6.
84. Stöhr J. Outcome der Nierentransplantationen an der Universitätsmedizin Mainz in den Jahren 2005 bis 2017 [Dissertation]. Mainz: Universität; 2020.

85. Ramos-Barron MA, Hernandez Bejarano I, Rodrigo E, Cruz Iglesias E, Benito Hernandez A, Agueros Blanco C, et al. Assessment of Kidney Graft Function Evolution Measured by Creatinine and Cystatin C. *Transplantation proceedings*. 2016;48(9):2913-6.
86. Nielsen MB, Krogstrup NV, Oltean M, Nieuwenhuijs-Moeke GJ, Dor F, Birn H, et al. Remote ischaemic conditioning and early changes in plasma creatinine as markers of one year kidney graft function-A follow-up of the CONTEXT study. *PloS one*. 2019;14(12):e0226882.
87. Cueto-Manzano AM, Morales-Buenrostro LE, González-Espinoza L, González-Tableros N, Martín-del-Campo F, Correa-Rotter R, et al. Markers of inflammation before and after renal transplantation. *Transplantation*. 2005;80(1):47-51.
88. Webster AC, Wu S, Tallapragada K, Park MY, Chapman JR, Carr SJ. Polyclonal and monoclonal antibodies for treating acute rejection episodes in kidney transplant recipients. *The Cochrane database of systematic reviews*. 2017;7(7):Cd004756.
89. Foroutan F, Friesen EL, Clark KE, Motaghi S, Zyla R, Lee Y, et al. Risk Factors for 1-Year Graft Loss After Kidney Transplantation: Systematic Review and Meta-Analysis. *Clinical journal of the American Society of Nephrology : CJASN*. 2019;14(11):1642-50.
90. Kramer CSM, Roelen DL, Heidt S, Claas FHJ. Defining the immunogenicity and antigenicity of HLA epitopes is crucial for optimal epitope matching in clinical renal transplantation. *Hla*. 2017;90(1):5-16.
91. De Keyzer K, Van Laecke S, Peeters P, Vanholder R. Human cytomegalovirus and kidney transplantation: a clinician's update. *American journal of kidney diseases : the official journal of the National Kidney Foundation*. 2011;58(1):118-26.
92. Egli A, Binggeli S, Bodaghi S, Dumoulin A, Funk GA, Khanna N, et al. Cytomegalovirus and polyomavirus BK posttransplant. *Nephrology, dialysis, transplantation : official publication of the European Dialysis and Transplant Association - European Renal Association*. 2007;22 Suppl 8:viii72-viii82.
93. Mallat SG, Tanios BY, Itani HS, Lotfi T, McMullan C, Gabardi S, et al. CMV and BKPyV Infections in Renal Transplant Recipients Receiving an mTOR Inhibitor-Based Regimen Versus a CNI-Based Regimen: A

Systematic Review and Meta-Analysis of Randomized, Controlled Trials. *Clinical journal of the American Society of Nephrology : CJASN*. 2017;12(8):1321-36.

94. Hachem LD, Ghanekar A, Selzner M, Famure O, Li Y, Kim SJ. Postoperative surgical-site hemorrhage after kidney transplantation: incidence, risk factors, and outcomes. *Transplant international : official journal of the European Society for Organ Transplantation*. 2017;30(5):474-83.

95. Golriz M, Klauss M, Zeier M, Mehrabi A. Prevention and management of lymphocele formation following kidney transplantation. *Transplantation reviews (Orlando, Fla)*. 2017;31(2):100-5.

96. Cobo G, Lindholm B, Stenvinkel P. Chronic inflammation in end-stage renal disease and dialysis. *Nephrology, dialysis, transplantation : official publication of the European Dialysis and Transplant Association - European Renal Association*. 2018;33(Suppl 3):iii35-iii40.

97. Kwan T, Chadban SJ, Ma J, Bao S, Alexander SI, Wu H. IL-17 deficiency attenuates allograft injury and prolongs survival in a murine model of fully MHC-mismatched renal allograft transplantation. *American journal of transplantation : official journal of the American Society of Transplantation and the American Society of Transplant Surgeons*. 2015;15(6):1555-67.

98. Stenvinkel P, Ketteler M, Johnson RJ, Lindholm B, Pecoits-Filho R, Riella M, et al. IL-10, IL-6, and TNF-alpha: central factors in the altered cytokine network of uremia--the good, the bad, and the ugly. *Kidney international*. 2005;67(4):1216-33.

99. Lee HJ, Kim TH, Kang SW, Kim YH, Kim SK, Chung JH, et al. Association Interleukin-4 and Interleukin-4 Receptor Gene Polymorphism and Acute Rejection and Graft Dysfunction After Kidney Transplantation. *Transplantation proceedings*. 2016;48(3):813-9.

100. Amirzargar M, Yavangi M, Basiri A, Moghadam SH, Khosravi F, Solgi G, et al. Genetic association of interleukin-4, interleukin-10, and transforming growth factor-beta gene polymorphism with allograft function in renal transplant patients. *Transplantation proceedings*. 2007;39(4):954-7.

101. Li D, Wang L, Fan Y, Song L, Guo C, Zhu F, et al. Down-regulation of A20 mRNA expression in peripheral blood mononuclear cells from patients with systemic lupus erythematosus. *Journal of clinical immunology*. 2012;32(6):1287-91.
102. Cheng L, Zhang D, Jiang Y, Deng W, Wu Q, Jiang X, et al. Decreased A20 mRNA and protein expression in peripheral blood mononuclear cells in patients with type 2 diabetes and latent autoimmune diabetes in adults. *Diabetes research and clinical practice*. 2014;106(3):611-6.
103. Zhang L, Yao Y, Tian J, Jiang W, Zhou S, Chen J, et al. Alterations and abnormal expression of A20 in peripheral monocyte subtypes in patients with rheumatoid arthritis. *Clinical rheumatology*. 2021;40(1):341-8.
104. Jiang X, Tian H, Fan Y, Chen J, Song Y, Wang S, et al. Expression of tumor necrosis factor alpha-induced protein 3 mRNA in peripheral blood mononuclear cells negatively correlates with disease severity in psoriasis vulgaris. *Clinical and vaccine immunology : CVI*. 2012;19(12):1938-42.
105. Fan YC, Zhang YY, Sun YY, Wang N, Xiao XY, Wang K. Altered expression of A20 gene in peripheral blood mononuclear cells is associated with the progression of chronic hepatitis B virus infection. *Oncotarget*. 2016;7(42):68821-32.
106. Lutz P, Jurk P. Platelets in Advanced Chronic Kidney Disease: Two Sides of the Coin. *Seminars in thrombosis and hemostasis*. 2020;46(3):342-56.
107. Lambert MP. Platelets in liver and renal disease. *Hematology American Society of Hematology Education Program*. 2016;2016(1):251-5.
108. Pfaffl MW. Real-time RT-PCR: Neue Ansätze zur exakten mRNA Quantifizierung. *Biospektrum*. 2004;10(1):92-5.
109. Avihingsanon Y, Ma N, Pavlakis M, Chon WJ, Uknis ME, Monaco AP, et al. On the intraoperative molecular status of renal allografts after vascular reperfusion and clinical outcomes. *Journal of the American Society of Nephrology : JASN*. 2005;16(6):1542-8.

## 8 Anhang

### 8.1 Auflistung der verwendeten Materialien

#### 8.1.1 Verwendete Laborgeräte

<b>Laborgerät</b>	<b>Firma</b>
Brutschrank	Thermo Fisher Scientific Inc., USA HERAcell 150i CO <sub>2</sub> Incubator
Einkanal-Pipetten	Eppendorf AG, D „Research“ 0,5 - 10 µl „Research“ 10 - 100 µl „Research“ 100 - 1000 µl
FACSCalibur	Becton-Dickinson, USA
Gefriertruhen	Thermo Fisher Scientific Inc., USA -80°C
Kühlschränke	Liebherr Premium, D Kühl-Gefrier Kombi Gerät
Mikroskop	Carl Zeiss Microscopy GmbH, D Axiophot mit ICS-Optik Kamera: Aciocam MRC
NanoDrop™	Thermo Fisher Scientific Inc., USA
pH-Meter	Wissenschaft-Technische Werkstätten GmbH & Co KG, D Modell inoLab pH Level
Pipetus®	Hirschmann Laborgeräte, D
Sterilbank	Thermo Fisher Scientific Inc., USA MSC Advantage
Thermocycler	Roche Holding, CH LightCycler 480/2, Software 1.5.1
Vortexer	Heidolph Instruments GmbH & Co. KG, D Modell Reax control
Waage	Ohaus Europe GmbH, CH ANALYTICAL Plus
Wasserbad	LAUDA Dr. R. Wobser GmbH & Co. KG Aqualine AL5
Zentrifugen	Thermo Fisher Scientific Inc., USA

### 8.1.2 Verwendete Verbrauchsartikel

<b>Artikel</b>	<b>Art</b>	<b>Firma</b>
Safety-Kanüle	21 G	SARSTEDT AG & Co. KG, D
Combitips	2,5 ml	Eppendorf AG, D
Deckgläser	18 x 14, 24 x 32, 24 x 50	Menzel-Gläser, D
EDTA-Monovetten	9 ml	SARSTEDT AG & Co. KG, D
FACS Röhrchen	5 ml	SARSTEDT AG & Co. KG, D
Gefrier Röhrchen	2 ml	Greiner Bio-One GmbH, D
Glasküvetten		DWK Life Science GmbH, D
Handschuhe	Latex Einmalhandschuhe	Carl Roth GmbH & Co. K, D
Hautantiseptikum	alkoholisch	Schülke & Mayr GmbH, D
Mehrwegpipetten	Research plus 0,5 -10 µl, 10 - 100 µl, 100 -1000 µl	Eppendorf AG, D
Parafilm®	“M” 4 in X 125 Ft. Roll	Pechiney Plastic Packaging Inc., USA
Pipettenspitzen	1000 µl blau, 200 µl gelb, 0,5 - 20 µl weiß	Sarstedt AG & Co., D Eppendorf AG, D
Reaktionsgefäße	Safe-Lock Tubes, 0,5ml	Eppendorf AG, D
Serologische Pipetten	5 ml, 10 ml, 25 ml	Greiner Bio-One GmbH, D
Stauschlauch	autoklavierbar	Prämeta GmbH & Co. KG, D
Tupfer (unsteril)	4 x 5cm	Lohmann & Rauscher GmbH & Co. KG, D
Zentrifugenröhrchen	15 ml, 50 ml	Greiner Bio-One GmbH, D
Multiwell-Platte	6 - Well	Greiner Bio-One GmbH, D
Multiwell-Platte	12 - Well	Greiner Bio-One GmbH, D

### 8.1.3 Verwendete Chemikalien und Reagenzien

<b>Chemikalie/Reagenz</b>	<b>Firma</b>
ABC-Complex Standard	Vector Laboratories Inc., USA
Avidin/Biotin Blocking Kit	Vector Laboratories Inc., USA
Aqua dest.	Fresenius Kabi GmbH, D
BSA	Bovine Serum Albumine, Serva Elektrophoresis GmbH, D
DAB-Färbelösung	3,3'-Diaminobenzidin, Vector Laboratories Inc., USA
Deparaffinization Solution	Qiagen, D, Kat.-Nr. 19093

Desinfektion	Schülke & Mayr GmbH, D
DMSO	Dimethyl Sulfoxide, Sigma-Aldrich Co., D
Ethanol	Honeywell Inc., USA
FC-Block (Human TruStain FcX)	BioLegend, D
FCS	Fetales Kälberserum, Pan - Biotech GmbH, D
Ficoll®	GE Healthcare, USA
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Carl Roth GmbH & Co. K, D
NaN <sub>3</sub>	Merck KGaA, D
Natriumcitrat	Merck KGaA, D
KHCO <sub>3</sub>	Merck KGaA, D
Na <sub>2</sub> EDTA	GERBU Biotechnik GmbH, D
NH <sub>4</sub> Cl	Merck KGaA, D
Mayer's Hämlaunlösung	AppliChem GmbH, D
Methanol	Carl Roth GmbH & Co. KG, D
Permout Mounting Media	Fisher Scientific Inc., USA
PBS	Dulbecco's Phosphate Buffered Saline Sigma-Aldrich, USA
QuantiTect SYBR Green RT-PCR-Kit	Qiagen, Kat.-Nr. 204245
Rabbit Serum (Normal)	DAKO Corporation, USA
RNeasy-FFPE-Kit	Qiagen, D, Kat.-Nr. 73504
RPMI-Medium	Roswell Park Memorial Institute (RPMI)- Medium Gibco™ Invitrogen Corporation, USA
RNase freies Wasser	Qiagen, D
Saponin	Sigma-Aldrich Co., D
Xylol	Carl Roth GmbH & Co. KG, D

#### 8.1.4 Verwendete Puffer und Lösungen

<b>Puffer/Lösung</b>	<b>Zusammensetzung</b>
ACK-Lyse Puffer	Ammoniumchlorid-Kalium Lysepuffer 8,29 g NH <sub>4</sub> Cl (0,15 M) 1 g KHCO <sub>3</sub> (10 mM) 37,2 g Na <sub>2</sub> EDTA (0,1 mM) Die hier angegebene Menge der Salze wird abgewogen. Dann wird durch Titration mit 0,1 molarer HCl der pH-Wert der Lösung auf 7,2 - 7,4 eingestellt. Danach wird die Lösung bis zu einem Volumen von 1000 ml mit destilliertem Wasser aufgefüllt und unter dem sterilen Abzug durch einen 0,2 µm Filter filtriert. Die Lösung wird bei Raumtemperatur verstaut.
Blocking Solution	Methanol 3 % H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>
Blocking Solution	5 % Rabbit Serum (Normal) 10 % BSA in 1 x PBS
Citrat-Puffer	2,94 g Natriumcitrat 1000 ml Aqua dest. Der pH-Wert wird auf 6,0 eingestellt mit 1 molarer HCl
DAB-Färbelösung	2 Tropfen 3,3'-Diaminobenzidin (DAB) 1 Tropfen H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> 1 Tropfen Puffer in 2500 µl Aqua dest.
FACS-Puffer	5 % Fetales Kälberserum (FCS) 0,09 % NaN <sub>3</sub> in PBS (1x)
Fix/Perm Puffer	206,25 ml PBS 12,5 ml 5 % FCS (Fetales Kälberserum) 0,25 g NaN <sub>3</sub> (0,09 %) Zu dieser Fix/Perm Lösung werden 31,25 ml von folgender, bereits vorbereiteter Lösung, gegeben: 32 g Paraformaldehyde (4 % weißes Pulver, nur bei 56°C löslich) in 100 ml PBS, was sich nach 1 - 2 Stunden bei 56 - 60°C auf dem Wärmeschüttler löst. Abschließend werden noch 1,25 g Saponin (0,5 %) dazu gegeben.

Gefriermedium	<p>Roswell Park Memorial Institute (RPMI)-Medium</p> <p>10 % FCS</p> <p>10 % DMSO</p> <p>Unter dem sterilen Abzug werden zu dem RPMI-Medium 10 % FCS und 10 % DMSO gegeben. Die Lösung wird bei 4°C gelagert.</p>
PFA 1 %	<p>1g Paraformaldehyd in 100 ml PBS lösen. Dafür wird die Lösung mithilfe eines Rührfisches für 3 - 4h auf der Heizplatte bei 60°C vermischt bis sie klar wird. Dann lässt man die Lösung abkühlen und stellt sie auf einen pH von 7,4 ein.</p>
Saponin Puffer	<p>237,5 ml PBS (1x)</p> <p>1,25 g Saponin</p> <p>12,5 ml FCS</p> <p>0,25 g NaN<sub>3</sub></p>
Waschpuffer	<p>1000 ml PBS</p> <p>1 g BSA</p>

### 8.1.5 Verwendete Primer

#### Primer

QuantiTect Primer Kit „humanes beta-Actin“

QuantiTect Primer Kit „humanes N2A“

#### Firma

Qiagen, D, Kat.-Nr. QT01680476

Qiagen, D, Kat.-Nr. QT00041853

### 8.1.6 Verwendete Antikörper

#### Antikörper

#### FACS

CD4 FITC

CD11b APC

CD19 APC

CD206 APC

CD4 APC

CD16 FITC

CD14 PE

CD11b PE

CD3 PerCP

A20 FITC (TNFAIP3)

Isotyp FITC/sek. AK (goat anti rabbit IgG Dylight 488)

IL-10 PE (rat anti-human)

Human Th1/Th2/Th17 Phenotyping Kit

Human Th17/Treg Phenotyping Kit

#### IHC

goat anti-human-TNFAIP3 (A20)

Biotinylated rabbit anti-goat

#### Firma

BD Biosciences, USA, Kat.-Nr. 555346

BD Biosciences, USA, Kat.-Nr. 550019

BD Biosciences, USA, Kat.-Nr. 555415

BD Biosciences, USA, Kat.-Nr. 550889

BD Biosciences, USA, Kat.-Nr. 555349

BD Biosciences, USA, Kat.-Nr. 555406

BD Biosciences, USA, Kat.-Nr. 555398

BioLegend, D, Kat.-Nr. 101208

BD Biosciences, USA, Kat.-Nr. 563887

Abcam®, USA, Kat.-Nr. ab 92324

Abcam®, USA, Kat.-Nr. ab 96899

BD Biosciences, USA, Kat.-Nr. 559330

BD Biosciences, USA, Kat.-Nr. 560751

BD Biosciences, USA, c 560762

Abcam®, USA, Kat.-Nr. 111192

Vector Laboratories Inc., USA

Kat.-Nr. BA-5000

## 9 Danksagung

Mein ganz besonderer Dank gilt ... für die Überlassung dieses Themas, die sehr gute Betreuung und die abschließende Begutachtung der Dissertation. Ich bin sehr dankbar für die Anregungen, die Beantwortung von Fragen und die Korrekturvorschläge was die experimentellen Arbeiten im Labor, die Arbeit mit der Datenbank und die statistische Auswertung betraf.

Außerdem danke ich ... für die Bereitschaft, diese Schrift zu begutachten.

Des Weiteren danke ich ..., ..., ... und ... für die Unterstützung bei den experimentellen Arbeiten im Labor.

Ein besonderer Dank gilt ..., die mir das Studium ermöglichten. Ich danke ... und ..., die mich stets unterstützten und motivierten und mir viel Geduld entgegenbrachten. ... danke ich für die Durchsicht dieser Arbeit.

Abschließend danke ich ..., die ich während meiner Zeit in Mainz kennenlernen durfte und durch die das Studium ein ganz besonderer Abschnitt in meinem Leben wurde.

## 10 Tabellarischer Lebenslauf