

**Entwicklung und Evaluation einer quantitativen  
„one-step“ RT-PCR zur Bestimmung von CD103 im Urin**

**Inaugural-Dissertation**

zur

Erlangung des Doktorgrades  
der Hohen Medizinischen Fakultät  
der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität  
Bonn

vorgelegt von

**Christiane Weiß**  
aus Gelsenkirchen

2008

Angefertigt mit Genehmigung der  
Medizinischen Fakultät der Universität Bonn

1. Gutachter: PD Dr. Rainer P. Woitas
2. Gutachter: Prof. Dr. B. Stoffel-Wagner

Tag der Mündlichen Prüfung: 5. Mai 2008

Aus der Medizinischen Klinik und Poliklinik I  
der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn  
Direktor: Prof. Dr. T. Sauerbruch

Diese Dissertation ist auf dem Hochschulschriftenserver der ULB Bonn [http://hss.ulb.uni-bonn.de/diss\\_online](http://hss.ulb.uni-bonn.de/diss_online) elektronisch publiziert.

## **Inhaltsverzeichnis**

1.	Abkürzungsverzeichnis .....	7
2.	Einleitung .....	9
2.1	Allgemeines zur Nierentransplantation .....	9
2.2	Pathophysiologie der Abstossung von Nierentransplantaten.....	9
2.2.1	Der Major Histocompatibility Complex (MHC).....	9
2.2.2	Die Zelluläre Abstossungsreaktion .....	10
2.2.2.1	Antigenerkennung, Aktivierung und Proliferation von T-Zellen.....	11
2.2.2.2	Zytotoxische Mechanismen von aktivierten T-Effektorzellen.....	13
2.2.3	Der Einfluss von Zytokinen und Chemokinen bei der Abstossung von Nierentransplantaten.....	14
2.3	Diagnostik bei Nierentransplantatversagen .....	15
2.3.1	Klinik .....	15
2.3.2	Labor und Mikrobiologie .....	15
2.3.3	Bildgebung .....	16
2.3.4	Nierenpunktion.....	17
2.3.5	Molekularbiologische Methoden .....	17
2.3.6	Zielkonflikt beim Einsatz der diagnostischen Instrumente.....	18
2.4	Die Bedeutung des Integrins CD103 .....	18
2.4.1	Allgemeines zu Integrinen .....	18
2.4.2	Struktur und Expressionsmuster des Integrins alphaE (CD103).....	19
2.4.3	Molekulare Mechanismen nach Ligandenbindung.....	22
2.4.4	Allgemeine Funktionen des Integrins CD103.....	23
2.4.5	Regulation von CD103.....	25
2.4.6	Funktion von CD103 bei Transplantatabstossungsreaktionen.....	26
2.5	Ziele dieser Arbeit .....	28
3.	Material und Methoden .....	30
3.1	Material.....	30
3.1.1	Reagenzien für RNA-Extraktion aus Blut.....	30
3.1.2	Reagenzien für RNA-Extraktion aus Urin .....	30

3.1.3	Reagenzien für in vitro Transkription und Erstellung der Standardreihe .....	30
3.1.4	Reagenzien für realtime RT-PCR am LightCycler .....	30
3.1.5	Reagenzien für Agarosegelelektrophorese.....	31
3.1.6	Sonstiges .....	31
3.1.7	Geräte und Software.....	31
3.1.8	Untersuchungsmaterial.....	32
3.1.8.1	Charakterisierung des Patientenkollektivs .....	32
3.1.8.2	Patientengruppierung.....	33
3.1.8.3	Befundung von Nierenbiopsien: Banff 97 Klassifikation .....	33
3.1.8.4	Befundung von Nierenbiopsien: Immunhistochemie.....	35
3.2	Methoden .....	36
3.2.1	Extraktion von RNA aus PBMC .....	36
3.2.2	Extraktion von Gesamt-RNA aus Urin .....	37
3.2.3	Allgemeines zur PCR.....	39
3.2.4	Allgemeines zur RT-PCR .....	39
3.2.4.1	Aufbau und Funktionsweise des LightCyclers.....	41
3.2.4.2	Realtime-RT-PCR mit dem LightCycler.....	42
3.2.4.3	Produktdetektion mit SYBR Green .....	42
3.2.4.4	Schmelzkurvenanalyse .....	43
3.2.4.5	Prinzip der Quantifizierung.....	43
3.2.5	Erstellung eines externen mRNA-Standards für CD103 .....	44
3.2.5.1	Erzeugen einer transkriptionsfähigen DNA .....	44
3.2.5.2	Aufreinigen des PCR-Produkts .....	47
3.2.5.3	In vitro Transkription .....	48
3.2.5.4	Aufreinigen der in vitro erzeugten RNA.....	49
3.2.5.5	Photometrische Bestimmung des RNA-Gehalts .....	49
3.2.5.6	Erzeugen einer CD103-mRNA-Stammlösung.....	50
3.2.5.7	Herstellen einer CD103-mRNA-Verdünnungsreihe .....	50
3.2.5.8	„one-step“ RT-PCR am LightCycler zur Erstellung eines externen Standards ..	51
3.2.5.9	Messbereich und Detektionslimit.....	52
3.2.6	Agarosegelelektrophorese .....	53
3.2.7	Auswertung und Statistik .....	54

3.2.7.1	Beurteilung der Standardreihen mittels Intra-Test- und Inter-Test-Variabilität..	54
3.2.7.2	Validierung der quantitativen „one-step“ RT-PCR zur Messung von CD103-mRNA	54
4.	Ergebnisse .....	55
4.1	Initialläufe und In-Vitro-Transkription.....	55
4.2	Etablierung einer quantitativen „one-step“ RT-PCR am LightCycler zur Messung der CD103-mRNA-Konzentration im Urin .....	56
4.2.1	Optimierung der RT-PCR am LightCycler .....	56
4.2.1.1	Primerkonzentration .....	56
4.2.1.2	Mg-Konzentration .....	57
4.2.1.3	Messtemperatur .....	57
4.2.1.4	Zusammenstellung von Laufparametern (Qiagen – Kit).....	58
4.2.2	Prüfen der PCR-Produkte mit Agarose-Gelelektrophorese .....	58
4.2.3	Messbereich und Detektionslimit.....	59
4.2.4	Inter- und Intra-Test-Variabilität.....	60
4.2.5	Vergleich verschiedener Primerpaare .....	61
4.2.6	Test des SYBR-Green-Kits der Firma Roche .....	65
4.3	Histologiebefunde .....	67
4.3.1	Kriterien der Befundung .....	67
4.3.2	Beschreibung des Patientenkollektivs.....	67
4.3.3	Anteile der Diagnosen im Patientenkollektiv nach histologischer Befundung.....	69
4.4	Messung der CD103-mRNA-Konzentrationen in Urinproben transplantierten Patienten mittels RT-PCR am LightCycler .....	71
4.4.1	Analyse der Gesamtergebnisse .....	71
4.4.2	Entwicklung der CD103 mRNA Konzentrationen im Verlauf von Abstossungsreaktionen bei einzelnen Patienten.....	71
4.5	Evaluation der quantitativen „one-step“ RT-PCR am LightCycler anhand der Histologien	77
4.5.1	Eckpunkte der Bewertung .....	77
4.5.2	CD103-mRNA-Konzentration als Marker für qualitative Abstossung.....	78
4.5.3	CD103-mRNA-Konzentration als Marker für Akute Abstossung.....	79
4.5.4	CD103-mRNA-Konzentration als Marker für Borderline-Abstossung.....	80

4.5.5	CD103-mRNA-Konzentration als Marker für chronische Transplantatnephropathie	82
4.5.6	Methodenvergleich: Serum-Kreatin – CD103-mRNA-Konzentration im Urin	83
4.5.7	Zusammenfassung: Evaluation der „one-step“ RT-PCR am LightCycler	85
5.	Diskussion	87
5.1	Bezug zu Fragestellung und Ergebnissen	87
5.2	Die Methode: Quantitative „one-step“ RT-PCR am LightCycler zur Messung der CD103-RNA-Konzentration im Urin	87
5.2.1	Messbereich und Detektionslimit	88
5.2.2	Intra-Test und Inter-Test-Variabilität	88
5.2.3	Einschätzung möglicher Fehlerquellen	89
5.3	Messergebnisse und Evaluation der „one-step“ RT-PCR am LightCycler	90
5.3.1	Entwicklung der CD103-mRNA-Konzentrationen im Verlauf von Abstossungsreaktionen bei einzelnen Patienten	91
5.3.2	Die CD103-mRNA-Konzentration als Abstossungsmarker	93
5.3.3	Übergreifende Aspekte zur Evaluation der „one-step“ RT-PCR am LightCycler	95
5.4	Zusammenfassung	98
6.	Literaturverzeichnis	99

## 1. Abkürzungsverzeichnis

APC	Antigenpräsentierende Zelle
AT-Basenpaar	Adenin-Thymin-Basenpaar
ATG	Anti-Thymozyten-Globulin
AUC	Area under curve
bp	Basenpaare
CD4, CD8	Oberflächenmarker auf T-Lymphozyten („Cluster of differentiation“)
cDNA	Komplementäre DNA (complementary DNA)
CNI	Calcineurininhibitor
CRP	C reaktives Protein (Akute-Phase-Protein)
C <sub>T</sub>	Threshold-Cycle
CyA	Cyclosporin A (Calcineurininhibitor)
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
GC-Basenpaar	Guanin-Cytosin-Basenpaar
G-Protein	Heterotrimeres GTP-bindendes Protein
GFR	Glomeruläre Filtrationsrate
GN	Glomerulonephritis
HE	Hämatoxylin-Eosin-Färbung
HLA	Human leukocyte antigen
HML-1-Antigen	Humanes mucosa-assoziiertes Antigen
IDC	Interdigitierende dendritische Zellen
Ig-SF	Immunglobulin-Superfamilie
iIEL	Intestinale intraepitheliale Lymphozyten
IgM	Immunglobulin M
IL-1	Interleukin 1
IR	Ischämische Reperfusion
JAK-STAT	Janus Kinase-Signal Transducer and Activator of Transcription

kb	Kilobasenpaare
kDa	Kilodalton
LC	LightCycler
LED	Lichtemittierende Diode
LFA-1	Lymphocyte Function Associated Antigen – 1 (CD11a)
LPS	Lipopolysaccharid
MAC	Membrane Attack Complex
MF	Mycosis Fungoides
MHC	Major Histocompatibility Complex
MIDAS	Metal-ion-dependent adhesion-site
MLA	Mucosal Lymphocyte Antigen
mRNA	Messenger RNA
NFAT	Nukleärer Faktor aktivierter T-Zellen
NK-Zelle	Natural Killer Cell
N-Terminus	Amino-Terminus
OD	Optische Dichte
PAS	Periodic acid Schiff – Färbung (Perjod-Schiffsäure)
PBMC	Peripheral blood mono nucleated cells
PCR	Polymerase Chain Reaction
RANTES	Regulated upon activation, normal T-cell expressed and secreted
RNA	Ribonukleinsäure
rNTP	Ribonukleosidtriphosphat
ROC	Receiver Operating Characteristic
rpm	Umdrehungen pro Minute
RT	Reverse Transkription
SD	Standard Deviation, Standardabweichung
TAP-Transporter	Transporter associated with Antigen-processing
TGF- $\beta$	Transforming Growth Factor beta
Tm	Schmelztemperatur
TNF- $\alpha$	Tumor-Nekrose-Faktor alpha
VLA-4	Very Late Antigen – 4 (CD49d)



## **2. Einleitung**

### **2.1 Allgemeines zur Nierentransplantation**

Im Jahr 2004 benötigten in Deutschland mehr als 82000 Patienten wegen terminaler Niereninsuffizienz ein chronisches Nierenersatzverfahren. Davon verfügte gut ein Viertel (21300 Patienten) über eine funktionierende Transplantatniere, während sich mehr als drei Viertel aller Betroffenen einer regelmässigen Dialyse unterziehen mussten (Quasi-Niere, Jahresbericht 2004-2005).

Nach oft mehrjähriger Dialysepflicht und Wartezeit auf ein geeignetes Spenderorgan bedeutet die Nierentransplantation für die Patienten einen erheblichen Rückgewinn an Lebensqualität. Die durchschnittliche Überlebenszeit oder besser „Halbwertszeit“ eines Nierentransplantats beträgt heute im Mittel etwa 12 Jahre (Takemoto et al., 2000) und wird von zahlreichen Faktoren beeinflusst. So strebt man bei der Vergabe von Organen eine hohe Übereinstimmung bezüglich der HLA-Typisierungen von Spender und Empfänger an, um das Risiko für Abstossungsreaktionen zu reduzieren. Meist weisen Nierentransplante von Lebendspendern eine längere Halbwertszeit auf als Leichennieren (Cecka et al., 2001). Von Bedeutung für das langfristige Transplantatüberleben sind weiterhin das Alter von Spender und Empfänger (Keith et al., 2004), die Dauer der vorangegangenen Dialysepflicht (Meier-Kriesche et al., 2002) sowie die Anzahl durchgemachter Abstossungsepisoden (Meier-Kriesche et al., 2000). Im klinischen Alltag besteht der entscheidende Faktor für das Transplantatüberleben in einer optimalen Steuerung der Immunsuppression, um Infekte und Überimmunsuppression zu vermeiden, aber auch um wiederholte akute und chronische Abstossungsreaktionen zu unterdrücken.

### **2.2 Pathophysiologie der Abstossung von Nierentransplantaten**

#### **2.2.1 Der Major Histocompatibility Complex (MHC)**

Die Immunantwort auf ein transplantiertes Organ richtet sich hauptsächlich gegen Moleküle des MHC (engl: „major histocompatibility complex“) des Spenders, auch „Human Leukocyte Antigen“ (HLA) genannt. Dabei handelt es sich um Zelloberflächenproteine, die auf dem kurzen Arm von Chromosom 6 verschlüsselt sind. MHC-Moleküle weisen einen enormen

Polymorphismus auf und werden kodominant vererbt. In unmittelbarer Nähe dieser Loci befinden sich zahlreiche weitere Gene, die zentrale Funktionen bei der Immunantwort übernehmen, z.B. die Gene für TNF (Tumornekrosefaktor), TAP-Transporter (Transporter associated with antigen-processing) und andere. Es werden 2 Klassen von MHC-Molekülen unterschieden: MHC I und MHC II. Die MHC-Moleküle der Klasse I (HLA-A, -B, -C) befinden sich auf jeder kernhaltigen Zelle, in besonders grosser Dichte jedoch auf Lymphozyten, APC (Antigen presenting cells), Makrophagen und Endothelzellen. MHC-Moleküle der Klasse I binden Peptide mit einer Länge von 9-10 Aminosäuren und präsentieren CD8+ zytotoxischen T-Lymphozyten den MHC/Antigen-Komplex. Die prozessierten Peptide stammen aus dem Zytoplasma. Es handelt sich um Bruchstücke zelleigener Proteine oder auch um Produkte von Viren, die den Syntheseparat der Wirtszelle nutzen. MHC-Moleküle der Klasse II (HLA-DR, -DQ, -DP) werden konstitutiv auf Makrophagen, dendritischen Zellen, B-Zellen und anderen antigenpräsentierenden Zellen exprimiert.

Unter dem Einfluss von Zytokinen wie IL-2 oder IFN- $\gamma$  können auch Epithel- und Endothelzellen MHC-II-Moleküle bilden. MHC-II Moleküle präsentieren Antigene in Form von Peptiden mit einer Länge von 12 bis 28 Aminosäuren, die ursprünglich aus dem Extrazellulärraum über Endozytose aufgenommen worden sind und sich in sauren Vesikeln befinden. Für die Transplantation solider Organe haben die HLA-I-Antigene A und B sowie das HLA-II-Antigen DR besondere Bedeutung. In klinischen Studien wurde festgestellt, dass ein Nichtübereinstimmen bezüglich dieser HLA-Moleküle - ein sogenanntes Mismatch - mit einem besonders schlechten Transplantatüberleben zusammenfällt (Gilks et al., 1987; Hariharan et al., 2000). Durch die verstärkte Berücksichtigung des HLA-Match und durch neue immunsuppressive Medikamente konnten in den vergangenen Jahrzehnten erheblich verlängerte Transplantatüberlebenszeiten erreicht werden. Das HLA-System ist nur ein Faktor, der das Langzeitüberleben der Transplantate beeinflusst, es werden auch Organe mit multiplen Mismatches transplantiert (Su et al., 2004).

### **2.2.2 Die Zelluläre Abstossungsreaktion**

Auch bei guter HLA-Übereinstimmung können Abstossungsreaktionen auftreten. Ein Grund dafür ist, dass die Standardverfahren der HLA-Typisierung aufgrund des enormen Polymorphismus Unterschiede nicht absolut exakt wiedergeben. Ausserdem gibt es eine

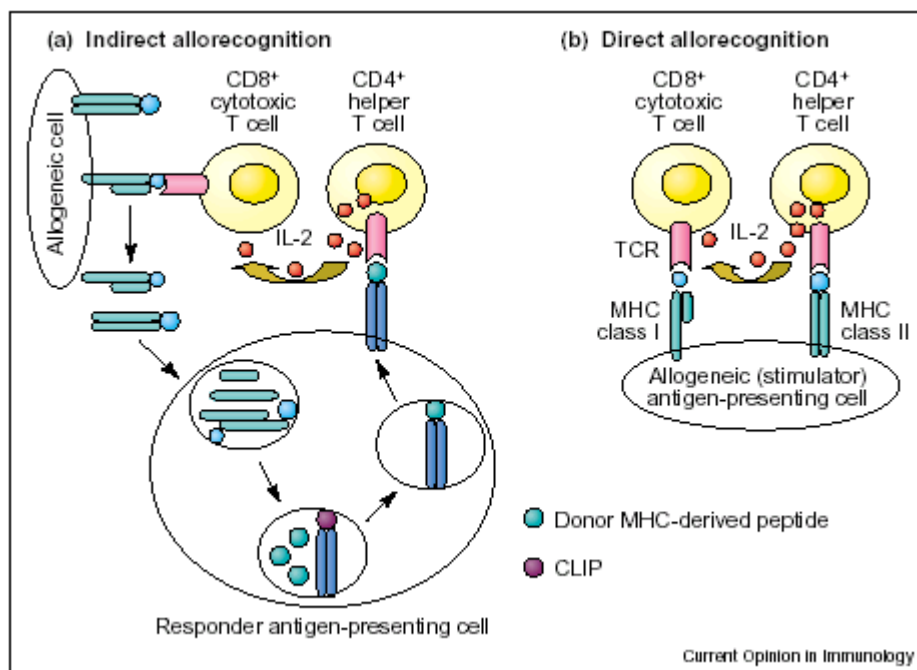
umfangreiche Gruppe von Neben-Histokompatibilitäts-Antigenen, die ebenfalls zur Auslösung von Immunantworten führen können. (Simpson und Roopenian, 1997). Zytotoxische T-Lymphozyten (CD8+T-Zellen), aber auch T-Helferzellen (CD4+T-Zellen) spielen eine zentrale Rolle bei den immunologischen Prozessen, die nach einer Nierentransplantation auftreten können. Die Bedeutung der T-Zell-Antwort für die zelluläre Organ-Abstossung ist allgemein akzeptiert und gut charakterisiert (Robertson et al., 2001).

### **2.2.2.1 Antigenerkennung, Aktivierung und Proliferation von T-Zellen**

Antigene des Transplantats können den Empfänger-T-Zellen auf zwei verschiedenen Weisen präsentiert werden. Antigen präsentierende Zellen (APC) des Spenders binden auf ihren MHC I- oder MHC II-Molekülen Fragmente aus allogenen Peptiden und wandern über den Lymphweg in regionale Lymphknoten. Wenn dort eine Erkennung durch naive T-Zellen mit antigenspezifischen T-Zellrezeptoren erfolgt, spricht man von direkter alloreaktiver Erkennung. Werden Peptide aus dem Transplantat von empfängereigenen APC verarbeitet und präsentiert, handelt es sich um eine indirekte alloreaktive Erkennung. Für eine T-Zell-Aktivierung und eine Differenzierung zu T-Effektorzellen sind neben einer Erkennung von MHC I oder MHC II und CD8 bzw. CD4 weitere kostimulatorische Signale erforderlich, z.B. B7/CD28 (Sayegh et al., 1998) oder CD40/CD40L (Denton et al., 1998). Ausserdem konnte gezeigt werden, dass für eine effektive Aktivierung und Proliferation von CD8+ T-Zellen ein Beitrag von T-Helferzellen nötig ist (Bennet et al., 1997; Ridge et al., 1998; Janssen et al., 2002). Dabei ist die Vorstellung, dass die T-Helferzelle und auch die zytotoxische T-Zelle dieselbe APC erkennen und die aktivierte T-Helferzelle über eine Ausschüttung von Zytokinen zur Stimulierung der zytotoxischen T-Zelle beiträgt. Die Bindung der APC an die T-Zelle aktiviert ein G-Protein, wodurch eine intrazelluläre Erhöhung der Calciumkonzentration induziert wird. Es kommt zur Bildung eines Calcium-Calmodulin-Komplexes, der die Aktivierung mehrerer Kinasen auslöst, unter anderem erfolgt die Aktivierung von Calcineurin. Calcineurin dephosphoryliert NFAT (Nukleärer Faktor Aktivierter T-Zellen), der anschliessend in den Kern wandert, an Promotoren bindet und zu einer verstärkten Transkription von z.B. IL-2 führt (Wesselborg et al., 1996). Über IL-2 und seinen Rezeptor induzieren und verstärken aktivierte Lymphozyten ihre eigene Proliferation.

Ein weiterer molekularer Mechanismus, der die T-Zell-Aktivierung kennzeichnet, ist die Degradierung von  $\kappa B$ . Bei  $\kappa B$  handelt es sich um heterodimeres Protein in ruhenden

Lymphozyten, das sich aus NF $\kappa$ B (Nukleärer Faktor Kappa B) und einem Inhibitormolekül zusammensetzt. Durch den Einfluss von IL-1, TNF oder Lipopolysaccharid (LPS) kommt es zu einer Freisetzung von NF $\kappa$ B, das anschliessend in den Nukleus wandert und die Transkription von z.B. MHC I – Molekülen, Immunglobulinen und IL-2 fördert (Zuckermann et al., 1991). Neben weiteren Signalkaskaden, die bei einer T-Zell-Antwort identifiziert worden sind, scheint insbesondere noch die JAK-STAT-Aktivierung von Bedeutung zu sein (Janus Kinase-Signal Transducer and Activator of Transcription). Dabei handelt es sich um spezifische Membranrezeptoren für Zytokine, die bei Bindung ihres Liganden Dimere bilden, sich zunächst gegenseitig phosphorylieren, um anschliessend einen zytoplasmatischen Transkriptionsfaktor zu aktivieren. Der Transkriptionsfaktor (STAT) wandert in den Kern und führt wiederum zur Transkription mehrerer Gene, die an der Immunantwort beteiligt sind. Zahlreiche Zytokine und Chemokine wie z.B. Interferone, nutzen die JAK-STAT-Signalkaskade (Ransohoff, 1998; Darnell et al., 1994). Die proliferierenden und reifenden T-Effektorzellen wandern anschliessend über den Blutweg zu ihrem Zielgewebe. Im Gefässnetz des angesteuerten Gewebes liegt Endothel in aktivierter Form vor. D.h. die Endothelzellen exprimieren ein bestimmtes Muster von Membranmolekülen, die eine Adhäsion und die anschliessende Extravasation von Lymphozyten fördern.



**Abb. 1:** Direkte und indirekte Antigenpräsentation (Jiang et al., 2004)

### 2.2.2.2 Zytotoxische Mechanismen von aktivierten T-Effektorzellen

Die beiden grundlegenden zytotoxischen Mechanismen von CD8<sup>+</sup>T-Effektorzellen sind die Induktion von Apoptose durch eine Sekretion von Perforin, Granulysin oder Granzymen sowie die Produktion und Ausschüttung von Zytokinen. Treffen aktivierte zytotoxische T-Zellen auf ihre Zielzellen, erfolgt eine Erkennung und Bindung zwischen T-Zell-Rezeptor und MHC-Molekül inklusive gebundenem Antigen. Durch eine Umorganisation der Mikrotubuli innerhalb der CD8<sup>+</sup> alloreaktiven T-Effektorzelle fokussieren sich die zytotoxischen Granula in der Nähe der Kontaktstelle zwischen den beiden Zellen. Die Ausschüttung von Perforin und Granzyme erfolgt dann gezielt auf die attackierte Zelle. Perforin ist ein zytotoxisches Protein, dass in Lipiddoppelschichten zu Poren polymerisiert, ähnlich wie der „Membrane Attack Complex“ (MAC) in der Endstrecke des Komplementsystems. Die Zellintegrität wird beeinträchtigt und es kommt zu einem Wassereinstrom.

In-vitro-Versuche haben gezeigt, dass Perforin allein nur in unphysiologisch hohen Dosen zur Lyse der angegriffenen Zellen führt (Barry et al., 2002). Werden Perforin und Granzyme synchron ausgeschüttet, so bahnen die Perforin-Poren den Weg für das Eindringen von Granzyme in die Zelle. Bei den diversen Granzymen handelt es sich um Serinproteasen, die Caspase aktivieren können. Caspasen wiederum sind Enzyme, die in aktiviertem Zustand zu einer DNA-Fragmentierung führen und so die Apoptose, den programmierten Zelltod, einleiten. Bei Granulysin handelt es sich ebenfalls um ein porenbildendes zytotoxisches Protein, allerdings wird die Apoptose der Zielzelle caspaseunabhängig ausgelöst.

Aktivierete alloreaktive CD8<sup>+</sup>T-Zellen und auch einige CD4<sup>+</sup>-T-Zellen exprimieren den FAS-Liganden (CD95). Dabei handelt es sich um ein Zelloberflächenmolekül aus der Familie der Tumornekrosefaktoren, das an den FAS-Rezeptor auf der Membran der Zielzelle binden kann. FAS weist an seinem zytoplasmatischen Ende eine sogenannte „Todesdomäne“ auf, die nach der Bindung des FAS-Liganden aktiviert wird. Dadurch kommt es über eine Signalkaskade zur Spaltung von Caspase und einem Eintritt der Zelle in die Apoptose.

Ein weiterer Effektormechanismus von zytotoxischen T-Zellen ist die Sekretion von Zytokinen. Durch die Sekretion von Interferon  $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ) wird bei der Zielzelle z.B. die Expression von MHC-Molekülen sowie die Produktion der Komponenten erhöht, die an der Antigenprozessierung beteiligt sind. Damit steigt die Wahrscheinlichkeit, dass allospezifische CD8<sup>+</sup>-T-Effektorzellen ihre Zielzellen erkennen. Die an der Immunantwort beteiligten Zellpopulationen triggern ausserdem eine gesteigerte Produktion weiterer löslicher Mediatoren,

die zusätzliche transplantatschädigende Prozesse auslösen können. Dadurch kommt es zu einer Modulation von Gefässtonus und Gefässpermeabilität sowie zur Thrombozytenaggregation und zur Aktivierung des Gerinnungssystems (Rocha et al., 2003). Das Ausmass der T-Zell-Aktivierung und -Proliferation sowie die Wirksamkeit der Effektorfunktionen wird von zahlreichen Zytokinen, Chemokinen und deren Rezeptoren, von Komplementfaktoren und deren Spaltprodukten und weiteren lokalen und systemischen Faktoren moduliert.

### **2.2.3 Der Einfluss von Zytokinen und Chemokinen bei der Abstossung von Nierentransplantaten**

Zytokine sind kleine lösliche Proteine mit einem Molekulargewicht von ca. 25 kDa, die das Verhalten von immunologischen oder somatischen Zellen lokal und auch systemisch beeinflussen. Zytokine werden vorwiegend von T-Zellen und aktivierten Makrophagen aber auch von anderen somatischen Zelltypen produziert. Zytokine mit zentraler Bedeutung für die Transplantationsimmunologie sind unter anderem der T-Zellwachstumsfaktor IL-2, sowie das für die Einleitung der humoralen Immunantwort bedeutsame IL-4 und IL-15. IFN- $\gamma$  wird von T-Zellen sezerniert und führt zu einer Aktivierung von Makrophagen, aber auch zu einer verstärkten Expression von MHC-Molekülen auf anderen somatischen Zellen, z.B. auf Tubulusepithelzellen. Die früh in der Immunantwort auftretenden Tumornekrosefaktoren und IL-1 gehören ebenso zur Familie der Zytokine wie das noch ausführlicher zu erläuternde TGF- $\beta$  und IL-10.

Chemokine bilden eine grosse Familie von niedermolekularen Proteinen mit einem Molekulargewicht von 8-11 kDa, die von Monozyten, Makrophagen und T-Zellen sezerniert werden. Charakteristisch für Chemokine ist ihre Fähigkeit zu einer Immobilisierung durch die Bindung an Proteoglykane der interstitiellen Matrix. Dadurch bilden sich lokale Chemokingradienten, die für eine gezielte Migration von weiteren Entzündungszellen sorgen. Die bisher im Zusammenhang mit Nierentransplantationen und Transplantatabstossungen untersuchten Zytokine und Chemokine lassen sich nach dem Zeitpunkt ihres Auftretens im postoperativen Verlauf gruppieren. So kommt es unmittelbar nach der Wiederherstellung der Blutversorgung durch die Gewebetraumatisierung zu einer Ausschüttung der proinflammatorischen Zytokine TNF- $\alpha$  (Tumor-Nekrose-Faktor-alpha) und IL-1 (Interleukin-1) durch Endothel- und Parenchymzellen des Transplantats (El-Sawy et al., 2002). Das initiiert zunächst eine Einwanderung von Zellen des angeborenen, unspezifischen Immunsystems wie

neutrophilen Granulozyten und Makrophagen sowie eine erleichterte T-Zell-Aktivierung und eine Aktivierung des Endothels. Mit Fortschreiten der postoperativen Periode (<72 Stunden) wandelt sich das Infiltrat hin zu einer mononukleären Population. Daran sind unter anderem die Chemokine MIP-1 $\alpha$  (macrophage inflammatory protein), MIP-1 $\beta$ , IP-10 (Interferon inducible protein) und Fractalkin beteiligt. In dieser Phase gelangen auch erste alloantigenspezifische T-Zell-Populationen in das Transplantat. Ab dem 2.-3. postoperativen Tag treten Zytokine und Chemokine in den Vordergrund, die spezifisch aktivierte T-Zellen in das Transplantat „locken“. Dazu gehören RANTES (regulated upon activation, normal T cell expressed and secreted), MIG (monokine induced by Interferon-gamma), IP-10 und I-TAC (Interferon- $\gamma$  inducible T cell chemoattractant). Diese Substanzen sorgen auch zu späteren Zeitpunkten für die Rekrutierung des allospezifischen Infiltrats von Immunzellen, die akute Abstossungsepisoden einleiten.

## **2.3 Diagnostik bei Nierentransplantatversagen**

### **2.3.1 Klinik**

Analog zu einem Funktionsverlust von Eigennieren, erleben Patienten bei Beeinträchtigungen der Transplantatniere eine Verschlechterung ihres Allgemeinzustands mit einer möglichen Leistungsminderung. Sie berichten über Atemnot, Ödeme und Schmerzen im Nierenlager. Mitunter wird eine reduzierte Diurese bemerkt oder die infolge der Volumenüberlastung auftretende deutliche Gewichtszunahme über wenige Tage. Symptome wie Herzrhythmusstörungen und Pruritus können hinzukommen. Anamnestisch bedeutsam sind Begleiterkrankungen wie Hypertonie, Diabetes mellitus sowie die Erkrankung, die primär zum Funktionsverlust der eigenen Nieren führte. Weitere wichtige Aspekte sind kürzlich eingenommene Medikamente, insbesondere nichtsteroidale Antiphlogistika, Antibiotika und Chemotherapeutika sowie zurückliegende Kontrastmitteluntersuchungen. Die weitere Diagnostik entspricht im wesentlichen der üblichen Nierenfunktionsdiagnostik und sollte rasch und zielführend die Ätiologie der Funktionseinschränkung des Transplantats aufklären.

### **2.3.2 Labor und Mikrobiologie**

Zur Analyse von Pathogenese und Ausmass einer Funktionseinschränkung von Nierentransplantaten werden im wesentlichen folgende Laborwerte herangezogen:

- Blutbild und Differentialblutbild
- Ausgewählte Parameter der Klinischen Chemie: Kreatinin, Harnstoff, Harnsäure, CRP (C-reaktives Protein)
- Urin-Status (qualitativ: Erythrozyten, Hämoglobin, Leukozyten, Glukose, Nitrit, Proteine, Ketonkörper, pH-Wert, Urobilinogen, Bilirubin) und Harn-Sediment
- 24-Stunden-Sammelurin (quantitativ: Volumen, Eiweiss, Kreatinin, Harnstoff, Mikroalbumin, Elektrolyte, Berechnung der Kreatininclearance)

Bei Verdacht auf einen toxischen Schaden des Transplantats kann darüber hinaus die Bestimmung weiterer Parameter wie z.B. der Serumkonzentrationen der Immunsuppressiva (Cyclosporin A-/ Tacrolimus-/ Sirolimus-Spiegel) sinnvoll sein.

Durch die immunsuppressive Medikation sind transplantierte Patienten einem erhöhten Risiko für Infektionen ausgesetzt. Bei klinischem Verdacht auf akute oder stattgehabte Infektionen, wird in Blut, Urin und Stuhl nach möglichen Erregern gesucht und im Falle von bakteriellen Erregern ein Antibiogramm erstellt. Häufige virale Infektionen bei Nierentransplantierten sind Cytomegalievirusinfektionen. Daneben wird häufig eine Diagnostik durchgeführt für Polyoma-, Epstein-Barr-Virus, Herpes-Simplex Typ 1 und 2, Varizella-Zoster-Virus, Hepatitis B und C, Adenovirus und ggf. für HIV.

### **2.3.3 Bildgebung**

Bei der Sonografie von Nieren und ableitenden Harnwegen liegt das Augenmerk auf der morphologischen Struktur, die durch die Ausdehnung des Organs, das Mark-Rinden-Verhältnis und die Beschaffenheit des Übergangs von Mark und Rinde gekennzeichnet ist. Sonografisch können Stauungen durch Blockaden in Urether oder Nierenbecken ausgeschlossen werden. Zur Einschätzung der Nierendurchblutung und der Strömungsverhältnisse der zu- und ableitenden Gefässe wird die Duplexsonografie herangezogen.

Bei Patienten mit Dyspnoe kann durch eine Röntgenaufnahme des Thorax das Ausmass der Lungenbeteiligung eingeschätzt werden. Überwässerungszeichen, entzündliche Infiltrate und Hinweise auf eine pulmonalvenöse Stauung sollten ausgeschlossen werden.



### 2.3.4 Nierenpunktion

Oft lässt sich trotz umfangreicher nicht-invasiver diagnostischer Möglichkeiten eine definitive Aussage zur Genese des Transplantatversagens nicht stellen. Goldstandard zur Diagnosestellung ist die Nierenpunktion mit histologischer Befundung der gewonnenen Punktionszylinder durch einen Pathologen. Heute lässt sich das Risiko für den Patienten durch eine Ultraschallsteuerung während der Punktion minimieren. Trotzdem bleibt es ein invasiver Vorgang mit Blutungsgefahr und mit der – wenn auch seltenen – Komplikation eines Transplantatverlustes. Das histologische Präparat wird zunächst lichtmikroskopisch in der HE-Färbung (Hämatoxylin-Eosin) beurteilt, es folgen immunhistochemische Färbungen und ggfs. eine elektronenmikroskopische Befundung. Je nach Art und Lokalisation des zellulären Infiltrats und nach Verteilung der geschädigten Strukturen wird eine Zuordnung innerhalb der Klassifikation Banff 97 getroffen (Racusen et al., 1999 und 2003). Genauere Erläuterungen zur Banff 97 – Klassifikation und zu immunhistochemischen Färbungen siehe Kapitel 2.8.3.

### 2.3.5 Molekularbiologische Methoden

Molekularbiologische Methoden wie die RT-PCR (Reverse Transkription plus Polymerase Kettenreaktion) bieten sich als diagnostische Instrumente an, mit deren Hilfe man verschiedene immunologische Prozesse und beteiligte Faktoren identifizieren und auch quantifizieren kann. Als Untersuchungsmaterial kann peripheres Blut, ein Nierenpunktionszylinder oder auch Urin dienen. Ein Ansatz ist, mRNA bekannter Abstossungsmarker in den Nierenpunktatzylindern einer RT-PCR zu unterziehen und anhand der erhöhten Rate von bestimmten Transkripten eine Zuordnung zu dem aktuellen Prozess zu treffen. Erste Ergebnisse dazu veröffentlichten Strehlau et al., 1997. Sie konnten signifikant erhöhte „Level“ von IL-7, IL-10, IL-15, Fas-Ligand, Perforin und Granzyme B in Biopsiegewebe von Transplantatnieren nachweisen. Vasconcellos analysierte ein Jahr später mRNA aus peripheren Blutlymphozyten und stellte eine Korrelation der Expression von Perforin, Fas-Ligand und Granzyme B mit dem Auftreten von akuten Abstossungsepisoden fest (Vasconcellos et al., 1998). Li konnte mit Hilfe von mRNA, die aus Urin extrahiert wurde, Perforin und Granzyme B identifizieren und semiquantitativ messen (Li et al., 2001). Ähnliches gelang später Ding und Tatapudi, die im Falle von Abstossungen eine Erhöhung der Konzentration der mRNA von CD103 bzw. IP-10 und CXCR3 im Urin feststellten (Ding et al., 2003; Tatapudi et al., 2004).

Insgesamt gehören die erläuterten Methoden heute noch nicht zur Routinediagnostik bei Nierentransplantatversagen, sind aber Gegenstand intensiver Forschung.

### **2.3.6 Zielkonflikt beim Einsatz der diagnostischen Instrumente**

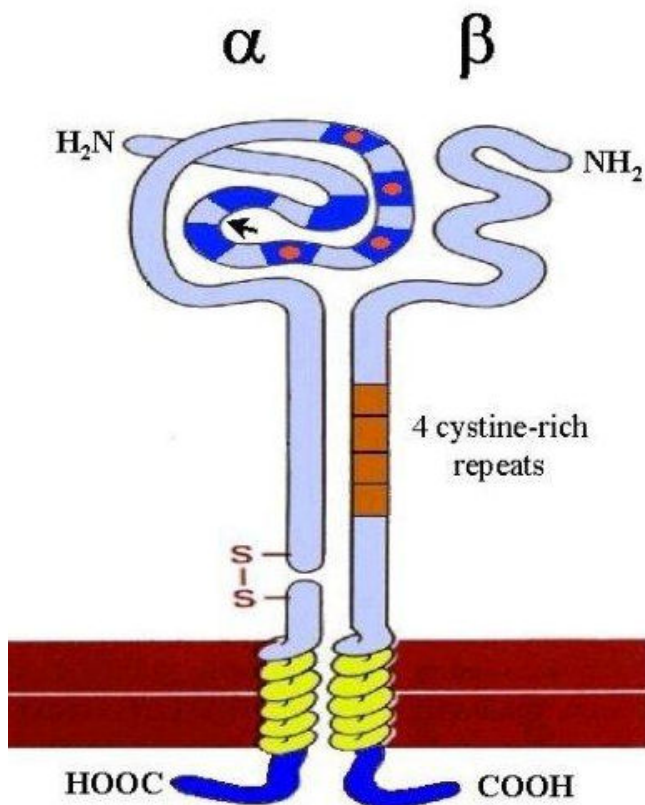
Stellt sich ein nierentransplantiertes Patient mit Zeichen eines Transplantatversagens vor, so ist es von zentraler Bedeutung, möglichst rasch zu einer gesicherten Diagnose zu kommen. Nur dann kann zeitnah auch die geeignete Therapie eingeleitet werden (z.B. Methylprednisonstherapie bei Transplantatabstossung vs. Reduktion der Immunsuppression und spezifische virustatische Behandlung bei viraler Genese). Die zur Verfügung stehenden labortechnischen Untersuchungen wie eine Bestimmung von Serumkreatinin und Serumharnstoff gehen oft mit einer niedrigen Spezifität einher. Speziell das Kreatinin steigt erst relativ spät im Verlauf einer Transplantatschädigung an. Die hochsensitive und hochspezifische Nierenpunktion ist für den Patienten nach wie vor mit einem Blutungsrisiko und weiteren Unannehmlichkeiten wie Bettruhe verbunden. Es besteht unverändert ein Bedarf an nicht- oder wenig invasiven, aber hinreichend sensitiven und spezifischen Testverfahren zur Diagnose einer Abstossungsreaktion.

## **2.4 Die Bedeutung des Integrins CD103**

### **2.4.1 Allgemeines zu Integrinen**

Integrine bilden eine Familie von Zelloberflächenmolekülen, die sowohl bei der normalen Entwicklung von Geweben als auch bei Immun- und Entzündungsreaktionen für die Adhäsion zwischen Zellen sowie zwischen Zellen und der extrazellulären Matrix sorgen. Integrine sind Heterodimere und bestehen aus einer alpha- und einer beta-Kette, wobei die kleinere beta-Kette die Klassenzugehörigkeit bestimmt. Bis heute sind 18 alpha- und 8 beta-Ketten bekannt, die in 24 möglichen Paarungen auftreten (Pribila et al., 2004). Beide Ketten sind nicht-kovalent aneinander gebunden. Integrine bestehen aus einer Extrazellulärdomäne, einer Transmembrandomäne und einem intrazellulären Anteil. Die Extrazellulärdomäne ist verantwortlich für die Ligandenbindung und die Reaktion mit der extrazellulären Matrix oder anderen Zelloberflächen. Über den intrazellulären Anteil des Integrins ist eine Interaktion mit dem Zytoskelett möglich. Bei den alpha-Ketten unterscheiden sich zwei Gruppen: Die Ketten  $\alpha_3$ ,  $\alpha_5$ ,  $\alpha_6$ ,  $\alpha_v$  und  $\alpha_{\text{lib}}$  unterliegen einer posttranslationalen Spaltung, wobei ein kleineres Fragment entsteht, das die

Transmembrandomäne und einen kleinen Anteil der Extrazellulärdomäne enthält und eine grössere Untereinheit, das den grösseren Anteil der Extrazellulärdomäne darstellt und über eine Disulfidbrücke an das kleinere Fragment gebunden bleibt. Eine andere Untergruppe der alpha-Ketten weist keine posttranslationale Spaltung auf, dafür enthalten die entsprechenden alpha-Ketten eine sogenannte I-Region (=Insertion) und ähneln damit Proteinen wie dem Komplementfaktor B und C2 sowie dem von Willebrand Faktor, dem Knorpelmatrixglykoprotein und dem Kollagen Typ VI. Alle alpha-Ketten weisen ein 7fach wiederholtes Motiv von Aminosäuren auf und enthalten 3-4 Kationenbindungsstellen.



**Abb. 2:** Modell eines T-Zell-Integrins:  $\alpha$ -Untereinheit links  $\Rightarrow$  CD103 (Fleming et al., 2005)

#### 2.4.2 Struktur und Expressionsmuster des Integrins alphaE (CD103)

Seit Ende der 80er Jahre haben mehrere Forscher einen neuen Integrintyp auf intestinalen intraepithelialen T-Lymphozyten (iIEL) nachgewiesen (Cerf-Bensussan et al., 1987; Kilshaw et al., 1990 und 1991; Parker et al., 1992; Micklem et al., 1992; Roberts et al., 1993; Russel et al., 1994). Es handelte sich um ein Integrin aus der  $\beta 7$ -Familie, das eine bis dahin unbekannte alpha-Kette aufwies und unter dem Namen HML-1-Antigen (humanes mukosa-assoziiertes

Lymphozyten-Antigen) beschrieben wurde. Man konnte zeigen, dass das HML-1-Antigen auf mehr als 90% der CD8+ iIEL, auf ca. 45% der vorwiegend CD4+ Lamina-Propria-Lymphozyten (LPL) sowie auf ca. 2% der peripheren Blutlymphozyten (PBMC) exprimiert wird (Picker et al., 1990). In den folgenden Jahren wurde das HML-1-Antigen auch auf Lymphozyten anderer epithelialer Gewebe nachgewiesen, z.B. in der Lunge (Erle et al., 1994; Rihs et al., 1996; Lohmeyer et al., 1999), in den Schleimhäuten des oberen Respirationstrakts, in der Urethralschleimhaut und in der Haut (Simonitsch et al., 1994). Als Ligand für das Integrin CD103 konnte das von allen Epithelzellen exprimierte E-Cadherin identifiziert werden (Cepek et al., 1993 und 1994; Roberts et al., 1993; Karecla et al., 1995). Eine Expression von CD103 wurde weiterhin im Rahmen der T-Zell-Entwicklung im Thymus beschrieben, wo Subpopulationen der frühen doppelt-negativen CD4-/CD8-T-Lymphozyten sowie der einfach-negativen CD4-/CD8+-T-Lymphozyten diese alphaE-Kette exprimieren (Kutlesa et al., 2002). Nachdem zunächst eine Expression von CD103 ausschliesslich durch verschiedene Typen von T-Lymphozyten beschrieben worden war, konnten 2003 Gerritsen et al. nachweisen, dass auch Endothelzellen während ihrer Differenzierung im Rahmen der Angiogenese vorübergehend CD103 bilden. Eine Zusammenstellung weiterer Publikationen zur Expression von CD103 findet sich in nachfolgender Tabelle.

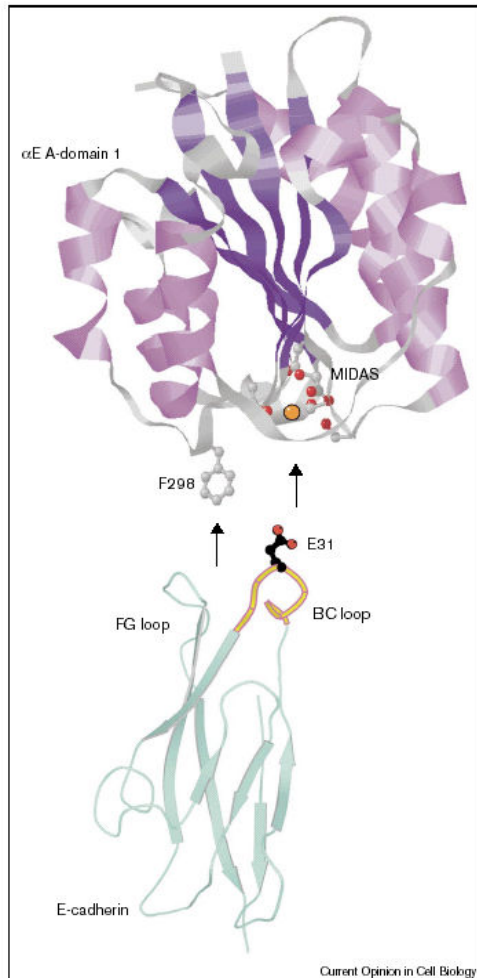
**Tab. 1:** CD103 – Expressionsmuster

<b>Gewebe/ Zelltyp</b>	<b>Bedingung</b>	<b>Beobachtungen von CD103-Expression (Referenz)</b>
Humanes Milzgewebe, humane Tonsillen	Physiologisch	<10% der im Gewebe vorkommenden aktivierten oder Memory-CD8+T-Zellen (Hadley et al., 1999; Picker et al., 1990)
Humanes Urothel	Physiologisch	68% der CD8+ T-Zellen im Urothel sowie 62% der LPL sind CD103-positiv (Cresswell et al. 2001)
Humanes Nieren- gewebe	Nephrektomierte Transplantatnieren	52% der intraepithelialen CD8+T-Zellen sind CD103-positiv (Hadley et al., 2001)
Humane Haut	Allogenes Hauttransplantat	20% der extrahierten CD4+CD25+T-Zellen exprimierten CD103 (Zelenika et al., 2002)
Humane Haut	Allogenes Hauttransplantat	20% der extrahierten CD4+CD25+T-Zellen exprimierten CD103 (Zelenika et al., 2002)

<b>Gewebe/ Zelltyp</b>	<b>Bedingung</b>	<b>Beobachtungen von CD103-Expression (Referenz)</b>
Humane Haut	Mycosis fungoides (MF)	Hohe HML-1-Expression auf epidermalen T-Zellen (frühen MF-Stadien), Verlust von HML-1 mit schlechter Prognose (Simonitsch et al., 1994)
Humaner B-Zell-Klon	Haarzelleukämie	CD103 als immunhistochemischer Marker für Haarzelleukämie (Goodman et al., 2003)
Humane Darm-Mukosa	Kolorektales Karzinom mit Mikrosatelliteninstabilität	Erhöhte Anzahl von CD8+CD103+IEL und CD8+CD103-IEL im Vergleich mit mikrosatellitenstabilen Carcinomen, höhere Anzahl von CD103+IEL verglichen mit gesunder Mukosa (Quinn et al., 2003)
Humane Darm-Mukosa	Chronisch entzündliche Krankheiten	Signifikant mehr CD103+LPL bei M. Crohn-Patienten, Korrelation von CD103+IEL mit CD103+LPL bei Pat. mit Colitis ulcerosa (Oshitani et al., 2003); verringerte CD103-Expression auf iIEL entzündlicher und gesunder Darmabschnitte (Elewaut et al., 1998)
Humane T-Zellen in Synovialflüssigkeit	Rheumatoide Arthritis	Erhöhte CD103-Expression in CD8+T-Zellen (Baumgart et al., 1996)
Humane T-Zellen in Speichel- und Tränendrüsen	Sjögren's Syndrom	CD8+T-Zellen in den Drüsenzuzini von Speichel- und Tränendrüsen weisen erhöhte CD103-Expression auf (Fujihara et al., 1999)
Murine APC	Physiologisch	Fast alle interdigitierenden dendritischen Zellen (IDC) von mesenterialen Lymphknoten, 50-60% der IDC von anderen Lymphknoten, nicht bei Langerhans-Zellen der Haut, nicht bei dendritischen Zellen der Milz (Kilshaw et al., 1993)

Shaw et. al. haben 1994 die alphaE-Kette erstmals kloniert und die Primärstruktur aufgeklärt. Dabei stellten sie fest, dass alphaE keiner der bekannten alpha-Ketten-Untergruppen zuzuordnen ist, sondern Eigenschaften von beiden enthält: alphaE weist sowohl eine posttranslationale Spaltung (Fragmente von 150 bzw. 25 kDa) auf als auch eine I-Region. Charakteristisch für die I-Region der alphaE-Kette ist ein Strukturelement, das eine metallionenabhängige Bindungsstelle darstellt (metal-ion-dependent adhesion-site = MIDAS). Eine Bindung des Integrins an seinen Liganden erfolgt nur in Gegenwart von zweiwertigen Kationen (Agace et al., 2000). Die  $\beta 7$ -Untereinheit des HML-1 verfügt ebenfalls über eine MIDAS. Mit gezielten Mutationen an den

Kationenbindungsstellen konnte gezeigt werden, dass die Präsenz von MIDAS sowohl auf der alpha- als auch auf der beta-Kette für eine effektive Ligandenbindung unentbehrlich ist (Higgins et al., 2000). Spezifische Aminosäurereste und hydrophobe Bezirke der alphaE-Kette und des E-Cadherin-Moleküls konnten als weitere Merkmale identifiziert werden, die bei einer Ligandenbindung nach dem Schlüssel-Schloss-Prinzip interagieren (Nagar et al., 1996; Taraszka et al., 2000).



**Abb. 3:** alphaE und sein Ligand E-Cadherin (Agace et al., 2000)

### 2.4.3 Molekulare Mechanismen nach Ligandenbindung

Über die molekularen Mechanismen nach einer Bindung von CD103 an E-Cadherin ist nur wenig bekannt. Rietzler et al. fanden 1998 heraus, dass die intrazellulären Domänen von alphaE und beta7 mit dem WD-Repeat-Protein WAIT-1 interagieren und vermuteten eine Modulation der Zell-Zell-Adhäsion. WD-Repeat-Proteine können unterschiedliche Funktionen haben. Sie wirken unter anderem mit bei der Regulation des Zellzyklus, bei der Signaltransduktion, sie regulieren

die Transkription, sie können beteiligt sein an der Induktion von Apoptose und auch zur Entstehung von Krankheiten beitragen (Li und Roberts, 2001). Weitere Annahmen zu den molekularen Prozessen nach einer Bindung von CD103 an E-Cadherin entspringen der Beobachtung, dass Punktmutationen im E-Cadherin-Gen oder die reduzierte Expression des Zelloberflächenmoleküls zu Dysplasien, genetischen Instabilitäten und einem erhöhtem Risiko für Neoplasien führen (Kilshaw et al., 1999; Tlsty, 2002). Man vermutet, dass das Protein  $\beta$ -Catenin dabei zwischen homotypischer Zell-Adhäsion und Gen-Transkription vermittelt, indem es eine Brücke zwischen der zytoplasmatischen Domäne von E-Cadherin und dem Zytoskelett bildet. Auf diese Weise kann die Konzentration an freiem  $\beta$ -Catenin im Zytoplasma verringert werden. Liegt zuviel  $\beta$ -Catenin in ungebundener Form vor, wird es vermehrt in den Zellkern transportiert und aktiviert Transkriptionsfaktoren von Genen, die an einer onkogenen Progression beteiligt sein können. Die Präsenz von CD8+CD103+T-Zellen in epithelialen Verbänden versteht man als Störfaktor in diesem System, bei dem die intrazytoplasmatische Blockade von  $\beta$ -Catenin beeinträchtigt werden kann.

#### **2.4.4 Allgemeine Funktionen des Integrins CD103**

Mit Blick auf die jeweils analysierten Expressionsmuster hat man CD103 eine zentrale Funktion bei der Aufrechterhaltung der immunologischen Barriere in den Schleimhäuten zugeschrieben. Das gilt insbesondere für die Darmmukosa, wo das Integrin in einem hohen Anteil der CD8+T-Zellen nachweisbar ist und der Ligand E-Cadherin stark exprimiert wird. Cepek et al. berichteten 1993 und 1994, dass CD103 eine Adhäsion von T-Zellen an epitheliale Zellen vermittelt und kostimulatorische Signale für eine intraepitheliale Proliferation und Aktivierung (Begue et al., 1995; Karecla et al., 1995) sowie für eine effektive lytische Aktivität (Robertson et al., 1993; Rostapshova et al., 1998, Higgins et al., 1998) von T-Effektorzellen liefert.

Eine Mitwirkung von CD103 bei der Extravasation von Lymphozyten wird in der Mehrzahl der Studien nicht belegt (Cepek et al., 1993 und 1994). Lediglich Strauch et al. berichteten 2001 von einer E-Cadherin-unabhängigen Adhäsion von CD103+ T-Zellen an Endothelzellen intestinaler Gefäße. Analysen zur Rolle von CD103 bei Transplantatabstossungen konnten diese Tendenz bestätigen (Feng et al., 2002). Es wurde gezeigt, dass sich  $\alpha E^{-/-}$  CD8+T-Effektorzellen ungehindert aus den Gefäßen zu transplantierten Inselzellen bewegen konnten. Unbestritten ist der Beitrag von CD103 bei der Retention von zytotoxischen T-Zellen in verschiedenen

Schleimhäuten, was insbesondere in Versuchen mit alphaE-Knockout-Mäusen gezeigt werden konnte (Schoen et al., 1999).

Neben der Expression von CD103 durch CD8+T-Effektorzellen wurde das Integrin auch auf einer Subpopulation von potenten CD4+CD25+ regulatorischen T-Zellen gefunden (Lehmann et al., 2002; Banz et al., 2003). Die wesentlichen Funktionen von regulatorischen T-Zellen bestehen in einer Hemmung der Proliferation von Lymphozyten und in einer Hemmung der Synthese proinflammatorischer Zytokine. Man hat sowohl in-vitro als auch im Mausmodell festgestellt, dass CD103+CD25+CD4+T-Zellen z.B. bei entzündlichen Darmerkrankungen über eine Regulierung der IL-10-Sekretion inflammatorische Mechanismen kontrollieren und hemmen können. Wood und Sakaguchi (2003) diskutieren CD103 als möglichen Marker für eine CD4+T-Zellpopulation, von der man annimmt, dass sie wichtige Funktionen bei der Induktion von Toleranz gegenüber Transplantaten ausübt. Weiterhin konnte gezeigt werden, dass TGF- $\beta$  (Transforming growth factor  $\beta$ ), ein Zytokin, das die CD103-Expression induzieren kann, auch eine Umwandlung von nicht-regulatorischen CD4+T-Zellen in den regulatorischen Phänotyp bewirken kann (Chen et al., 2003). Die zugrundeliegenden möglichen immunologischen Mechanismen sind bisher nicht aufgeklärt. Man vermutet einen Beitrag von CD103 zur Aufrechterhaltung der Selbst-Toleranz des Organismus sowie eine Mitwirkung bei der Entwicklung von langfristiger Toleranz gegenüber Organtransplantaten.

<b>Tab. 2:</b> Zusammenfassung von Daten zu CD103	
Synonyme	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Integrin <math>\alpha</math>E, <math>\alpha_{IEL}</math>, <math>\alpha_{M290}</math>, OX62, MLA</li> <li>• alphaE zusammen mit beta7-Kette: HML-1-Antigen (Human Mucosal Lymphocyte-Antigen)</li> </ul>
Lokalisation und Grösse des Gens	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Chromosom 17p13</li> <li>• 86616 bp, 31 Exons, mRNA nach Splicen: 3858 bp</li> </ul>
Protein	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 1180 Aminosäuren, Molekulargewicht 175 kDa (2 Untereinheiten von 150 bzw. 25 kDa)</li> </ul>
Expression	<ul style="list-style-type: none"> <li>• &gt;95% der intraepithelialen T-Lymphozyten der Darmmukosa (IEL)</li> <li>• 45-50% der Lamina-propria-T-Lymphozyten der Darmmukosa</li> <li>• 2-6% der peripheren Blutlymphozyten</li> <li>• Weitere Subpopulationen von CD8+ bzw. CD4+T-Zellen in epithelialen und nichtepithelialen Geweben</li> </ul>
Ligand	<ul style="list-style-type: none"> <li>• E-Cadherin (Mitglied der Immunglobulin-Superfamilie)</li> </ul>



Funktion	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Homing von T-Lymphozyten in Darmmukosa, Migration und Adhäsion von T-Zellen in Epithelzellverbänden</li> <li>• Modulation von Proliferation und Funktion der IEL</li> <li>• Einfluss auf die Funktion von Epithelzellen via E-Cadherin</li> <li>• Vermutete Rolle bei Aufrechterhaltung von Selbst-Toleranz</li> </ul>
Bezug zu Abstossung von Transplantaten	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Adhäsion von alloreaktiven CD8+T-Zellen an Tubulusepithelzellen und intraepitheliale Retention</li> <li>• Lieferung kostimulatorischer Signale für Proliferation von intra-epithelialen Lymphozyten und für eine Erhöhung der lytischen Aktivität der CD8+ alloreaktiven T-Zellen</li> <li>• Mitwirkung bei Entstehung von chronischer Nephropathie</li> <li>• Vermutete Rolle bei Vermittlung von Toleranz</li> </ul>

#### 2.4.5 Regulation von CD103

In einem Mausmodell wurde nachgewiesen, dass die Expression von CD103 im wesentlichen auf der Ebene der Transkription reguliert wird (Robinson et al., 2001). Der beteiligte Promotor konnte jedoch noch nicht zugeordnet werden.

TGF- $\beta$  wurde als ein zentraler Faktor identifiziert, der die CD103-Expression von T-Zellen hochreguliert (Hadley et al., 1997 und 1999). In Geweben, die chronisch entzündliche Prozesse durchmachen, sowie in Transplantaten, die chronische Abstossungszeichen aufweisen (Suthanthiran et al., 1997), wird TGF- $\beta$  von diversen Zelltypen produziert, z.B. von Epithelzellen (Bernard et al., 1989). Alloreaktive CD8+T-Effektorzellen, die aus sekundären lymphatischen Organen auswandern, weisen noch kein CD103 auf. Erst nach der Migration in das Transplantat erfolgt eine TGF- $\beta$ -induzierte Expression von CD103 (Wang et al., 2004). Die Wirkung von TGF- $\beta$  ist in hohem Masse vom Status der jeweiligen Zielzelle abhängig. So konnte gezeigt werden, dass TGF- $\beta$  die afferente Phase der T-Zellaktivierung erheblich hemmt (Pardoux et al., 1997) und die Produktion von T-Effektorzellen nach Antigenerkennung fast vollständig unterbindet (Hadley et al., 1997). CD8+T-Zellen, die bereits das Integrin alpha4-beta7 exprimieren, führen unter dem Einfluss von TGF- $\beta$  einen alpha-Ketten-Switch durch und assoziieren danach verstärkt die beta7 – Kette mit der alphaE-Kette (Kilshaw et al., 1991). In einer Arbeit von Wong aus dem Jahr 2003 wurde gezeigt, dass ausserdem IL-15, welches z.B. in

Tubulusepithelzellen der Niere während einer akuten Abstossung verstärkt produziert wird, die Expression von CD103 auf CD8+T-Zellen erhöht. Zahlreiche weitere Chemokine und Chemokinrezeptoren sowie weitere Zelloberflächenmoleküle sind Gegenstand aktueller Untersuchungen. Man nimmt heute an, dass die gewebespezifische Mikroumgebung das Ausmass der CD103-Expression und der CD103-abhängigen Effektormechanismen massgeblich reguliert (Feng et al., 2002).

Für die von CD103 vermittelten Funktionen ist nicht nur das Ausmass der Expression, sondern auch die Affinität von Ligand und Rezeptor ausschlaggebend. CD103 bindet in Gegenwart von zweiwertigen Mangan-Ionen hochaffin an E-Cadherin. Ein ähnlich intensives Bindungsverhalten zeigte sich auch bei Calcium-Entzug mit gleichzeitiger Erhöhung der Magnesiumkonzentration, sowie bei einem Crosslinking von T-Zellrezeptoren mittels anti-CD3-Antikörpern und anti-mouse-IgG (Higgins et al., 1998). Verstärkenden Einfluss auf die Bindung von CD103 auf CD8+T-Zellen mit E-Cadherin hat ausserdem die Konzentration von CCL25. CCL25 ist ein Chemokin, das im Dünndarm produziert wird und dessen Rezeptor CCR9 von IEL exprimiert wird (Ericsson et al., 2004).

Als weiteren Aspekt einer Wirkung von TGF- $\beta$  auf die Regulation der Genexpression beobachteten Werkmeister et al. 1998 und Amara et al. 1999, dass TGF- $\beta$  bei entsprechend induzierbaren Genen nicht ausschliesslich die Transkriptionsrate, sondern auch die Stabilität und damit die Halbwertszeit von mRNA erhöhen kann. Ein Crosslinking von Integrinmolekülen  $\alpha 4\beta 1$  auf T-Zellen führt zu einer Verstärkung der CD103-Expression (Rihs et al., 1996). Im Falle anderer typischer Integrine wie CD11a (LFA-1) (lymphocyte function associated antigen -1) oder CD49d (VLA-4) (very late antigen - 4) wird das Ausmass der Expression vom Aktivierungsniveau der Zelle mitreguliert. Während Schieferdecker et al. 1990 und Hadley et al. 1999 postulierten, dass HML-1 nur auf aktivierten T-Zell-Populationen exprimiert wird, zeigen spätere Untersuchungen, dass eine Aktivierung im Falle dieses Integrins für eine Expression eben nicht erforderlich ist (Hadley 2004). Robertson et al. kamen schliesslich 2003 zu dem Schluss, dass CD103 nur auf proliferierenden T-Zellen induzierbar ist.

#### **2.4.6 Funktion von CD103 bei Transplantatabstossungsreaktionen**

CD103 wirkt mit bei der Abstossung von Transplantaten, die über epitheliale Gewebeanteile verfügen, wie z.B. Niere, Lunge, Pankreas und Darm. Bei anderen Organen wie dem Herzen, das

vorwiegend aus Muskelgewebe besteht, hat man bisher keinen signifikanten Beitrag von CD103 festgestellt. In gesundem Nierenparenchym befinden sich keine T-Zellen. Die Tubulitis, also die Anwesenheit von Zellen der Immunabwehr in Tubulusepithelien, ist das spezifische histopathologische Kennzeichen für die Abstossungsreaktion von Transplantatnieren. Hadley et al. konnten 1997 „in vitro“ erstmals eine starke CD103-Expression auf allogenen CD8+T-Effektorzellen in Transplantatnierengewebe (renale Epithelzellpopulationen) feststellen. Im Rahmen von akuten Abstossungen kommen CD8+CD103+T-Zellen nahezu ausschliesslich intratubulär vor, während bei chronischen Transplantatnephropathien diese Zellen sowohl intratubulär als auch im Interstitium nachweisbar sind (Robertson et al., 2001). Ding et al. haben 2003 mittels RT-PCR erstmals semiquantitativ die Konzentration von CD103-mRNA im Urin gemessen und konnten eine signifikante Korrelation zwischen erhöhter CD103-mRNA-Konzentration und histopathologisch bestätigter Abstossungsreaktion feststellen.

Wang et al. zeigten 2004 an einem Mausmodell, bei dem Pankreasinseln unter die Nierenkapsel transplantiert wurden, dass allogene CD8+T-Effektorzellen primär CD103-negativ sind und dieses Integrin erst exprimieren, wenn sie in das Epithel des abzustossenden Organs einwandern. Eine mögliche Ursache sah man im Einfluss einer erhöhten TGF- $\beta$ -Konzentration in dieser Umgebung. Die Ergebnisse einer Studie von Feng et al. aus dem Jahr 2002 zeigen, dass bei der histologischen Untersuchung die Infiltrate rund um die Inselzellen nur zu einem kleinen Teil CD103+ waren. Hieraus wurde gefolgert, dass möglicherweise die T-Zellen nur kurz nach ihrer Einwanderung ins Gewebe CD103 exprimieren, also zu einem sehr frühen Zeitpunkt im Gesamtprozess. Die Vermutung ist, dass weitere an der Abstossung beteiligte Zellen durch einen speziellen „Chemokinmix“ der CD103+T-Zellen attrahiert werden. Andere Studien gehen davon aus, dass die Expression von CD103 durch CD8+T-Zellen vor allem das Kennzeichen einer chronischen Abstossung ist und sich erst nach und nach entwickelt (Robertson et al., 2003; Hadley et al., 2001). Es wird vermutet, dass unter dem Einfluss von IL-15 und TGF- $\beta$  die CD103+T-Zell-Population in einen anti-apoptischen Zustand geraten und auch nach einer akuten Abstossungsperiode intratubulär überdauern.

Der Phänotyp einer CD103-positiven alloreaktiven CD8+T-Zelle wurde von Hadley et al. 2001 wie folgt charakterisiert: CD103+CD8+TCR $\alpha\beta$ +CD62L-CD11a<sup>hi</sup>perforin+. Ein hoher Anteil der CD103+CD8+T-Zellen exprimiert daneben auch HLA-DR. Das Integrin CD103 wirkt mit bei der

Einwanderung von alloreaktiven CD8+T-Zellen in Transplantate, die über epitheliale Gewebeanteile verfügen. Es vermittelt eine Adhäsion an Epithelzellen und fördert die Retention entsprechender T-Zellpopulationen innerhalb dieser Zellverbände (Cepek et al., 1993; Hadley et al., 1997, 1999, 2001, 2004; Robinson et al., 2001; Robertson et al., 2001 und 2003; Feng et al., 2002; Ding et al., 2003; Wang et al., 2004). Man nimmt an, dass CD103 kostimulatorische Signale liefert, die eine Expansion und Aktivierung von T-Zellpopulationen fördern (Begue et al., 1995) und zu einer Verstärkung der zytotoxischen Effektorfunktionen führen (Sarnacki et al., 1992; Roberts et al., 1993; Rostapshova et al., 1998). Feng folgert nach seiner Untersuchung von Inselzelltransplantaten in CD103(-/-)-Mäuse, dass die Hauptfunktion dieses Integrins darin liegt, weitere CD8+T-Zell-Populationen und Entzündungszellen an den Ort des Geschehens zu dirigieren. Detaillierte Kenntnisse darüber, was auf molekularer Ebene nach der Bindung von CD8+CD103+T-Zellen an das auf Epithelzellen exprimierte E-Cadherin konkret passiert und die nachfolgenden Prozesse möglicher verstärkter Zytokinexpression oder anderer T-Zell-Epithelzell-Interaktionen, liegen zur Zeit noch nicht vor und sind Gegenstand aktueller Forschungen.

Ein Beitrag von CD4+CD25+CD103+ regulatorischen T-Zellen und anderer Zellpopulationen zur Entwicklung von Toleranz gegenüber Transplantaten wird derzeit intensiv untersucht (McHugh et al., 2002; Zelenika et al., 2002; Wood und Sakaguchi, 2003). Erkenntnisse über die konkreten Bedingungen, unter denen es in vivo zu einer Toleranzinduktion kommt sowie über die beteiligten molekularen Mechanismen stehen noch aus.

## **2.5 Ziele dieser Arbeit**

In den vergangenen Jahrzehnten konnten durch sorgfältiges HLA-Match und verbesserte immunsuppressive Medikamente deutlich verlängerte Transplantatüberlebenszeiten erreicht werden. Dennoch erleben viele Patienten Abstossungsepisoden, die langfristig mit einer reduzierten Organfunktion einhergehen. Goldstandard bei der Diagnostik ist heute nach wie vor die Nierenbiopsie mit histopathologischer Befundung des Gewebezyllinders - ein invasives Verfahren mit einem Risiko für Nachblutungen, Fisteln oder im Extremfall sogar Organverlust.

Molekularbiologische Methoden stellen ein hilfreiches Instrument dar, mit dem die Präsenz und die Menge an Abstossungsmarkern im Transplantat analysiert werden kann. Durch die

Verwendung des leicht asservierbaren Materials Urin können mögliche Risiken eliminiert werden. Ding et al. haben im Jahr 2003 bereits mit Hilfe einer semiquantitativen RT-PCR festgestellt, dass die CD103-mRNA-Konzentration im Urin mit dem histologisch bestätigten Befund einer akuten Abstossungsreaktion signifikant korreliert. Bei CD103 handelt es sich um ein Integrin auf CD8+T-Effektorzellen, die in einer gesunden Niere nicht vorkommen, jedoch bei akuten und chronischen Abstossungen vorwiegend im Tubulusepithel der Niere akkumulieren. Die zytotoxischen Mechanismen der T-Zell-Antwort führen zu einer Läsion der Epithelzellverbände, sodass CD8+CD103+T-Zellen in den Urin gelangen können und intrazelluläre Transkripte dort nachweisbar werden.

In dieser Arbeit sollte eine quantitative „one-step“ RT-PCR am LightCycler etabliert werden, mit deren Hilfe man absolute mRNA-Konzentrationen von CD103 im Urin messen kann. Zentraler Aspekt ist dabei die Erstellung eines externen mRNA-Standards, der mittels in-vitro Transkription erzeugt wurde und bei der anschliessenden Messung von Patientenproben mitzuführen war. Das Verfahren sollte nach der Etablierung für die Messung von 229 Patientenproben eingesetzt werden. Es handelt sich dabei um Urinproben nierentransplantierte Patienten, die klinische Zeichen einer akuten Funktionseinschränkung ihres Transplantats aufwiesen. Die Messergebnisse sollten anhand der parallel erfassten histopathologischen Befunde validiert werden. Dazu waren Sensitivität und Spezifität zu bestimmen und in einer ROC-Analyse (Receiver Operating Characteristics) statistisch auszuwerten. Ferner sollten positiver und negativer prädiktiver Wert ermittelt werden und eine Einschätzung der CD103-mRNA-Konzentration im Vergleich zu anderen Surrogatparametern wie dem Serumkreatinin erfolgen.

### **3. Material und Methoden**

#### **3.1 Material**

##### **3.1.1 Reagenzien für RNA-Extraktion aus Blut**

- QIAamp™ RNA Blood Minikit Fa. Qiagen, Hilden
- Ethanol, absolut Fa. Merck, Darmstadt
- 2-β-Mercapto-Ethanol Fa. Merck, Darmstadt
- RNase-freies, steriles Wasser (Ampuwa) Fa. Fresenius-Ag, Bad Homburg

##### **3.1.2 Reagenzien für RNA-Extraktion aus Urin**

- QIAamp™ Viral RNA Minikit Fa. Qiagen, Hilden
- Ethanol, absolut Fa. Merck, Darmstadt
- RNase-freies, steriles Wasser (Ampuwa) Fa. Fresenius-Ag, Bad Homburg

##### **3.1.3 Reagenzien für in vitro Transkription und Erstellung der Standardreihe**

- QIAquick™ PCR Purification Kit Fa. Qiagen, Hilden
- Qiagen RNeasy Minikit Fa. Qiagen, Hilden
- Riboprobe in vitro Transcription Systems Fa. Promega, WI, USA
- Primer mit SP6-Promotor Fa. TIB Molbiol, Berlin
- Carrier RNA 1350 µg Fa. Qiagen, Hilden
- 2-β-Mercapto-Ethanol Fa. Merck, Darmstadt
- RNase-freies, steriles Wasser (Ampuwa) Fa. Fresenius, Bad Homburg

##### **3.1.4 Reagenzien für realtime RT-PCR am LightCycler**

- QuantiTECT™ SYBR Green RT-PCR-Kit Fa. Qiagen, Hilden
- Primer CD103 Fa. TIB Molbiol, Berlin
- RNase-freies, steriles Wasser (Ampuwa) Fa. Fresenius, Bad Homburg
- LightCycler®-Kapillaren Fa. Roche, Mannheim
- LightCycler® RNA Amplification Kit SYBR Green I Fa. Roche, Mannheim

### 3.1.5 Reagenzien für Agarosegelelektrophorese

- 50 xTAE (Tris Azetat EDTA) –Puffer (pH 8,5) :
  - 242 g TrisAminohydroxymethan (Tris-Base) Fa. Sigma, Deisenhofen
  - 57,1 ml Eisessig Fa. Merck, Darmstadt
  - 100 ml EDTA (0,5 M, pH 8,0) Fa. Sigma, Deisenhofen
  - ad 1000 ml Aqua bidest
- Gel-Ladepuffer:
  - 12,5 ml Ficoll 400 Fa. Pharmacia, Freiburg
  - 5 ml Bromphenolblau-Lsg. (0,25 %ig) Fa. Merck, Darmstadt
  - 32,5 ml Aqua bidest
- Agarose ultra pur Fa. GIBCO BRL, Eggenstein
- Ethidiumbromid-Lösung (10 mg/ml) Fa. GIBCO BRL, Eggenstein
- 25 bp-Molekulargewichtsstandard (1 µg/µl) Fa. Invitrogen, Karlsruhe

### 3.1.6 Sonstiges

- Einweg-Pipettenspitzen (RNase-frei, aerosolresistent) Fa. Biozym, Oldendorf
- 10 µl, 100 µl, 200 µl, 1000µl
- Urin-Röhrchen 10 ml („Monovetten“)  
Fa. Sarstedt, Nümbrecht
- Röhrchen mit Schraubverschluss 15 ml  
Fa. Greiner Bioone, Frickenhausen
- Einweg-Handschuhe, Satin Plus  
Fa. SafeSkin, Californien
- Eppendorf-Reaktionsgefäße 1,5 ml  
Fa. Eppendorf, Hamburg

### 3.1.7 Geräte und Software

- Kühlzentrifuge Mikro 22R  
Fa. Hettich, Tuttlingen
- Kühlzentrifuge CS6KR  
Fa. Beckmann Instr., Californien
- Elektrophoresekammer GNA 100  
Fa. Pharmacia, Freiburg
- Electrophoresis Power Supply EPS 600  
Fa. Pharmacia, Freiburg
- Heizblock TCR 100  
Fa. Roth, Karlsruhe
- LightCycler™-Instrument  
Fa. Roche, Mannheim
  - LightCycler-Software Ver. 3.5:
  - LC3 Front V. 3.5.17

- LC3 Run V. 5.32
- LC3 Data Analysis 3.5.28
- Graphworks 10.0.7
- Mikrowellenherd Fa. Bauknecht
- Feinwaage BP61 Fa. Sartorius, Göttingen
- Rührgerät IKA Combimag RCH Fa. Janke& Kunkel, Staufen
- Photometer Gene Quant Fa. Pharmacia, Freiburg
- UV-Transiluminator Fa. Backhofer, Reutlingen
- Gel-Kamera Fa. Intas, Göttingen
- Intas-Fotosoftware GDS V 1.51 01.2002 Fa. Intas, Göttingen
- Vortex Genie 2 Fa. Scientific Industries, NY, USA

### 3.1.8 Untersuchungsmaterial

#### 3.1.8.1 Charakterisierung des Patientenkollektivs

Das untersuchte Kollektiv besteht aus nierentransplantierten Patienten, die in folgenden Abteilungen der Unikliniken Bonn behandelt wurden: Station Nasse und TPN-Ambulanz (Transplantations-Nachsorge) (jeweils Medizinische Klinik I, PD Dr. R. Woitas), Station TPN (Transplantationsnachsorge, unmittelbar postoperativ, Dr. U. Pöge). Es wurden jeweils 8 ml Urin-Monovetten asserviert und bei – 80 Grad Celsius eingefroren. Das Gesamtkollektiv bestand aus 229 Proben von insgesamt 90 Patienten. Alle Patienten wiesen Zeichen der Transplantatinsuffizienz auf und waren für eine Nierenpunktion vorgesehen. Es handelte sich um 53 Männer und 37 Frauen im Alter von 18 bis 72 Jahren (Median Alter: 44 Jahre). Der Zeitraum zwischen Nierentransplantation und Entnahme der Urinproben variierte von 1 Tag bis zu 19 Jahren (Median 338 Tage - bezogen auf Patienten - bzw. 55 Tage - bezogen auf alle Urinproben). Aus dem Gesamtkollektiv wurden unter folgenden Gesichtspunkten zwei Teilkollektive selektiert. Für die zu prüfende Korrelation von histologisch bestätigter Abstossungsreaktion und Konzentration der CD103-mRNA im Urin wurde eine Probenentnahme innerhalb von 24 Stunden vor der Nierenpunktion angestrebt. Für eine Beurteilung der CD103-mRNA-Konzentrationsänderungen im Verlauf einer Abstossungsreaktion wurden bei einzelnen Patienten über einen Zeitraum von mehreren Tagen bzw. Wochen nach Transplantation weitere Urinproben



gewonnen. Für die Evaluation der Methode ergab sich danach ein Kollektiv von 55 Patienten mit insgesamt 82 Proben. Für die Betrachtung der Verläufe der CD103-mRNA-Konzentration nach Transplantation wurden 5 Patienten (3 Männer, 2 Frauen) selektiert, die jeweils 7 bis 15 Urinproben lieferten. Parallel zu Urinprobenentnahme und Nierenpunktion wurden folgende laborchemische Parameter erhoben:

Serumwerte: Kreatinin, Harnstoff, sowie – falls bestimmt – Cystatin C,  $\beta$ 2-Mikroglobulin,  $\beta$ -trace-Protein.

Urinwerte: Kreatinin in mg/dl und mg/24 h, Gesamteiweiss in mg/dl, mg/g Krea und mg/24 h, Mikroalbumin in mg/l und mg/24h,  $\beta$ 2-Mikroglobulin, Bakterien, Nitrit.

Sonstige Werte: Glomeruläre Filtrationsrate (GFR), Clearance. Ausserdem wurde die immunsuppressive Dauertherapie erfasst.

### **3.1.8.2 Patientengruppierung**

Für die Evaluation der „one-step“ RT-PCR wurde das Patientenkollektiv in folgende Untergruppen eingeteilt:

- Akute Abstossung
- Borderline-Abstossung
- Chronische Transplantatnephropathie
- Abstossung qualitativ (akute Abstossung und Borderline)

### **3.1.8.3 Befundung von Nierenbiopsien: Banff 97 Klassifikation**

Die bei der Nierenpunktion gewonnenen Gewebszylinder werden durch den Pathologen aufgearbeitet und sowohl lichtmikroskopisch als auch elektronenmikroskopisch beurteilt. Je nach Fragestellung können zusätzliche immunhistochemische Färbungen erfolgen.

Für die lichtmikroskopische Beurteilung von Transplantatnierenbiopsien müssen zahlreiche Kriterien in Betracht gezogen werden, was eine Vergleichbarkeit der Befunde zwischen verschiedenen Pathologen und auch auf internationaler Ebene erschwert. Um die Definition klarer Endpunkte für klinische Studien zu ermöglichen und Therapieempfehlungen besser strukturieren zu können, begann im Jahr 1993 in Banff, Kanada, ein Team aus Pathologen und Klinikern Kriterien zu entwickeln, mit denen eine standardisierte Befundung ermöglicht werden sollte (Solez et al., 1993). Dieser Ansatz ist in den folgenden Jahren kontinuierlich

weiterentwickelt worden. Heute werden Transplantatnierenbiopsien in der Regel anhand der Banff 97 Klassifikation (Racussen et al., 1999) befundet. Um die Kriterien anwenden zu können, werden folgende Anforderungen an die Qualität der Punktionszylinder gestellt: es müssen mindestens 7 Glomeruli und 1 Arterie angeschnitten sein. Es werden 7 Schnitte mit einer Schichtdicke von 3 bis 4 µm verlangt: 3 werden mit HE gefärbt, 3 mit PAS oder Silber und 1 mit Chromfärbung. In der PAS- oder Silberfärbung sind Glomerulitis, Tubulitis und Schäden an tubulären Basalmembranen besser beurteilbar. Ausserdem können Zeichen einer chronischen Nephropathie wie Hyalinablagerungen in Arteriolen, Zunahme der mesangialen Matrix, Doppelkonturierung von glomerulären Kapillaren und verdickte Basalmembranen gut erkannt werden. Die Chromfärbung erleichtert die Beurteilung einer interstitiellen Fibrose. Neben den genannten Punkten sind weitere Beurteilungskriterien die Infiltration des Interstitiums mit mononukleären Zellen, Glomerulopathie, Arteriitis, Intimaverdickung, Tubulusatrophie. Nach einer quantitativen Bewertung jedes Kriteriums ergibt sich ein Score, der schliesslich zur Zuordnung des Nierenbiopsats zu einer der Kategorien führt.

**Tab. 3:** Banff 1997-Klassifikation (modifiziert nach Racussen et al. 1999)

Kategorie	Bedeutung	Histopathologische Befunde
1	<b>Normal</b>	
2	<b>Antikörperbedingte Abstossung</b> A Hyperakut B Akut beschleunigt	Nachweis von Antikörpern, die gegen Antigene des Spenders gerichtet sind. Nachweis, dass Abstossung zumindest teilweise durch Antikörper bedingt ist.
3	<b>Borderline</b>	„verdächtig“ für akute Abstossung: Keine Intima-Arteriitis, aber leichte Tubulitis: max. 4 Mononukleäre Zellen pro Tubulusquerschnitt, 10-25% des Nierenparenchyms betroffen.
4	<b>Akute Abstossung</b> <b>IA</b>  <b>IB</b>	>25% des Nierenparenchyms weist signifikante interstitielle Infiltrate auf, einzelne Foci mit mässiger Tubulitis (>4 mononukleäre Zellen pro Tubulusquerschnitt bzw. Gruppen von >10 tubulären Zellen).  >25% des Nierenparenchyms weist signifikante interstitielle Infiltrate auf, einzelne Foci mit mässiger Tubulitis (>10 mononukleäre Zellen pro Tubulusquerschnitt bzw. Gruppen von >10 tubulären Zellen).

<b>4</b>	<b>Akute Abstossung</b> <b>IIA</b>	leichte bis mässige Intima-Arteriitis in mind. 1 Arterienquerschnitt.
	<b>IIIB</b> <b>III</b>	Schwere Intima-Arteriitis mit art. Lumenverlust von >25% in mind. 1 Arterienquerschnitt. Transmurale Arteriitis mit/ohne Fibrinablagerungen sowie Nekrosen glatter Muskelzellen in Media und lymphozytäre Infiltrate in Gefässwänden.
<b>5</b>	<b>Chronische Transplantatnephropathie</b> <b>I (leicht)</b> <b>II (mässig)</b> <b>III (schwer)</b>	Leichte interstitielle Fibrose und Tubulusatrophie mit/ohne Veränderungen, die auf chronische Abstossung hinweisen. mässige interstitielle Fibrose und Tubulusatrophie mit/ohne Veränderungen, die auf chronische Abstossung hinweisen. schwere interstitielle Fibrose und Tubulusverlust mit/ohne Veränderungen, die auf chronische Abstossung hinweisen.
<b>6</b>	<b>Andere Diagnosen</b>	z.B. CyA-Schaden, Virusinfekt, GN, etc.

### 3.1.8.4 Befundung von Nierenbiopsien: Immunhistochemie

Durch immunhistochemische Färbungen lassen sich eine Vielzahl von Proteinen im Cytoplasma, auf Zellwänden oder im Interstitium eines Gewebes mit Hilfe von markierten Antikörpern nachweisen. Spezifische Muster aus positiven immunhistochemischen Markern und ihre Verteilung innerhalb der Gewebestrukturen lassen dabei Rückschlüsse auf die Ätiologie einer Nierenerkrankung zu und tragen wesentlich zur Diagnosestellung bei. Übliche immunhistochemische Färbungen für Nierenpunktionszylinder sind:

<b>Marker</b>	<b>Bedeutung</b>
C3C	Komplementaktivierung
C4D	Komplementaktivierung (Verdacht auf humorale Abstossung)
CD20	B-Zellen
IgG, IgA, IgM	Ablagerungen von diversen Immunglobulin-Klassen
CD45R0	Aktivierte T-Zellen (CD4+ und CD8+ T-Zellen)

CD68	Makrophagen, Monozyten
Fibrinogen, Fibrin	Endprodukte der Blutgerinnung (z.B. bei Gefässläsionen)
HLA-DR	Tubulusepithelzellen in entzündlich aktiviertem Zustand

## 3.2 Methoden

### 3.2.1 Extraktion von RNA aus PBMC

Für die Erstellung eines externen RNA-Standards war es erforderlich, in einem initialen Schritt per RT-PCR eine transkriptionsfähige DNA zu erzeugen. Da in 2-6% der peripheren Blutlymphozyten regelmässig CD103-mRNA vorhanden ist, konnte für diesen Zweck RNA eingesetzt werden, die aus peripherem Blut extrahiert worden war. Für die Extraktion der RNA aus EDTA-Blut wurde das QIAamp RNA Blood Minikit der Fa. Qiagen, Hilden, verwendet. Das Prinzip beruht auf einer selektiven und reversiblen Bindung von RNA-Molekülen ab einer Länge von 200 Basen an eine Silica-Gel-Matrix, die in Form einer Membran in ein Zentrifugenröhrchen integriert ist. Folgende Schritte waren erforderlich:

#### a. Lyse der Erythrozyten

- 1 ml Vollblut wurde mit 5 ml Puffer EL in einem 15 ml Falk-Röhrchen gemischt und 15 min. auf Eis inkubiert, zwischendurch 2 mal kurz vortexen.
- Das Gemisch wurde bei 400 x g für 10 min. bei 4 Grad Celsius zentrifugiert, anschliessend den Überstand vollständig abgiessen.
- 2 ml Puffer EL auf das verbleibende Zellpellet geben, Zellen durch kurzes Vortexen wieder in Suspension bringen.
- Bei 400 x g für 10 min. bei 4 Grad Celsius zentrifugieren, anschliessend den Überstand vollständig abgiessen.

#### b. Lyse der Leukozyten

- 5 ml Buffer RLT mit 50 µl β-Merkaptoethanol mischen, 600 µl des RLT-Puffers zum Leukozyten-Pellet geben und kurz vortexen.
- Lysat vollständig in einem Schritt auf die QIAshredder spin column pipettieren. Anschliessend 2 min. bei höchster Geschwindigkeit zentrifugieren. Spin Column verwerfen, Filtrat aufheben.

- 600 µl 70% Ethanol zum Lysat geben, zum Mischen mehrfach mit Pipette aufziehen, nicht zentrifugieren.

### c. Gewinnung der RNA mittels QIAamp Spin Column

- Gemisch und eventuell vorhandenes Präzipitat vollständig auf die Membran einer QIAamp™ Spin Column überführen und für 15 sec. bei 10 000 rpm zentrifugieren. Filtrat verwerfen, Säule in ein frisches 2ml – Gefäß einsetzen.
- 700 µl Puffer RW1 zufügen, 15 sec. bei 10000 rpm zentrifugieren, Filtrat mit Gefäß verwerfen, Säule in ein frisches Gefäß einsetzen.
- RPE-Puffer mit Ethanol versetzen: 5 ml RPE-Puffer und 20 ml Ethanol mischen.
- 500 µl RPE-Puffer auf die Säule pipettieren und erneut 15 sec. bei 10000 rpm zentrifugieren. Filtrat und Gefäß verwerfen. Säule in frisches Gefäß einsetzen.
- 500 µl RPE-Puffer auf die Säule pipettieren, 3 min. bei 14000 rpm zentrifugieren, Filtrat und Sammelgefäß verwerfen.
- Säule in frisches 1,5 ml Eppendorf-Cup einsetzen, 50 µl Ampuwa zufügen, 1 min. bei 10000 rpm zentrifugieren.
- Erneut 50 µl Ampuwa auf die Säule geben, nochmals 1 min. bei 10000 rpm zentrifugieren. Säule verwerfen.
- Im Filtrat befindet sich die extrahierte RNA.

[Für weitere Details siehe Handbuch zum QIAamp RNA Blood Mini Kit.]

### **3.2.2 Extraktion von Gesamt-RNA aus Urin**

Die Urinproben wurden nach Entnahme unverzüglich bei – 80 °C eingefroren. Für die Aufbereitung wurden die Urinproben später bei Zimmertemperatur langsam aufgetaut, um eine Aktivierung von ubiquitären RNAsen zu verhindern. Nach dem Umfüllen der Urinproben in 15 ml Falcon-Röhrchen erfolgte ein Zentrifugierschritt für 20 min. bei 1400 rpm in einer auf 4 Grad gekühlten Zentrifuge. Für die RNA-Extraktion wurde das QIAamp Viral RNA Mini Kit verwendet. Dabei kommen spezielle Zentrifugenröhrchen zum Einsatz, bei denen die vorher durch eine Lyse der Zellen freigesetzten RNA-Moleküle an eine integrierte Silica-Gel-Membran binden. Es erfolgen mehrere Waschschrte, durch die alle anderen Partikel entfernt werden, bis

abschliessend die auf der Membran gebundenen RNA-Moleküle eluiert werden können. Im Einzelnen wurden folgende Schritte durchgeführt:

a. Zell-Lyse

- AVL-Puffer vorbereiten: Mit 1 ml AVL-Puffer die lyophilisierte carrier-RNA auflösen, anschliessend gesamtes Lysat in den AVL-Puffer überführen.
- Vorlegen von 560 µl AVL-Puffer in ein 1,5 ml Eppendorfgefäss.
- Abgiessen des Urin-Überstandes aus den zentrifugierten Falk-Röhrchen bis auf ca. 140 µl.
- Verbleibende 140 µl mit Pipette mehrfach aufziehen und entlassen, bis sich vorhandenes Pellet mit Flüssigkeit vermischt hat.
- 140 µl in den vorgelegten AVL-Puffer überführen.
- Gründlich vortexen und 10 min. inkubieren (Raumtemperatur: 15-25 Grad Celsius).
- Kurz anzentrifugieren.
- 560 µl Ethanol zugeben, vortexen.
- Erneut kurz anzentrifugieren.

b. Bindung der RNA an Membran der QIAamp™ Spin Column und Waschschr

- 630 µl der Flüssigkeit auf eine vorbereitete QIAamp Spin Column pipettieren und bei 8000 rpm für 1 min. zentrifugieren, Filtrat verwerfen. Säule in neues Gefäss einsetzen. Diesen Schritt wiederholen.
- 500 µl Waschpuffer AW1 auf die Säule pipettieren, wiederum für 1 min. bei 8000 rpm zentrifugieren, Filtrat verwerfen, Säule in neues Gefäss einsetzen.
- 500 µl von Waschpuffer AW2 auf die Säule pipettieren, dann für 3 min. bei 14000 rpm zentrifugieren und Filtrat verwerfen.
- Säule in frisches Eppendorf-Gefäss setzen und nochmals 1 min. bei 14000 rpm zentrifugieren. Eppendorf-Gefäss mit Filtrat verwerfen.

c. Eluieren der membrangebundenen RNA

- Säule nun in beschriftetes frisches Eppendorf-Gefäss setzen und 60 µl AVE-Puffer zugeben, möglichst in die Mitte der Membran. 1 min. bei Raumtemperatur inkubieren.
- Säule im Eppendorf -Gefäss bei 8000 rpm für 1 min. zentrifugieren.

- Säule verwerfen, Lagerung ab hier auf Eis, Filtrat wurde auf 5 Aliquots aufgeteilt und erneut bei – 80 Grad Celsius eingefroren.

[Für weitere Details siehe Handbuch zum QIAamp Viral RNA Mini Kit.]

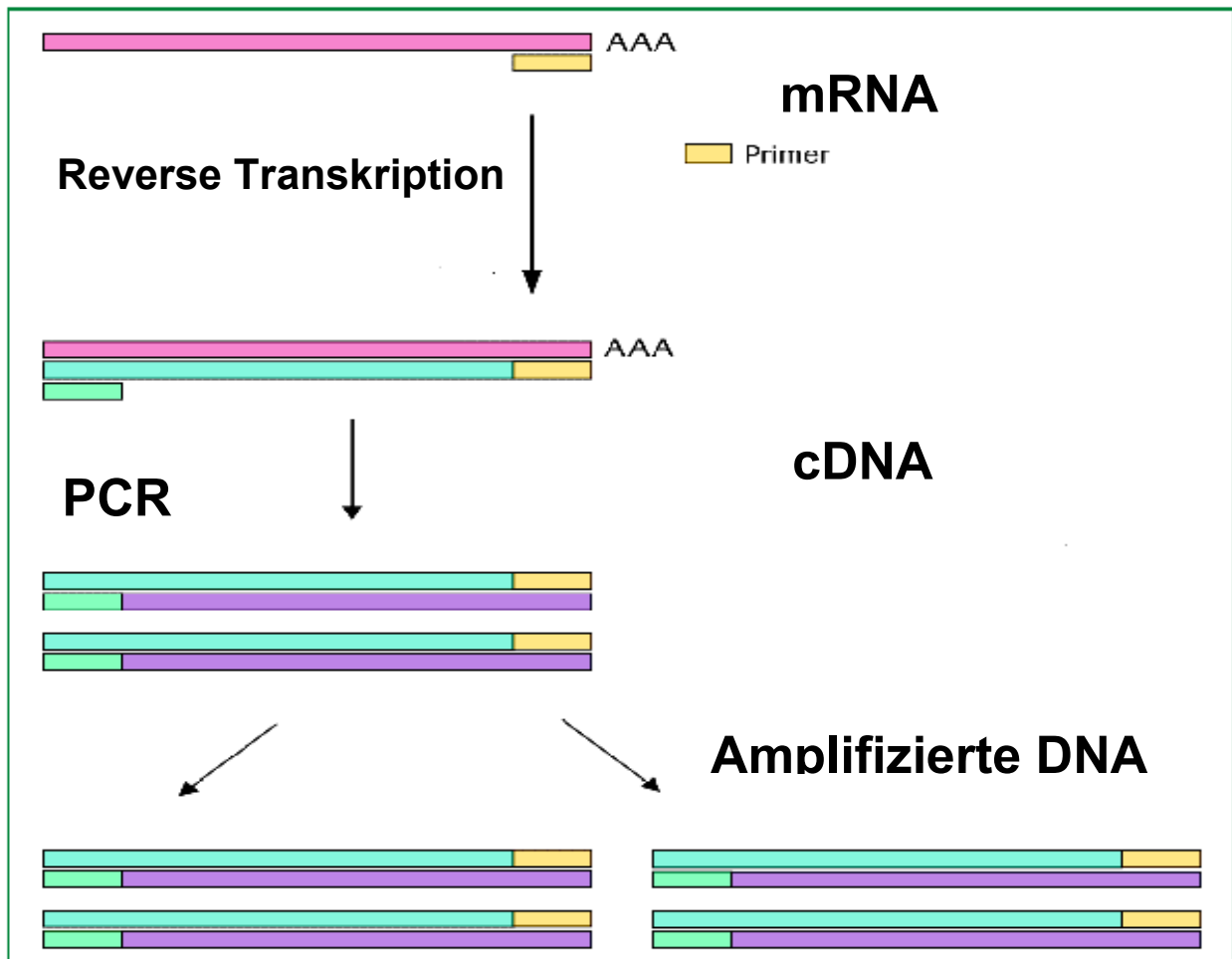
### 3.2.3 Allgemeines zur PCR

Mit Hilfe der Polymerasekettenreaktion (PCR) ist es möglich, definierte DNA-Abschnitte sequenzspezifisch zu vervielfachen und zu analysieren (Mullis und Faloona, 1987). Dabei werden Oligonukleotidprimer verwendet, die den gewünschten DNA-Abschnitt begrenzen indem sie sich gegenläufig an komplementäre Doppelstrang-DNA anlagern. Eine DNA-abhängige Polymerase synthetisiert in 5'-3'-Richtung jeweils den Gegenstrang. Jeder PCR-Zyklus besteht aus 3 Schritten: Zunächst wird durch eine Temperaturerhöhung auf ca. 95 Grad Celsius der DNA-Doppelstrang geschmolzen, d.h. die Wasserstoffbrückenbindungen zwischen den komplementären Basenpaaren werden gelöst und die DNA liegt in zwei Einzelsträngen vor. Danach erfolgt bei einer niedrigeren Temperatur (ca.50-65 Grad) das Anlagern der Oligonukleotidprimer. Letzter Schritt eines PCR-Zyklus ist die Synthese der jeweiligen Gegenstränge durch die DNA-Polymerase bei ca. 72-75 Grad Celsius. Bei vielen Protokollen werden 30 bis 40 Zyklen durchlaufen, wobei jeder Zyklus idealerweise einer Verdopplung der vorhandenen DNA-Moleküle entspricht. Durch die exponentielle Kinetik kann eine hohe Anzahl von Ziel-DNA-Molekülen erzeugt werden, die anschliessend mittels Agarosegelelektrophorese, Sequenzierungen oder weiteren Techniken analysiert und ausgewertet werden.

### 3.2.4 Allgemeines zur RT-PCR

Bei der Untersuchung von immunologischen Prozessen ist von zentraler Bedeutung, welche Gene zu welchem Zeitpunkt exprimiert werden. Eine Möglichkeit zur Analyse der Genexpression besteht in der Untersuchung der jeweils vorliegenden mRNA. Liegt als Ausgangsmaterial für die PCR nicht DNA sondern RNA vor, ist als zusätzlicher Schritt vor der PCR eine Reverse Transkription erforderlich. Dabei synthetisiert eine RNA-abhängige DNA-Polymerase zur vorliegenden RNA einen komplementären cDNA-Einzelstrang. Dieser dient dann als Template für die anschliessenden Amplifikationszyklen. Rappolee et al. analysierten 1988 mRNA für Wachstumsfaktoren von Wundmakrophagen und etablierten eine der ersten RT-PCR. Die RT-

PCR ist ein komplexer Vorgang, bei dem die zahlreichen Reagenzien miteinander in Wechselwirkung treten und die Qualität der Ergebnisse beeinflussen können. Daher wurden mit Blick auf spezifische Anwendungen in der Vergangenheit unterschiedlichste Verfahren entwickelt.



**Abb. 4:** Schema einer RT-PCR (modifiziert nach Bustin, 2000)

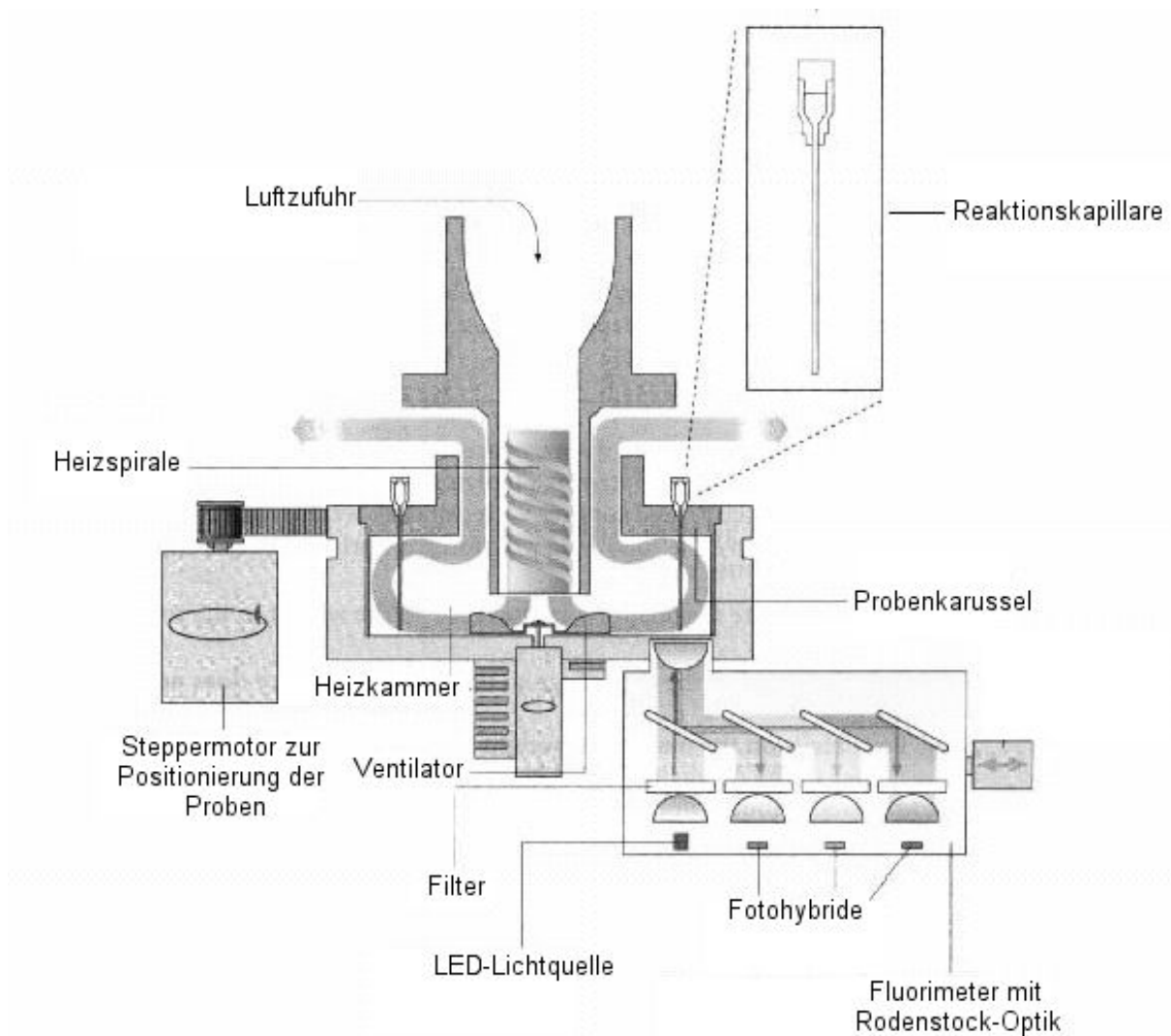
Für die beabsichtigte Quantifizierung von mRNA aus Urin wird in dieser Arbeit eine „one-step“ RT-PCR am LightCycler entwickelt, die durch folgende Eigenschaften gekennzeichnet ist: Alle erforderlichen Reagenzien können in einem Schritt zusammenpipettiert werden. Ein zwischenzeitliches Öffnen der Reaktionsgefäße nach dem Schritt der Reversen Transkription ist nicht erforderlich, wodurch das Risiko einer Kontamination vermindert wird. Zusätzlich ermöglicht der Einsatz der LightCycler-Technologie durch die kontinuierliche Präsentation von Zwischenergebnissen eine rasche Diagnosestellung. Ein Nachteil der „one-step“ RT-PCR besteht darin, dass man keine Kontrolle über die Menge der während der Reversen Transkription entstandenen cDNA hat. Bereits geringe Schwankungen in dieser Phase durch beispielsweise



veränderte Enzymaktivitäten können wegen der exponentiellen Kinetik des anschließenden PCR-Amplifikationsschrittes die Ergebnisse stark beeinflussen.

### 3.2.4.1 Aufbau und Funktionsweise des LightCyclers

Die Abbildung 5 zeigt einen schematischen Querschnitt durch das LightCycler Instrument.



**Abb. 5:** Schematischer Querschnitt durch das LightCycler-Gerät (modifiziert nach LightCycler Operator's Manual)

In dem Probenkarussell des LightCycler-Gerätes können bis zu 32 Glaskapillaren mit einem Reaktionsansatz von maximal 20  $\mu\text{l}$  untergebracht werden. Die Kapillaren schweben in einer Reaktionskammer, die durch eine Heizspirale aufgeheizt wird. Durch ein besonders günstiges Verhältnis von Volumen zu Oberfläche der Glaskapillaren sowie durch die Verwendung von Materialien mit geringer Wärmekapazität erreicht der LightCycler Aufheiz- und

Abkühlgeschwindigkeiten von bis zu 20 Grad pro Sekunde. Der Ventilator sorgt dabei für eine rasche und gleichmässige Verteilung der angesaugten Luft. Mit Hilfe eines „Stepper motors“ werden die Kapillaren über eine Messoptik bewegt. Eine lichtemittierende Diode regt die Fluoreszenzfarbstoffe zur Abgabe von Fluoreszenz an. Die Fluoreszenz wird über die Spitze der Kapillare gebündelt nach unten wieder abgegeben und über ein System aus Spiegeln und wellenlängenspezifischen Leitern an ein Fluorimeter weitergeleitet. Hier erfolgt die Umwandlung des optischen Signals in ein elektrisches Signal, das direkt über die serielle Schnittstelle zum PC weitergeleitet wird. Auf diese Weise können bei der realtime-PCR die Zwischenergebnisse nach jedem Zyklus ständig verfolgt werden.

#### **3.2.4.2 Realtime-RT-PCR mit dem LightCycler**

Die LightCycler-Technologie und die Eigenschaften der verwendeten Reagenzien ermöglichen die Durchführung einer quantitativen „one-step“ RT-PCR mit einer kontinuierlichen Präsentation von Zwischenergebnissen nach jedem Zyklus (=Realtime) (Wang et al. 1989; Wittwer et al. 1990, 1991). In dieser Arbeit wurde das QuantiTect™ SYBR Green RT-PCR-Kit der Fa. Qiagen, Hilden verwendet. Bei diesem Kit finden zunächst zwei Reverse Transkriptasen Verwendung, die während der ersten 20 Minuten bei 50 Grad cDNA synthetisieren. Bei dieser Temperatur liegt die für die anschliessende Amplifikation benötigte DNA-Polymerase noch im nicht aktiven Zustand vor, womit eine vorzeitige DNA-Synthese vermieden werden kann. Erst durch einen gesonderten Programmschritt nach Abschluss der Reversen Transkription (15 min. bei 95 Grad) gelangt die DNA-Polymerase in ihren aktiven Zustand und kann ihre Syntheseleistung während der Amplifikation erbringen.

#### **3.2.4.3 Produktdetektion mit SYBR Green**

Bei SYBR Green handelt es sich um einen sequenzunabhängigen Fluoreszenzfarbstoff, der die Eigenschaft besitzt, doppelsträngige DNA zu interkalieren. Solange SYBR Green frei in Lösung vorliegt, wird keine oder nur geringe Fluoreszenz emittiert. Hat sich der Farbstoff jedoch in die „Furche“ zwischen den DNA-Doppelsträngen eingelagert, erhöht er seine Fluoreszenz um ein Vielfaches. Die messbare Fluoreszenz ist also direkt proportional zur vorhandenen doppelsträngigen DNA (Wittwer et al., 1997).

#### **3.2.4.4 Schmelzkurvenanalyse**

Der LightCycler bietet die Möglichkeit, im Anschluss an den Amplifikationsschritt eine Schmelzkurve zu erstellen. Das Fluoreszenzsignal des SYBR Green wird nur emittiert, wenn DNA als Doppelstrang vorliegt. Durch ein systematisches Erhöhen der Temperatur um 0,1 Grad pro Sekunde im Bereich von 70 bis 95 Grad lässt sich genau diejenige Temperatur feststellen, bei der das Amplifikat aufgeschmolzen wird. Dann nämlich weist die Fluoreszenzkurve einen steilen Abfall auf. Im LightCycler wird die Schmelzkurve dargestellt als negative Steigung der Fluoreszenzkurve (1. Ableitung), sodass der Peak der Schmelzkurve der Temperatur entspricht, bei der die Fluoreszenz ihren stärksten Intensitätsabfall zeigt. Die Schmelztemperatur  $T_m$  hängt von der Ionenzusammensetzung des Puffers, von der Länge und vor allem von der Nukleotidzusammensetzung der DNA-Moleküle ab. C-G-Basenpaarungen benötigen für die Lösung ihrer 3 Wasserstoffbrückenbindungen einen höheren Energieaufwand als A-T-Basenpaarungen mit ihren 2 Wasserstoffbrückenbindungen. Die Schmelztemperatur  $T_m$  ist hochspezifisch und somit für die Identifikation des gewünschten Amplifikats geeignet. Eine Agarosegelelektrophorese ist nicht mehr in jedem Fall erforderlich. Mit der Schmelzkurvenanalyse lässt sich auch die Bildung von Primerdimeren feststellen. Es handelt sich dabei um kleinere Peaks, die bereits bei niedrigeren Temperaturen auftreten. Ein weiterer wesentlicher Vorteil der Schmelzkurvenanalyse ist die Möglichkeit, eine geeignete Messtemperatur für weitere Läufe festzulegen. Es wird üblicherweise eine Messtemperatur gewählt, die ca. 3 Grad unterhalb des  $T_m$  liegt, bei der das Amplifikat noch zum grössten Teil als Doppelstrang vorliegt.

#### **3.2.4.5 Prinzip der Quantifizierung**

Bei der zu etablierenden realtime RT-PCR wird für die Quantifizierung ein externer Standard verwendet. Dazu werden bekannte Konzentrationen der zu messenden RNA über 5 bis 8 log-Stufen ( $10^{-3}$  bis ca.  $10^{-9}$  ng/ $\mu$ l) einer RT-PCR unterzogen. Die LightCycler-Software registriert bei jeder Probe den Threshold-Cycle ( $C_T$ ), das ist der Zyklus, bei dem der Anstieg der messbaren Fluoreszenz in die loglineare Phase übergeht. Aus den  $C_T$ s bei den jeweiligen Verdünnungsstufen errechnet die LightCycler-Software eine Regressionsgerade, die exportiert werden kann und für die spätere Messung von Proben mit unbekannter RNA-Konzentration zugrunde gelegt wird.

### 3.2.5 Erstellung eines externen mRNA-Standards für CD103

Um die mRNA-Konzentration von CD103 in Urinproben messen zu können, war es erforderlich, eine Standardreihe mit bekannten CD103-mRNA-Konzentrationen zu erzeugen und mit der „one-step“ RT-PCR am LightCycler zu messen. Anhand dieser Standardreihe wurden anschliessend die CD103-mRNA-Konzentrationen der Patientenurine gemessen. Dazu waren folgende Schritte nötig:

- Erzeugen eines transkriptionsfähigen PCR-Produkts, d.h. es wurde ein CD103-Sense-Primer eingesetzt, an dessen 5'-Ende die Sequenz eines SP6-Promotors angehängt worden war.
- Aufreinigen des PCR-Produkts.
- In vitro Transkription.
- Aufreinigen der erzeugten RNA.
- Photometrische Bestimmung des RNA-Gehalts.
- Erzeugen einer Stammlösung mit CD103-mRNA-Konzentration von 0,5 ng/μl.
- Erzeugen einer Standardreihe mit RNA-Konzentrationen von  $10^{-1}$  bis  $10^{-10}$  ng/μl.
- „one-step“ RT-PCR laufen lassen und Parameter optimieren.
- „Sauberen“, reproduzierbaren und mehrfach getesteten Lauf als externen Standard exportieren.

#### 3.2.5.1 Erzeugen einer transkriptionsfähigen DNA

In 2-6 % der PBMC-Zellen liegt regelmässig CD103-mRNA vor. Daher war zu erwarten, dass bei einem ersten PCR-Lauf mit dem gewählten Primerpaar unter Verwendung eines Templates von PBMC-RNA ein entsprechendes Amplifikat entsteht. Bei der angestrebten in-vitro Transkription sollte eine SP6-RNA-Polymerase eingesetzt werden, was die Anwesenheit eines SP6-Promotors auf dem abzulesenden DNA-Strang voraussetzt. Aus diesem Grund wurde der sense-Primer am 5'-Ende jeweils um die Sequenz eines SP6-Promotors ergänzt. Das so erzeugte Amplifikat enthielt den spezifischen Promotor, an den die SP6-RNA-Polymerase binden konnte, um die Synthese der Ziel-RNA in 5'-3'-Richtung zu katalysieren.

**Verwendete CD103-Primersequenzen:****Primer-Paar 1/1** (nach Ding et al., 2003)

Sense 5'- CGTGCTCAGCTCCCTTCTG - 3' Position: 233-251  
 Antisense 5' - CCT GGT GTC CTC TTG GTT CTG – 3' Position: 319-299  
 Sense+SP6 5' – ATTTAGGTGACACTATAGAATAACCGTGCTCAGCTCCCTTCTG– 3'  
 Genbank Nummer NM002208, Länge des Amplifikats: 87 bp

**Primer-Paar 2/2**

Sense 5' – CGCTTTCAATGTGGATGTGG – 3' Position: 176-195  
 Antisense 5' - TCT TGG TTC TGG GGC TGG – 3' Position: 309-292  
 Sense+SP6 5'-ATTTAGGTGACACTATAGAATAACCGCTTTCAATGTGGATGTGG- 3'  
 Genbank Nummer NM002208, Länge des Amplifikats: 134 bp

**Primer-Paar 2/1**

Sense 5' – CGCTTTCAATGTGGATGTGG – 3' Position: 176-195  
 Antisense 5' - CCT GGT GTC CTC TTG GTT CTG – 3' Position: 319-299  
 Sense+SP6 5'-ATTTAGGTGACACTATAGAATAACCGCTTTCAATGTGGATGTGG- 3'  
 Genbank Nummer NM002208, Länge des Amplifikats: 144 bp

**Primer-Paar 3/3**

Sense 5' – GTGTCGCAGAATTACAGTTG – 3' Position: 2611-2630  
 Antisense 5' – TAATTCAAGGCCATGCTTGTC – 3' Position: 2646-2626  
 Sense+SP6 5'-ATTTAGGTGACACTATAGAATAACGTGTCGCAGAATTACAGTTG-3'  
 Genbank Nummer NM002208, Länge des Amplifikats: 136 bp

Pro Kapillare wurden folgende Komponenten eingesetzt (alle Reagenzien auf Eis halten):

**a) PCR-Mix ansetzen aus (Anzahl Templates plus Negativkontrolle plus Reserve):**

SYBR Green	10 µl
H <sub>2</sub> O	5,8 µl
Primer (je 0,5 µM)	2 µl (Sense mit SP6 / Antisense)
RT-Mix	0,2 µl

PCR-Mix gut vortexen.

**b) Kapillaren befüllen**

Die gewünschte Anzahl Kapillaren wird in den Kühlblock eingesetzt. In jede Kapillare 18 µl PCR-Mix einpipettieren, danach je 2 µl Template hinzufügen und die Kapillare mit Plastikstöpsel verschliessen. Anschliessend die Kapillaren mit ihren Metallhalterungen in Zentrifuge einsetzen und bei 2000-3000 rpm kurz anzentrifugieren (Inhalt gelangt in den unteren Kapillarbereich).

### c) LightCycler-Lauf starten

Die Kapillaren wurden in das LightCycler-Karussell eingesetzt. Die Parameter Annealingtemperatur, Länge des Elongationsschritts und Messtemperatur wurden bei diesem initialen Lauf willkürlich gewählt, da vor dem ersten Einsatz noch keine Aussagen über das Primerverhalten und die Eigenschaften des Amplifikats möglich waren. Die weiteren Parameter wurden gemäß der Vorgaben des Handbuchs zum QuantiTECT™ SYBR Green RT-PCR-Kit eingestellt.

#### **Laufparameter (Initial):**

1. Schritt:	<u>Reverse Transkription</u>	20 min.	50 Grad
2. Schritt:	<u>Denaturierung</u>	15 min.	95 Grad
3. Schritt:	<u>Amplifikation (40 Zyklen)</u>		
	a) Schmelzen	15 sec.	94 Grad
	b) Annealing	15 sec.	60 Grad
	c) Elongation	12 sec.	72 Grad
	d) Messen	0 sec.	81 Grad
4. Schritt:	<u>Schmelzkurve</u>	0,1 Grad/sec	70-95 Grad
5. Schritt:	<u>Kühlung</u>		40 Grad

Die abschliessende Schmelzkurvenbestimmung zeigte in Abhängigkeit der jeweils verwendeten Primerpaare deutliche Peaks zwischen 82 und 87 Grad Celsius, woraus zu schliessen war, dass ein Amplifikat erzeugt wurde. Mit einer anschliessenden Agarosegelelektrophorese konnte bestätigt werden, dass das Produkt auch der zu erwartenden Größe entsprach (Amplifikatlänge plus SP6-Promotor).

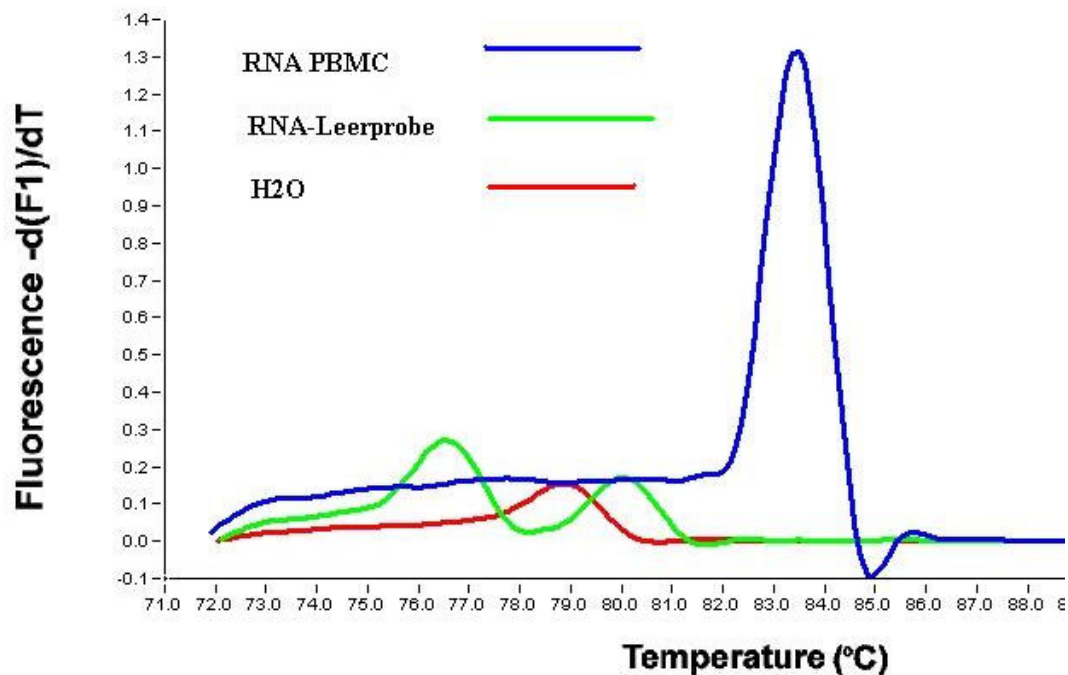


Abb. 6: Schmelzkurve nach initialem LightCycler-Lauf (Erstellung transkriptionsfähiger DNA)

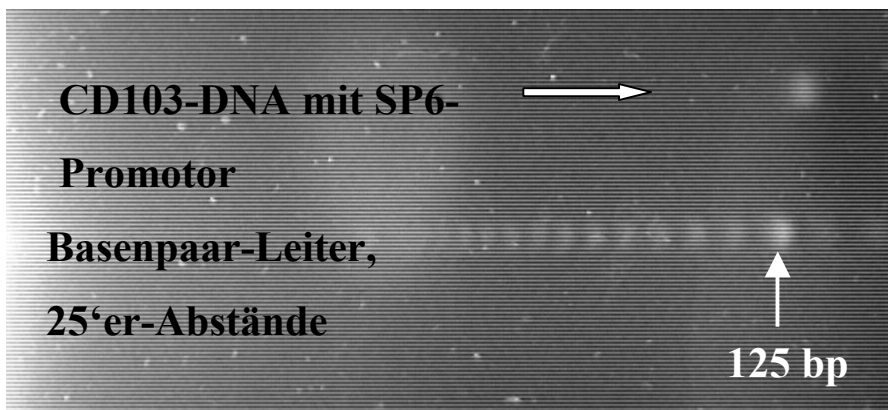


Abb. 7: 2% Agarosegel mit PCR-Produkt aus initialem LightCycler-Lauf

### 3.2.5.2 Aufreinigen des PCR-Produkts

Mit dem Qiaquick PCR Purification Kit erfolgte anschliessend die Aufreinigung des Amplifikats aus dem ersten Lauf. Hierbei werden Primer, Polymerasen, Nukleotide und Salze entfernt. Dazu waren folgende Schritte erforderlich:

- Deckel der LightCycler Kapillaren entfernen und Röhrchen umgedreht in 1,5 ml Eppendorf Cup einsetzen.
- Kurz bis ca. 2000 rpm anzentrifugieren, Kapillare verwerfen.

- 100 µl des Puffers PB mit 20 µl PCR-Produkt mischen.
- QIAquick Spin Column in 2 ml Sammelgefäß einsetzen, das Gemisch auf die Säule aufbringen, für 30-60 sec. zentrifugieren. Filtrat verwerfen, Säule in gleiches Gefäß wieder einsetzen.
- 750 µl Puffer PE auf die Säule pipettieren und für 30-60 sec. zentrifugieren. Filtrat verwerfen, Säule wieder in gleiches Gefäß einsetzen, weitere 60 sec. zentrifugieren.
- Säule in ein sauberes 1,5 ml Eppendorf Cup einsetzen, 50 µl EB-Puffer auf die Membran pipettieren und für 1 min. zentrifugieren.
- Säule verwerfen. Aufgereinigte DNA befindet sich im Filtrat.

### 3.2.5.3 In vitro Transkription

Eine in vitro Transkription von biologisch aktiver RNA unter Verwendung einer SP6-RNA-Polymerase wurde erstmalig von Melton DA und Krieg PA im Jahr 1984 beschrieben. Für die Transkription der CD103-DNA wurde das Kit Riboprobe® in vitro Transcription Systems von der Fa. Promega verwendet. Die mitgelieferte SP6-RNA-Polymerase kann dabei ihre Syntheseleistung erbringen, wenn sie an den zu transkribierenden DNA-Fragmenten die Sequenz eines SP6-Promotors vorfindet und daran binden kann.

Zunächst wurden je 5 µl der bereitgestellten rNTPs gemischt (rATP, rGTP, rCTP, rUTP). Alle weiteren Reagenzien wurden nach folgendem Schema pipettiert (Angaben in µl):

**Tab. 4:** Pipettierschema für die in vitro Transkription von CD103-mRNA (Angaben in µl)

	CD103-DNA	PCR Negativkontrolle	Transkription Negativkontrolle	Transkription Positivkontrolle
5fach Puffer	4	4	4	4
RNAsin	1	1	1	1
DTT	2	2	2	2
rNTPs	4	4	4	4
Polymerase	1	1	1	1
H2O	-	-	8	7
Positivkontrolle	-	-	-	1
Template (DNA)	8	8	-	-
Gesamt µl	20	20	20	20

RNAsin=RNase-Inhibitor; DTT=Dithiothretiol; rNTPs = Ribonukleotidphosphate



Das Ganze wurde gut gemischt und im Heizblock bei 37 Grad 1 Stunde inkubiert. Um die Ursprungs-DNA aus dem Reaktionsansatz zu entfernen, wurde anschliessend in jedes Tube 1  $\mu$ l DNase I pipettiert. Der DNase-Verdau lief für weitere 15 min. bei 37 Grad.

#### **3.2.5.4 Aufreinigen der in vitro erzeugten RNA**

Vor der weiteren Verarbeitung der RNA war es nötig, die übrigen rNTPs, Polymerasen, Salze, DNA-Fragmente etc. aus der Lösung zu entfernen. Für die Aufreinigung wurde das Qiagen RNeasy MiniKit verwendet. Im einzelnen wurden folgende Schritte durchgeführt:

- RNA-Ansatz mit 80  $\mu$ l RNase freiem Wasser mischen (Zielvolumen: 100 $\mu$ l).
- 5 ml RLT-Puffer mit 50  $\mu$ l  $\beta$ -Mercaptoethanol mischen (unter Abzug).
- Puffer RPE vor Verwendung mit der 4fachen Menge Ethanol versetzen.
- Zu dem mit Wasser verdünnten RNA-Ansatz 350  $\mu$ l RLT-Puffer pipettieren und gründlich mischen.
- 250  $\mu$ l Ethanol zur Lösung geben und gründlich mit der Pipette mischen, nicht zentrifugieren.
- Gesamten Ansatz (700  $\mu$ l) auf eine RNeasy Mini Column pipettieren und 15 sec. bei 10000 rpm zentrifugieren. Filtrat und Gefäss verwerfen.
- Säule in ein neues 2 ml Tube überführen und 500  $\mu$ l RPE-Puffer zusetzen. Wiederum 15 sec. bei 10000 rpm zentrifugieren; Filtrat verwerfen, Säule wieder in gleiches Gefäss einsetzen.
- 500  $\mu$ l RPE – Puffer auf die Säule geben und 2 min. bei 10000 rpm zentrifugieren. Tube mit Filtrat verwerfen, Säule in sauberes Tube einsetzen und erneut für 1 min. bei 10000 rpm zentrifugieren.
- Säule in ein frisches 1,5 ml Eppendorf-Gefäss überführen und 50  $\mu$ l RNase freies Wasser auf die Membran pipettieren. 1 min. bei 10000 rpm zentrifugieren. Säule verwerfen.

#### **3.2.5.5 Photometrische Bestimmung des RNA-Gehalts**

DNA und RNA haben ein Absorptionsmaximum bei einer Wellenlänge von 260 nm. Das Lambert-Beer'sche Gesetz sagt aus, dass der Anteil des bei gegebener Wellenlänge absorbierten Lichtes von der Dicke der durchstrahlten Lösung sowie von der Konzentration des gelösten

Stoffes abhängt. Bei einer Schichtdicke von 1 cm und einer Wellenlänge von 260 nm entspricht ein Extinktionswert von 1 einer RNA-Konzentration von etwa 40 µg/ml.

Folgende Schritte wurden für die Messung der RNA-Konzentration durchgeführt:

- Mehrfaches Säubern der Messküvette mit reichlich RNase freiem Wasser.
- Eichen des Photometers mit 100 µl RNase freiem Wasser („set ref“).
- Mischen von 5 µl RNA-Lösung und 95 µl Ampuwa (1:20 Verdünnung), Gemisch in die Messküvette überführen und Messung starten (Absoluter Wert und Relativer Wert = DNA/RNA-Verhältnis).
- Berechnung der RNA- Konzentration nach der Formel:
- $OD_{260} \times 40 \mu\text{g/ml} \times \text{Verdünnungsfaktor} / 1000 = \text{RNA-Konzentration in } \mu\text{g}/\mu\text{l}$

### 3.2.5.6 Erzeugen einer CD103-mRNA-Stammlösung

In Abhängigkeit des photometrisch gemessenen RNA-Gehalts wurde die in vitro erzeugte Lösung auf eine Konzentration von 0,5 ng/µl eingestellt. Das geschah im Blick auf die späteren LightCycler-Läufe, bei denen je 2 µl Template eingesetzt wurden. Folglich konnte man so auf eine Ausgangsmenge von 1 ng pro Kapillare bzw. entsprechende Verdünnungen zurückgreifen. Als Verdünnungsmittel wurde mit carrier-RNA versetztes, RNase freies bidestilliertes Wasser verwendet. Dazu wurden zunächst 1350 µg carrier-RNA mit 1350 µl RNase freiem Wasser gemischt (Zielkonzentration der Stammlösung: 1µg/µl). Dieser Ansatz wurde nochmals 1:50 verdünnt (28 µl der carrier-RNA-Lösung plus 1372 µl RNase freies Wasser, Zielkonzentration: 20 ng/µl) und als Verdünnungsmedium eingesetzt. Die Verwendung von carrier-RNA haltigem Verdünnungsmittel hat mehrere Vorteile. RNA hat die Tendenz, von den Kunststoffwänden des Eppendorfgefäßes adsorbiert zu werden. Sie liegt dann nicht mehr frei in Lösung vor und reduziert so den messbaren RNA-Gehalt, was vor allem bei sehr niedrigen Konzentrationen von grosser Bedeutung sein kann. Ausserdem kann bei möglicher Kontamination der Lösung mit RNAsen der um ein vielfaches höhere Anteil der carrier RNA als Substrat dienen und so die Ziel-RNA vor Zersetzung schützen.

### 3.2.5.7 Herstellen einer CD103-mRNA-Verdünnungsreihe

Aus der CD103-mRNA-Stammlösung mit einer Konzentration von 0,5 ng/µl wurden 10 Verdünnungsstufen hergestellt ( $0,5 \cdot 10^{-1}$  bis  $0,5 \cdot 10^{-10}$  ng/µl). Dazu wurde in 10 Eppendorfgefässe

(1,5 ml) je 45 µl des unter Abschnitt 3.5.6 beschriebenen carrier-RNA-Wassers vorgelegt. Anschliessend wurden 5 µl der Stammlösung à 0,5 ng/µl in das erste Eppendorf-Gefäss überführt (Verdünnung 1:10, Zielkonzentration:  $0,5 \cdot 10^{-1}$  ng/µl). Nach gründlichem „Vortexen“ erfolgten alle weiteren Verdünnungsschritte nach dem gleichen Verfahren.

### 3.2.5.8 „one-step“ RT-PCR am LightCycler zur Erstellung eines externen Standards

Aus der Verdünnungsreihe wurden je 2 µl der CD103-mRNA-Konzentrationen der log-Stufen  $10^{-3}$  bis  $10^{-10}$  g/µl in eine RT-PCR eingesetzt. Die Mengenanteile der nötigen Reagenzien entsprachen dabei denen des Initiallaufes (siehe Abschnitt 2.2.5.1). Allerdings wurde ab diesem Zeitpunkt nicht mehr der Sense-Primer mit dem SP6-Promotor verwendet, sondern je 0,5 µM reiner Sense- und Antisense-Primer. Die Parametereinstellungen für den LightCycler-Lauf wurden ebenfalls aus dem Initiallauf beibehalten.

Die Messtemperatur kann bei allen weiteren Test-Läufen dann gezielt gewählt werden. Sie sollte ca. 3 Grad unterhalb der Schmelztemperatur des Amplifikats liegen. Die LightCycler-Software registriert bei jeder Probe den Threshold-Cycle ( $C_T$ ), das ist der Zyklus, bei dem die messbare Fluoreszenz in die loglineare Phase übergeht. Aus den  $C_T$ s bei den jeweiligen Verdünnungsstufen errechnet die LightCycler-Software eine Regressionsgerade, die exportiert werden kann und für die spätere Messung von Proben mit unbekannter RNA-Konzentration zugrunde gelegt wird. Die Regressionsgerade sollte idealerweise eine negative Steigung („slope“) von ca. 3,3 aufweisen. Ein Slope von 3,3 ist ein Indikator für eine gute Amplifikationsrate, denn das LightCycler-System erreicht dann tatsächlich die Verzehnfachung zwischen den Logstufen mit 3,3 Verdoppelungen. Ein Slope von 3,3 ist als idealer Wert zwar berechenbar, aber nicht immer erreichbar, da zahlreiche Faktoren Einfluss auf die Amplifikationsrate nehmen können:

- Primer-Lage, Primer-Sequenz und Spezifität der Primer-Bindung
- Annealingtemperatur und -dauer
- Bildung von Primerdimeren mit Verbrauch von Primer und dNTPs
- Primerkonzentration
- $Mg^{+}$  - Konzentration
- Aktivität der verwendeten Enzyme (neues Kit)

Mit einer Variation bei diesen Parametern wurde anschliessend versucht, eine Optimierung des Laufes zu erlangen. Folgende Ziele wurden angestrebt:

- Gute Amplifikationsrate (Slope ca. 3,3)
- Gleichmässige Abstände zwischen den Log-Stufen der Verdünnungsreihe (ggf. aus Stammlösung neue Verdünnungsreihe anlegen)
- Detektion von RNA bis zu einer Verdünnung von  $10^{-8}$  oder besser  $10^{-9}$  ng/ $\mu$ l
- Wenig Primerdimere
- Gute Reproduzierbarkeit, gute Intra- und Inter-Testvariabilität

Weist eine Standardreihe auch nach mehrfach wiederholten Läufen mit demselben Parametersatz vergleichbare und stabile Ergebnisse auf, sollte zu diesem Zeitpunkt für die sichere Identifikation des Amplifikats eine Agarosegelelektrophorese erfolgen (siehe Abschnitt 2.2.6). Anschliessend kann einer der Läufe als externer Standard exportiert werden. Bei jedem späteren Lauf zur Messung von Patientenproben mit unbekannter CD103-mRNA-Konzentration werden 1 bis 3 Verdünnungsstufen der Standardreihe mitgeführt. Nach Abschluss des Laufes wird im Quantifizierungsfenster des Analyse-Menues einer der Standards markiert und der zuvor exportierte externe Standard wieder importiert. Die dem externen Standard zugehörige Regressionsgerade wird dabei in die Koordinate des ausgewählten, aktuellen Standards geschoben. Anhand dieses Fixpunktes und der Steigung der Regressionsgeraden wird die mRNA-Konzentration der zu messenden Proben ermittelt.

### 3.2.5.9 Messbereich und Detektionslimit

Bei den jeweils exportierten Standardreihen wurden Messungen in den Bereichen von  $10^{-3}$  bis  $10^{-10}$  ng/ $\mu$ l durchgeführt. Aus der höchsten, regelmässig noch quantifizierbaren Verdünnungsstufen wurde mit Hilfe folgender Formel das Detektionslimit errechnet:

$$\frac{DNA - Menge [g] \times 6,022 \cdot 10^{23} \text{ Moleküle} / mol}{N \times 340 \text{ g} / mol} = \text{Detektionslimit} [Moleküle]$$

$6,022 \cdot 10^{23}$  Moleküle/mol = Avogadrosche-Zahl; N = Anzahl der Nukleotide; 340g/mol = mittleres Molekulargewicht eines Nukleotids

### 3.2.6 Agarosegelelektrophorese

Das Prinzip der Agarosegelelektrophorese beruht auf einer Wanderung der DNA-Moleküle im elektrischen Feld. Aufgrund der zahlreichen Phosphatgruppen sind DNA-Moleküle überwiegend negativ geladen und bewegen sich daher zur Anode. Die Struktur des Agarosegels wirkt dabei als Molekularsieb, in dem kleinere DNA-Stücke schneller anodenwärts wandern können als grössere. Die Wanderungsgeschwindigkeit hängt weiterhin von der Konformation der Moleküle, von den Eigenschaften des Puffers, von der Konzentration des Gels und von der angelegten Stromstärke ab. Mit Hilfe von Ethidiumbromid werden die entstandenen Banden sichtbar gemacht. Ethidiumbromid interkaliert mit der DNA-Doppelhelix und kann durch UV-Bestrahlung zur Abgabe von Fluoreszenzlicht angeregt werden. Für die Agarosegelelektrophorese wurde ein 2%iges Gel verwendet. Folgende Schritte waren erforderlich:

#### a) Gel herstellen

- 1 g Agarosepulver und 50 ml 1x TAE-Puffer in 250 ml Erlenmeierkolben einwiegen.
- Mischung gründlich rühren.
- In der Mikrowelle kochen, bis Agarose gut gelöst ist und weder Schlieren noch kleine Blasen sichtbar sind.
- Gelmasse unter leichtem Rühren bis auf Handwärme abkühlen lassen (ca. 45 Grad).
- 2 µl Ethidiumbromidlösung (1%ig) dazu pipettieren, gut verrühren.
- Kleine Gel-Giess-Form mit Tesafilm abkleben und Gelmasse blasenfrei einfüllen.
- Kamm einstecken.

#### b) Befüllen der Gel-Taschen

- Nach Abkühlen und Verfestigung des Gels Kamm und Tesafilmstreifen entfernen.
- 5 µl Laufpuffer in 1,5 ml Eppendorf-Gefäss vorlegen.
- 10 µl PCR-Produkt einpipettieren und mit der Pipette gut mischen.
- 10 µl des Gemisches in die Geltasche einpipettieren.
- In eine der Taschen 10 µl eines Molekulargewichts-Standards (25'er bp-Abstände) pipettieren. Die gebrauchsfertige Mischung besteht aus folgenden Komponenten: 10 µl Molekulargewichtsstandard (1µg/µl), 100 µl Laufpuffer, 390 µl Wasser.

#### c) Elektrophorese starten

- Präpariertes Gel in die Kammer einsetzen.
- Kamm mit 1x TAE Puffer auffüllen, bis Flüssigkeit auf dem Gel steht.

- Deckel aufsetzen, bei 120 V und 135 mA für ca. 50-60 min. laufen lassen.
- Banden sollen das gegenüberliegende Ende fast erreicht haben, damit eine deutliche Auftrennung möglich wird.

#### d) UV-Licht und Fotografie

- Gel auf die Glasplatte des UV-Luminators schieben.
- Blende öffnen.
- Fotosoftware am PC starten.
- UV-Licht einschalten und Kontrast, Helligkeit, Schärfe des Bildes einstellen.
- Bild sichern / UV-Licht unverzüglich wieder abschalten / Blende schliessen.

### **3.2.7 Auswertung und Statistik**

#### **3.2.7.1 Beurteilung der Standardreihen mittels Intra-Test- und Inter-Test-Variabilität**

Für die Beurteilung der Standardreihen wurde die Intra- und Inter-Test-Variabilität mit Hilfe von Mittelwerten und Standardabweichung ermittelt. Zur Ermittlung der Inter-Test-Variabilität wurden 3 Standardverdünnungsstufen ( $10^{-3}$ ,  $10^{-5}$ ,  $10^{-7}$  ng/ $\mu$ l) in 3 unabhängigen PCR-Läufen nacheinander gemessen und für jede Verdünnungsstufe über die verschiedenen Läufe Mittelwert, Standardabweichung und das 95%-Konfidenzintervall errechnet. Um die Intra-Test-Variabilität bewerten zu können, wurden nebeneinander in einem PCR-Lauf je 3 Proben aus 3 verschiedenen Verdünnungsstufen gemessen und verglichen.

#### **3.2.7.2 Validierung der quantitativen „one-step“ RT-PCR zur Messung von CD103-mRNA**

Die quantitative „one-step“ RT-PCR sollte anhand der histopathologischen Befunde gemäss Banff-Klassifikation validiert werden. Dazu wurden die gemessenen CD103-mRNA-Konzentrationen im Urin innerhalb der oben beschriebenen Teilgruppen als Indikator für eine Abstossung überprüft. Die statistische Auswertung der Ergebnisse erfolgte mit Med Calc V. 4.20.021 und Microsoft® Excel 2002. Als Testverfahren für den Methodenvergleich von Serumkreatinin und CD103-mRNA-Konzentration kam der McNemar-Test sowie die ROC Analyse (Receiver Operating Characteristics) zum Einsatz.

## 4. Ergebnisse

### 4.1 Initilläufe und In-Vitro-Transkription

Mit jedem der eingesetzten Primerpaare wurde in einer initialen RT-PCR unter Verwendung des um den SP6-Promotor ergänzten Sense-Primers eine transkriptionsfähige DNA erzeugt. Es wurde dabei zunächst eine Konzentration von je 0,5  $\mu\text{M}$  pro Primer eingesetzt. Alle weiteren Laufparameter wurden analog zu vorherigen Läufen gewählt. Wichtig bei diesen Läufen war ein deutlicher „Schmelzkurven-Peak“, wenige Primerdimere und eine „saubere“ Negativkontrolle. Weitere Aussagen über die Anpassung von Annealing- und Messtemperatur oder über die Amplifikationseffizienz ließen diese initialen Läufe nicht zu, da das Amplifikat wegen der Promotorsequenz länger war und über andere Eigenschaften verfügte als das Amplifikat in den späteren Läufen. Nach einer Aufreinigung des PCR-Produkts, bei der alle übrigen Reagenzien, Puffer, Spaltprodukte, Magnesium etc. entfernt wurden, erfolgte die In-Vitro-Transkription. Die entstandene RNA wurde anschliessend aufgereinigt und für die Erstellung der Standardreihen verwendet. Die photometrische Bestimmung des RNA-Gehalts ergab folgende Werte:

**Tab. 5:** RNA-Konzentrationen nach In-Vitro-Transkription je Primerpaar

Primerpaar	RNA- Konzentration ng/ $\mu\text{l}$
Pri 11	19
Pri 21	17
Pri 33	8

Aus den RNA-Lösungen wurden Verdünnungsreihen hergestellt, beginnend mit der Einstellung einer Konzentration von 0,5 ng/ $\mu\text{l}$ . Da später in der RT-PCR 2  $\mu\text{l}$  Template eingesetzt werden sollten, konnte man so von einem anfänglichen Gesamt-RNA-Gehalt von 1 ng/ $\mu\text{l}$  ausgehen. Es wurden Verdünnungen von 0,5 ng/ $\mu\text{l}$ ,  $0,5 \times 10^{-1}$  ng/ $\mu\text{l}$ ,  $0,5 \times 10^{-2}$  ng/ $\mu\text{l}$ , etc. bis  $0,5 \times 10^{-12}$  ng/ $\mu\text{l}$  erzeugt. Als Verdünnungsmittel kam bi-destilliertes Wasser zum Einsatz, dem 20 ng/ $\mu\text{l}$  carrier-RNA zugesetzt worden war. Auf diese Weise konnte die RNA stabilisiert werden, die bei Vorversuchen durch starke Adsorption an den Kunststoffwänden der Eppendorf-Gefässe und durch Degradation der RNA-Moleküle rasch ungewollt reduziert wurde.

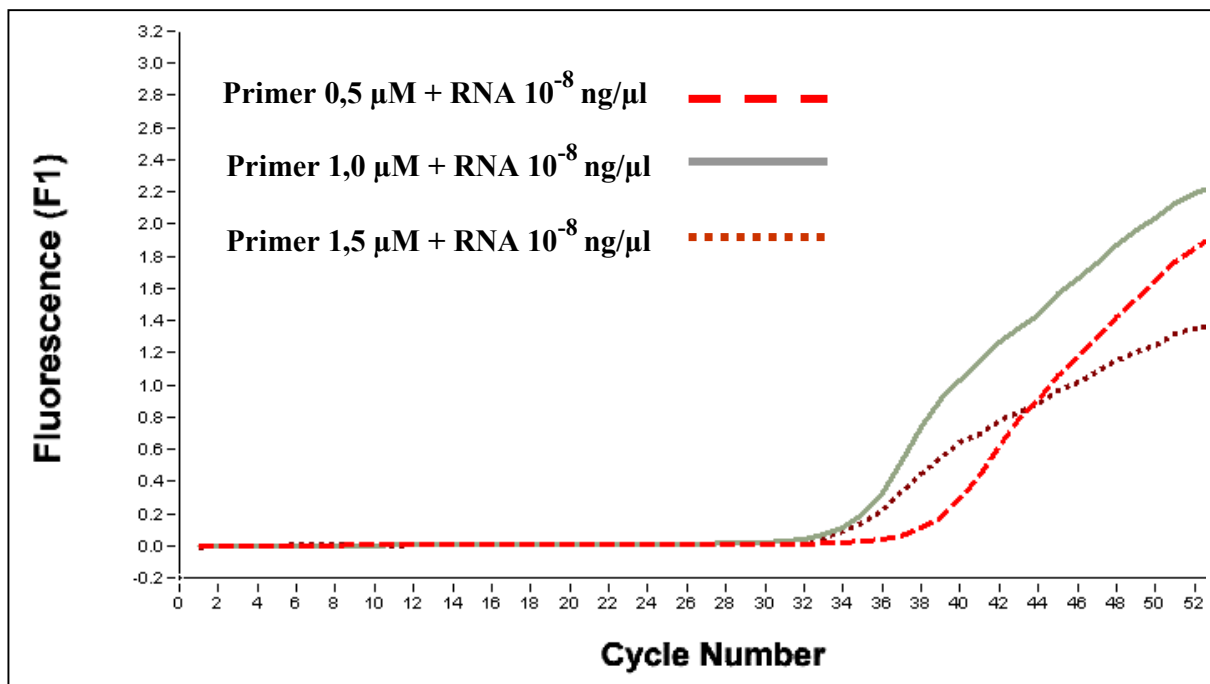
## 4.2 Etablierung einer quantitativen „one-step“ RT-PCR am LightCycler zur Messung der CD103-mRNA-Konzentration im Urin

Die RNA-Verdünnungsstufen  $0,5 \times 10^{-3}$  bis  $0,5 \times 10^{-12}$  ng/ $\mu$ l wurden in eine RT-PCR eingesetzt mit einer Primerkonzentration von  $0,5 \mu\text{M}$  und der Annealingtemperatur gemäss Lieferschein (Primerpaar 11, 22 und 21: 60 Grad; Primerpaar 33: 55 Grad). Aus der Schmelzkurve konnte anschliessend die Schmelztemperatur abgelesen werden und für Wiederholungsläufe eine Messtemperatur von ca. 2 Grad unterhalb der Schmelztemperatur gewählt werden.

### 4.2.1 Optimierung der RT-PCR am LightCycler

#### 4.2.1.1 Primerkonzentration

Jedes Experiment wurde mit einer Primerkonzentration von  $0,5 \mu\text{M}$  jeweils für Sense- und Antisense-Primer begonnen. Im Falle des abschliessend gewählten Primerpaares 33 wurden weitere Primerkonzentrationen getestet:  $0,5 \mu\text{M}$ ,  $1,0 \mu\text{M}$  und  $1,5 \mu\text{M}$ . Hinsichtlich einer guten Amplifikationseffizienz speziell im Bereich höherer Verdünnungsstufen erwies sich eine Konzentration von  $1,0 \mu\text{M}$  als optimal.

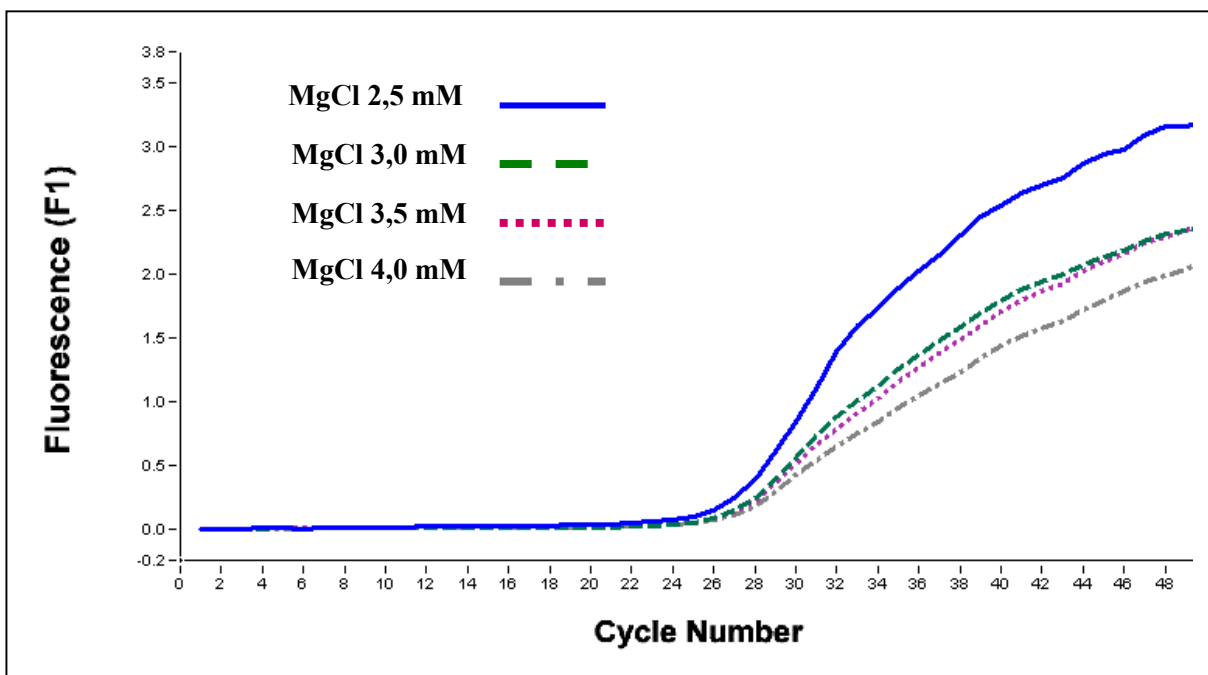


**Abb. 8:** Fluoreszenzkurven eines RNA-Templates von  $10^{-8}$  ng/ $\mu$ l bei den Primerkonzentrationen  $0,5 \mu\text{M}$ ,  $1,0 \mu\text{M}$  und  $1,5 \mu\text{M}$



#### 4.2.1.2 Mg-Konzentration

Beim Qiagen SYBR Green RT-PCR-Kit ist standardmässig eine Magnesiumkonzentration von 2,5 mM eingestellt. Um abschätzen zu können, ob sich die Amplifikation durch eine Erhöhung der Magnesiumkonzentration weiter verbessern lässt, wurden die Konzentrationen von 2,5 mM, 3,0 mM, 3,5 mM und 4,0 mM getestet. Es zeigte sich, dass die gegebene Konzentration von 2,5 mM ohne weitere Zugabe von Magnesium am effektivsten war.



**Abb 9:** Templates der RNA-Konzentration von  $10^{-6}$  ng/ $\mu$ l bei MgCl-Konzentrationen von 2,5 bis 4,0 mM

#### 4.2.1.3 Messtemperatur

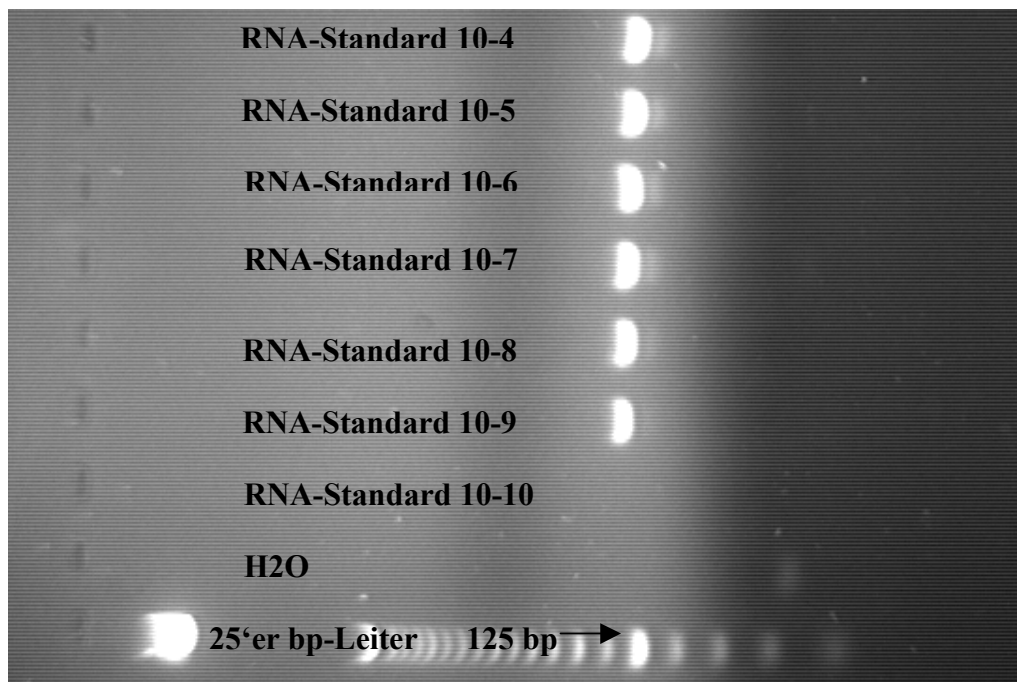
Bei der real-time-PCR lässt sich durch die Fluoreszenz-Messungen nach jedem Zyklus bereits während des Laufes eine Aussage über die Menge des entstandenen Produkts machen. Die Messtemperatur ist dabei so zu wählen, dass möglichst das gesamte Amplifikat noch als Doppelstrang vorliegt. Nur dann verhält sich die gemessene Fluoreszenz auch proportional zur Menge der spezifischer DNA. Andererseits soll keinesfalls eine Fluoreszenz von unspezifischen Produkten mit niedrigerem Schmelzpunkt wie Primerdimeren gemessen werden. Es empfiehlt sich daher, eine Temperatur von ca. 2-3 Grad unterhalb des produktspezifischen Schmelzpunktes zu wählen. Bei den verschiedenen getesteten Primerpaaren wurden folgende Messtemperaturen gewählt: Primerpaar 11 – 81 Grad, Primerpaar 21 – 85 Grad, Primerpaar 33 – 80 Grad.

#### 4.2.1.4 Zusammenstellung von Laufparametern (Qiagen – Kit)

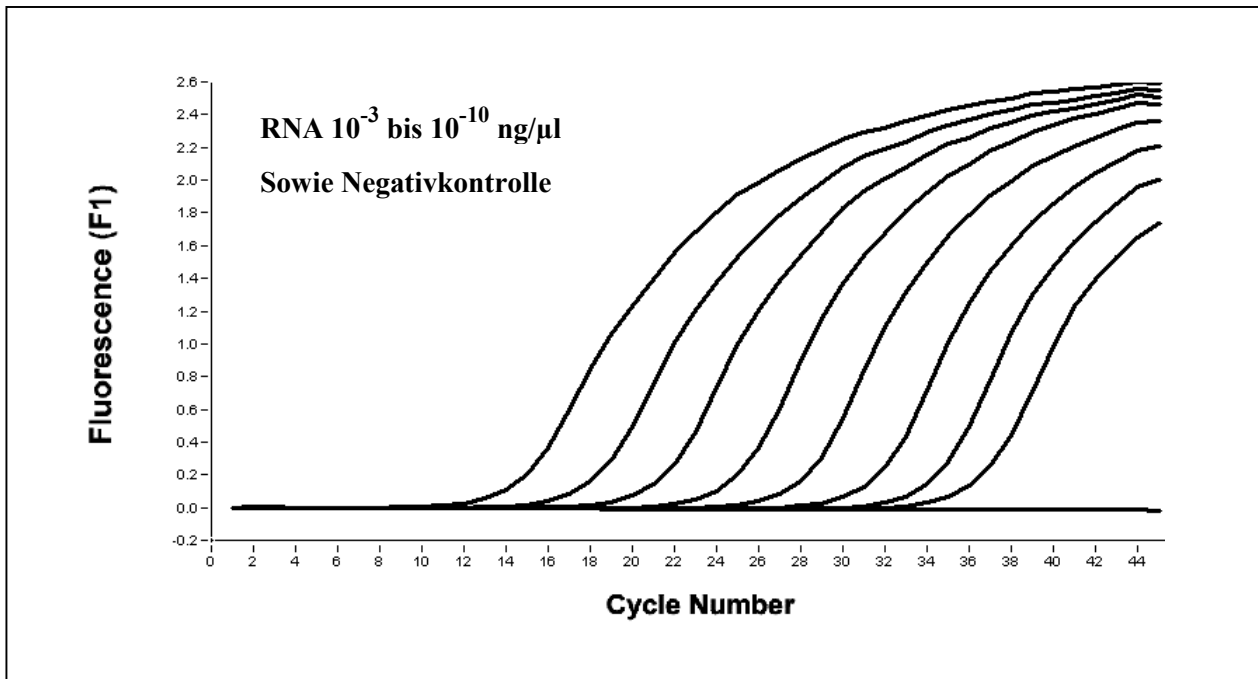
**Tab. 6:** Laufparameter RT-PCR

	<b>Primerpaar 11</b>	<b>Primerpaar 21</b>	<b>Primerpaar 33</b>
<b>Primerkonzentration</b>	0,5 µM	0,5 µM	1,0 µM
<b>MgCl Konzentration</b>	2,5 mM	2,5 mM	2,5 mM
<b>Reverse Transkription</b>	50 Grad 20 min	50 Grad 20 min	50 Grad 20 min
<b>Denaturierung</b>	95 Grad 15 min	95 Grad 15 min	95 Grad 15 min
<b>Amplifikation:</b>			
Schmelzen	94 Grad 15 sec	94 Grad 15 sec	94 Grad 15 sec
Annealingtemperatur	60 Grad 15 sec	60 Grad 15 sec	55 Grad 15 sec
Syntheschritt	72 Grad 12 sec	72 Grad 12 sec	72 Grad 12 sec
Messtemperatur	81 Grad 0 sec	85 Grad 0 sec	80 Grad 0 sec
Zyklusanzahl	45	45	50
<b>Schmelzkurve</b>	0,1 Grad/sec 70-95 Grad	0,1 Grad/sec 70-95 Grad	0,1 Grad/sec 70-95 Grad
<b>Produktschmelzpunkt</b>	83,5 Grad	88 Grad	82 Grad
<b>Kühlung</b>	40 Grad	40 Grad	40 Grad

#### 4.2.2 Prüfen der PCR-Produkte mit Agarose-Gelelektrophorese



**Abb. 10:** 2% Agarosegele zur Kontrolle des Amplifikats nach RT-PCR der Standardreihe



**Abb. 11:** Standardreihe für Primerpaar 11, Verdünnungen von  $10^{-3}$  bis  $10^{-10}$  ng/ $\mu$ l CD103-RNA

#### 4.2.3 Messbereich und Detektionslimit

Aus den höchsten, noch regelmässig quantifizierbaren Verdünnungsstufen wurde mit Hilfe folgender Formel das Detektionslimit errechnet:

$$\frac{DNA - Menge [g] \times 6,022 \cdot 10^{23} \text{ Moleküle / mol}}{N \times 340 \text{ g / mol}} = \text{Detektionslimit [Moleküle]}$$

$6,022 \cdot 10^{23}$  Moleküle/mol = Avogadro-Zahl; N = Anzahl der Nukleotide; 340g/mol = mittleres Molekulargewicht eines Nukleotids

**Tab 7:** Detektionslimits der Primerpaare (je 20  $\mu$ l Ansatz)

Primerpaar	Amplifikatlänge (Anzahl bp)	Höchste messbare Verdünnungsstufe	Detektionslimit (Anz. Molek. / 20 $\mu$ l Ansatz)
11	87	$10^{-9}$ ng/ $\mu$ l	20
21	144	$10^{-9}$ ng/ $\mu$ l	12
33	136	$10^{-9}$ ng/ $\mu$ l	13

#### 4.2.4 Inter- und Intra-Test-Variabilität

Der Threshold-Cycle ( $C_T$ ) bei einer PCR mit dem LightCycler markiert den Übergang von einer unspezifischen Fluoreszenzerhöhung in die loglineare Phase, bei der eine echte Verdoppelung der DNA-Moleküle von Zyklus zu Zyklus erfolgt. Zur Bewertung der Inter-Test-Variabilität wurde bei dreifach wiederholten Läufen mit den Standard-Verdünnungsreihen für die Verdünnungsstufen  $10^{-4}$ ,  $10^{-6}$  und  $10^{-8}$  ng/ $\mu$ l der jeweilige Threshold-Cycle erfasst. Pro Verdünnungsstufe wurden Mittelwert, Standardabweichung und das 95%-Konfidenzintervall ermittelt. Bei den Inter-Test-Variabilitäten waren Schwankungen von 0,13 bis 0,76 Zyklen zu verzeichnen, was bezogen auf mRNA-Konzentrationen einer Schwankung von 9 bis 69 % entspricht. Die Inter-Test-Variabilität des ausgewählten Primerpaares 33 schwankte um 0,23 bis 0,41 Zyklen, was eine Konzentrationsschwankung 17 bis 33 % bedeutet. Der Variabilitätskoeffizient lag zwischen 0,6 und 2,0%.

**Tab. 8:** Inter-Test-Variabilität unter Verwendung der drei Primerpaarungen und einzelnen Verdünnungsstufen der zugehörigen Standardreihen

RNA-Konzentration (ng/ $\mu$ l)	Mittelwert des Threshold-Cycle $C_T \pm$ Standardabweichung je Verdünnungsstufe und [95% Konfidenzintervall]		
	Primerpaar 11	Primerpaar 21	Primerpaar 33
$10^{-4}$	18,28 $\pm$ 0,13 [18,13; 18,43]	19,34 $\pm$ 0,42 [18,86; 19,82]	19,94 $\pm$ 0,40 [19,84; 20,39]
$10^{-6}$	24,44 $\pm$ 0,29 [24,11; 24,77]	26,79 $\pm$ 0,70 [25,99; 27,58]	27,50 $\pm$ 0,41 [27,04; 27,96]
$10^{-8}$	31,19 $\pm$ 0,17 [31,00; 31,38]	32,99 $\pm$ 0,76 [32,13; 33,85]	34,93 $\pm$ 0,23 [34,67; 35,19]

Zur Bewertung der Intra-Test-Variabilität wurden innerhalb eines Laufes dreifache Proben der Standard-Verdünnungsreihen für die Verdünnungsstufen  $10^{-3}$ ,  $10^{-5}$  und  $10^{-7}$  ng/ $\mu$ l gemessen und der jeweilige  $C_T$  erfasst. Pro Verdünnungsstufe wurden Mittelwert, Standardabweichung und 95%-Konfidenzintervall ermittelt. Es traten Schwankungen von 0,21 bis 0,54 Zyklen auf (16 bis 45% auf Konzentrationen bezogen). Bei dem Primerpaar 33 lagen die Schwankungen bei 0,20 bis 0,36 Zyklen, was bezogen auf die Konzentration 15 bis 28% entspricht. Für die Intra-Test-Variabilität wurde ein Variabilitätskoeffizient von 0,9 bis 1,5 % ermittelt.

**Tab. 9:** Intra-Test-Variabilität unter Verwendung der drei Primerpaarungen und einzelnen Verdünnungsstufen der zugehörigen Standardreihen

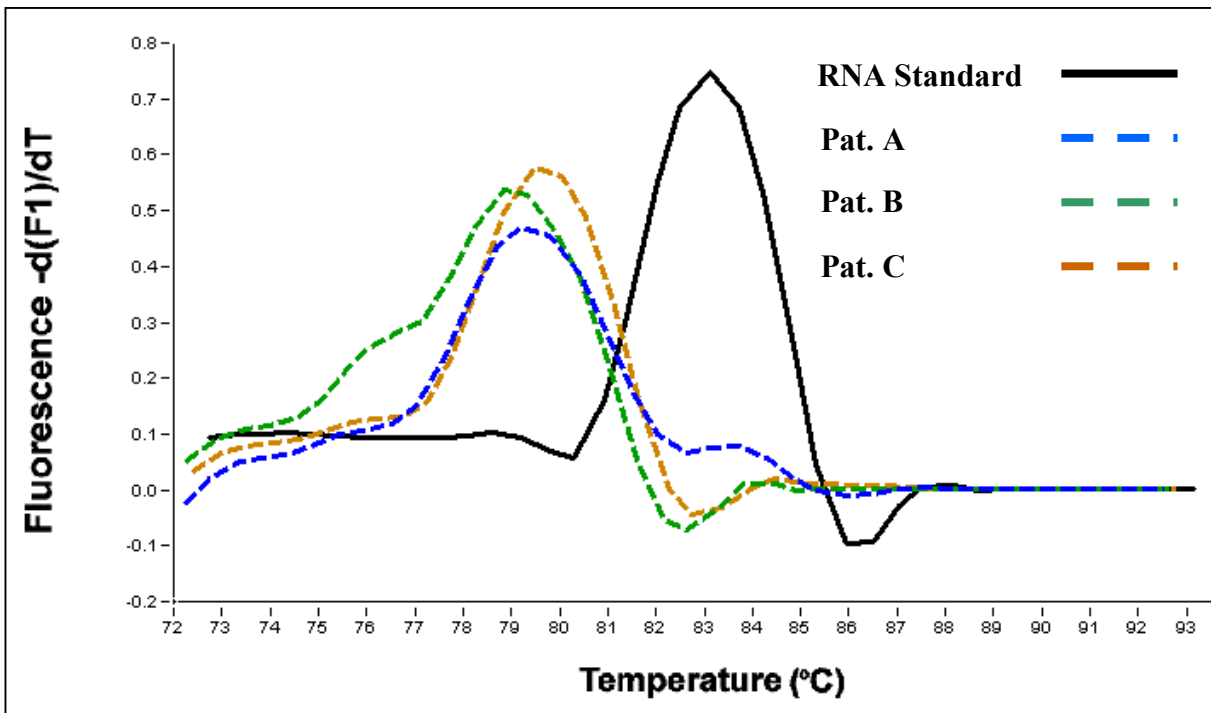
RNA-Konzentration (ng/μl)	Mittelwert des Threshold-Cycle $C_T \pm$ Standardabweichung je Verdünnungsstufe und [95% Konfidenzintervall]		
	Primerpaar 11	Primerpaar 21	Primerpaar 33
$10^{-3}$	14,77 ± 0,35 [14,37; 15,17]	15,71 ± 0,21 [15,47; 15,95]	16,10 ± 0,20 [15,87; 16,33]
$10^{-5}$	21,48 ± 0,26 [21,19; 21,77]	23,17 ± 0,52 [22,58; 23,76]	23,49 ± 0,36 [23,08; 23,90]
$10^{-7}$	27,81 ± 0,33 [27,44; 28,18]	30,25 ± 0,54 [29,64; 30,86]	30,27 ± 0,30 [29,93; 30,61]

Bei den einzelnen Verdünnungsstufen zeigten die Ergebnisse bei Primerpaar 11 geringe Schwankungsbreiten und gut reproduzierbare Messungen bis zu einer Konzentration von  $10^{-9}$  ng/μl. Demgegenüber wiesen die Messergebnisse bei Primerpaar 33 etwas grössere Schwankungsbreiten auf bei ebenfalls regelmässig messbaren Ergebnissen bis zur Verdünnung von  $10^{-9}$  ng/μl. Trotz der etwas besseren Leistungsfähigkeit des Primerpaares 11 wurde dem Primerpaar 33 der Vorzug gegeben. Entscheidend war die Primerbindungsspezifität beim Messen der Patientenproben. Anders als bei der Messung der Standardreihen, wo fast ausschliesslich spezifische mRNA vorliegt, wurde bei der Aufarbeitung der Patientenurine die gesamte RNA extrahiert. Bei der Verwendung von Gesamt-RNA als Template wies die Spezifität der Primerbindung starke Unterschiede auf, es kam vor allem bei den Primerpaaren 11 und 21 zur Bildung von unspezifischen Produkten.

#### 4.2.5 Vergleich verschiedener Primerpaare

Mit dem von Ding et al., 2003, verwendeten Primerpaar (in dieser Arbeit: Primer 11) liessen sich alle Schritte bis zur Erstellung einer Standardreihe problemlos durchführen. Bei den RT-PCRs ergaben sich gute Inter- und Intra-Test-Variabilitäten, Amplifikationseffizienzen und ein gutes Detektionslimit, welches Messungen bis zu mRNA-Konzentrationen von  $10^{-9}$  ng/ml zulies. Zwischenzeitlich aufgetretene Probleme, die durch mehrfaches Auftauen der Standardreihen entstanden sind, liessen sich durch die Verwendung von carrier-RNA-haltigem Verdünnungsmedium unter Kontrolle bringen.

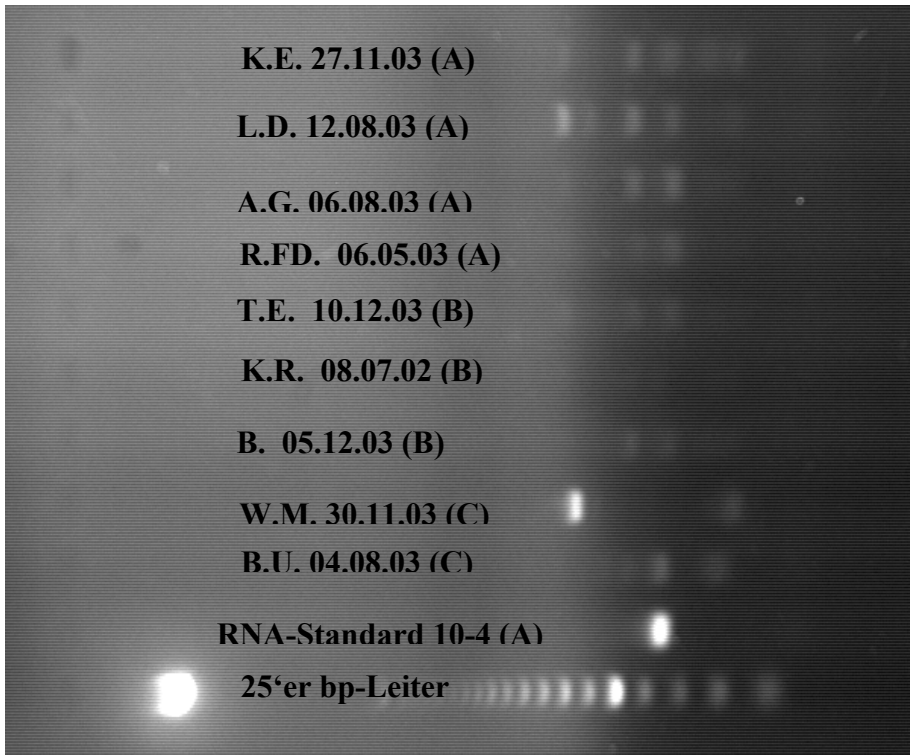
Bei der späteren Messung von Patientenproben kam es jedoch zu einer starken Bildung von Primerdimeren, die mit ihren Schmelzpunkten so nah am Schmelzpunkt des gewünschten Amplifikats lagen, dass sie die Messung beeinflussten und zu vielen falsch positiven Ergebnissen führten.



**Abb. 12:** Bildung von unspezifischen Produkten bei Messung von Patientenproben unter Verwendung von Primerpaar 11

Bei der Überprüfung der Amplifikate mit der Agarosegelelektrophorese zeigte sich bei der Messung von Patientenproben unter Verwendung des Primerpaares 11 bzw. 21, dass neben dem gewünschten Produkt jeweils mehrere weitere Nebenprodukte oder Primerdimere entstanden waren. Versuche, durch eine Erhöhung der Annealingtemperatur die Bildung unspezifischer Produkte zu reduzieren, führten zu keiner Verbesserung. Bei leichter Erhöhung zeigten sich weiterhin viele unspezifische Produkte, bei deutlicher Erhöhung der Annealingtemperatur trat eine drastische Verschlechterung der Amplifikationseffizienz ein. Die Integration eines „Acquisition Step“, die nach Qiagen-Handbuch versucht wurde, brachte keine Abhilfe. Bei einer Prüfung von Patientenproben mittels einer PCR ohne Reverse Transkription konnte eine Kontamination der Proben mit DNA ausgeschlossen werden. Folglich mussten die Banden bzw. zusätzlichen Produkte durch eine unspezifische Primerbindung entstanden sein. Von einer

Sequenzierung der zusätzlichen Produkte zum Ausschluss von Splice-Varianten wurde zu diesem Zeitpunkt abgesehen.

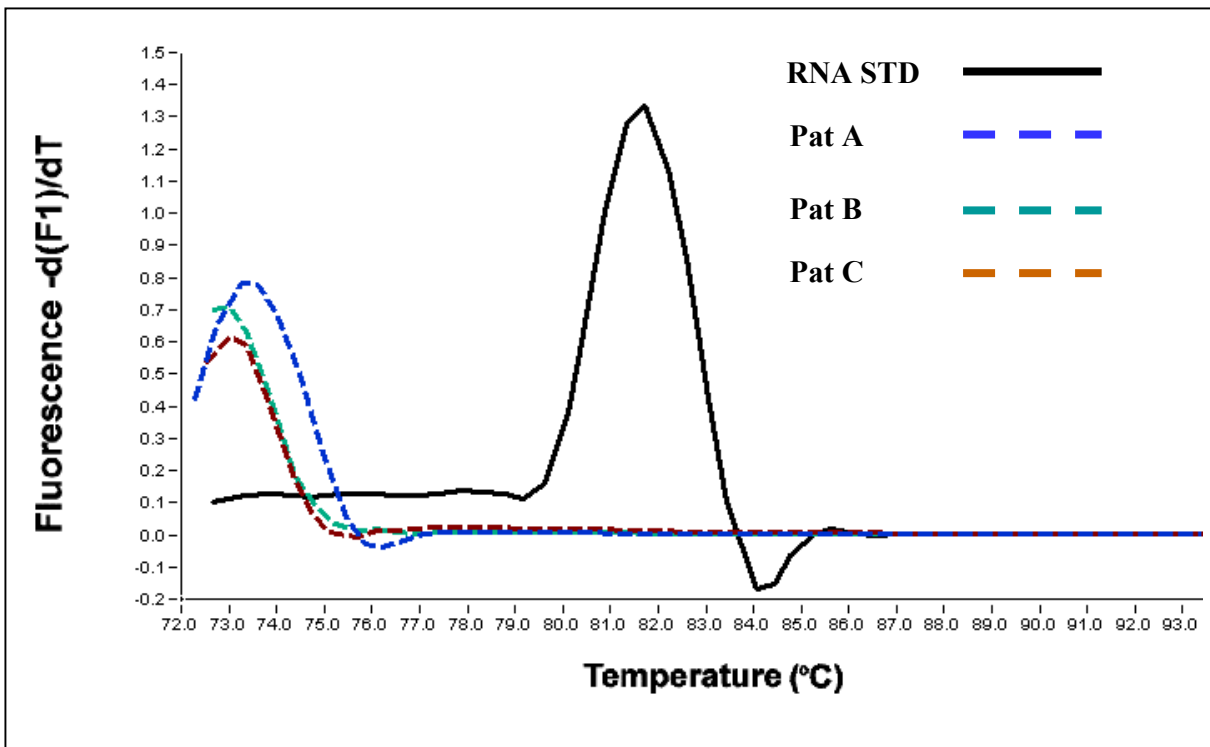


**Abb. 13:** Agarosegel (2%) von Produkten nach RT-PCR-Lauf mit Patientenproben (Primer 11)

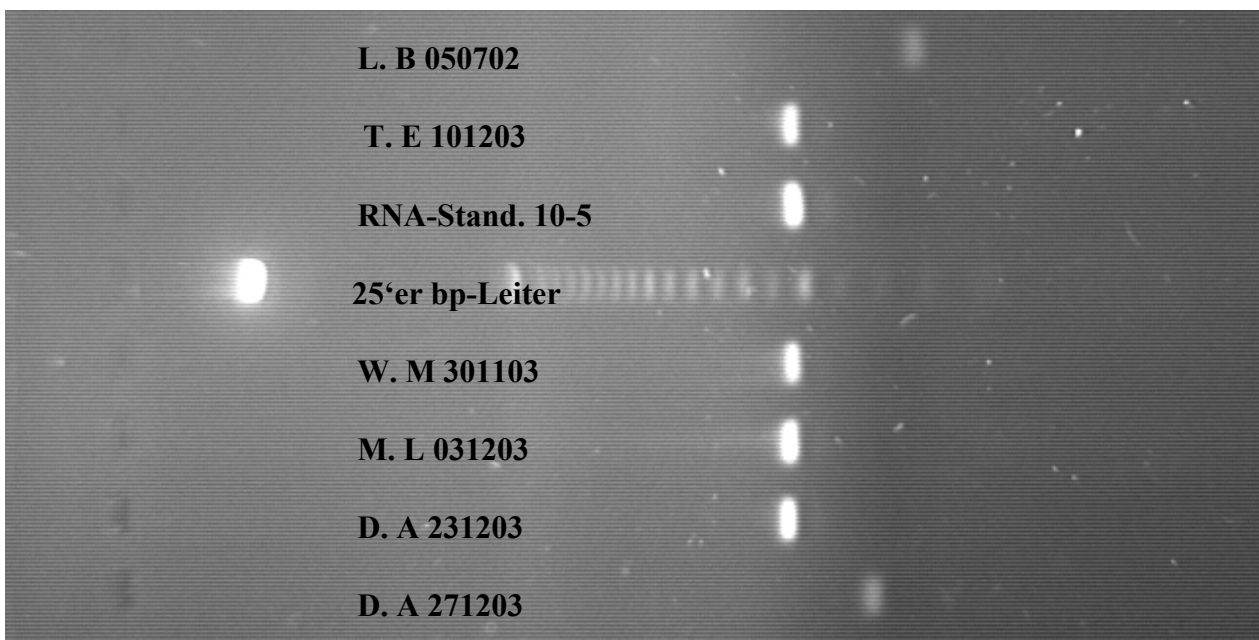
Das zweite Primerpaar wurde so gewählt, dass auch eine Kombination von Sense- und Antisenseprimer des ersten Paares mit den neuen Primern möglich war. Bei Tests der verschiedenen möglichen Kombinationen zeigte sich die Kombination des neuen Sense- und des früheren Antisense-Primers als ähnlich leistungsfähig wie die erste Kombination (Primerpaar 21). Nach Erzeugung der Standardreihe kam es bei Messungen von Patientenproben wiederum zu einer starken Bildung von Primerdimeren bzw. unspezifischen Produkten, die in der Gelelektrophorese als unspezifische Banden sichtbar wurden.

Im Gegensatz zu den ersten beiden Primern wurde das dritte Primerpaar (33) im „hinteren“ Drittel des CD103-Transkripts positioniert und die Lage des Sense-Primers exonübergreifend gewählt. Hierbei zeigten sich nur noch wenige unspezifische Produkte bzw. Primerdimere bei hinreichenden sonstigen Kriterien. Die Rate der Messungen mit unspezifischen Produkten, die beim ersten Primerpaar bei 69% und beim zweiten Primerpaar noch bei 10% aller gemessenen Proben lag, fiel nach Messung von 128 Patientenproben mit dem Standard für Primerpaar 33 auf

6%. Die wenigen unklaren Fälle liessen sich mit einer Agarosegelelektrophorese eindeutig positiv oder negativ zuordnen.



**Abb. 14:** Primerdimerbildung unter Verwendung von Primerpaar 33 bei Messung von Patientenproben (Dimere sind gut gegen das Amplikon abgrenzbar)

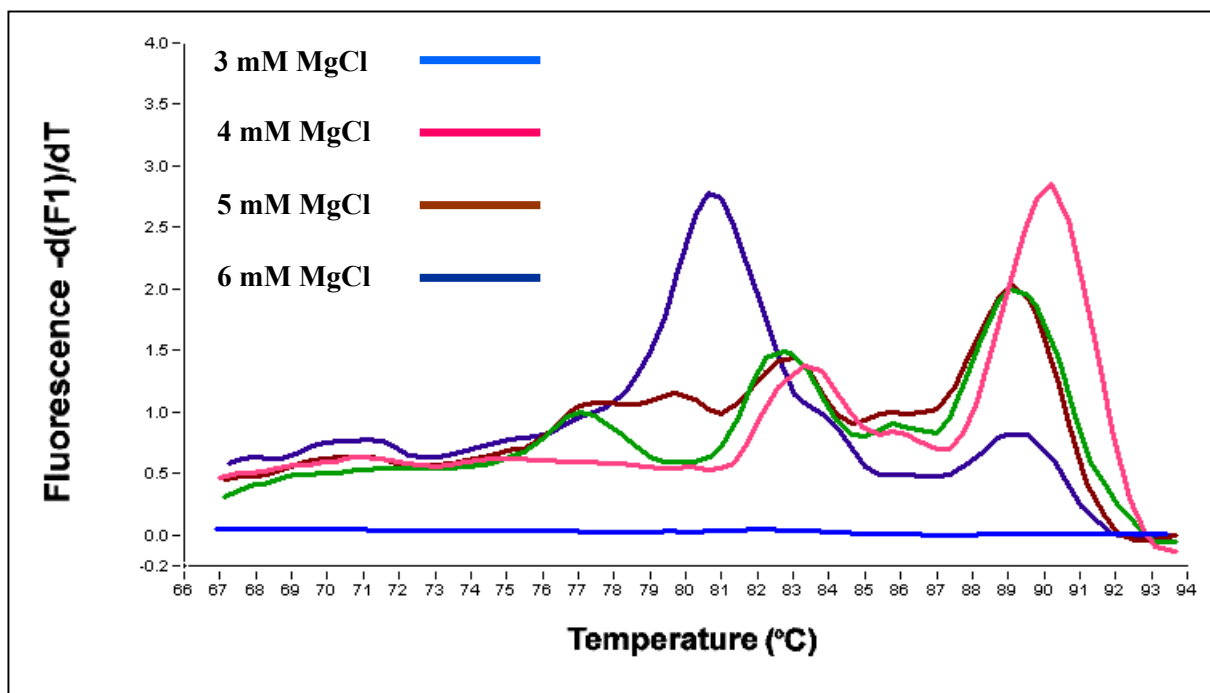


**Abb. 15:** Agarosegel (2%) von Produkten nach RT-PCR-Lauf mit Patientenproben (Primer 33)



#### 4.2.6 Test des SYBR-Green-Kits der Firma Roche

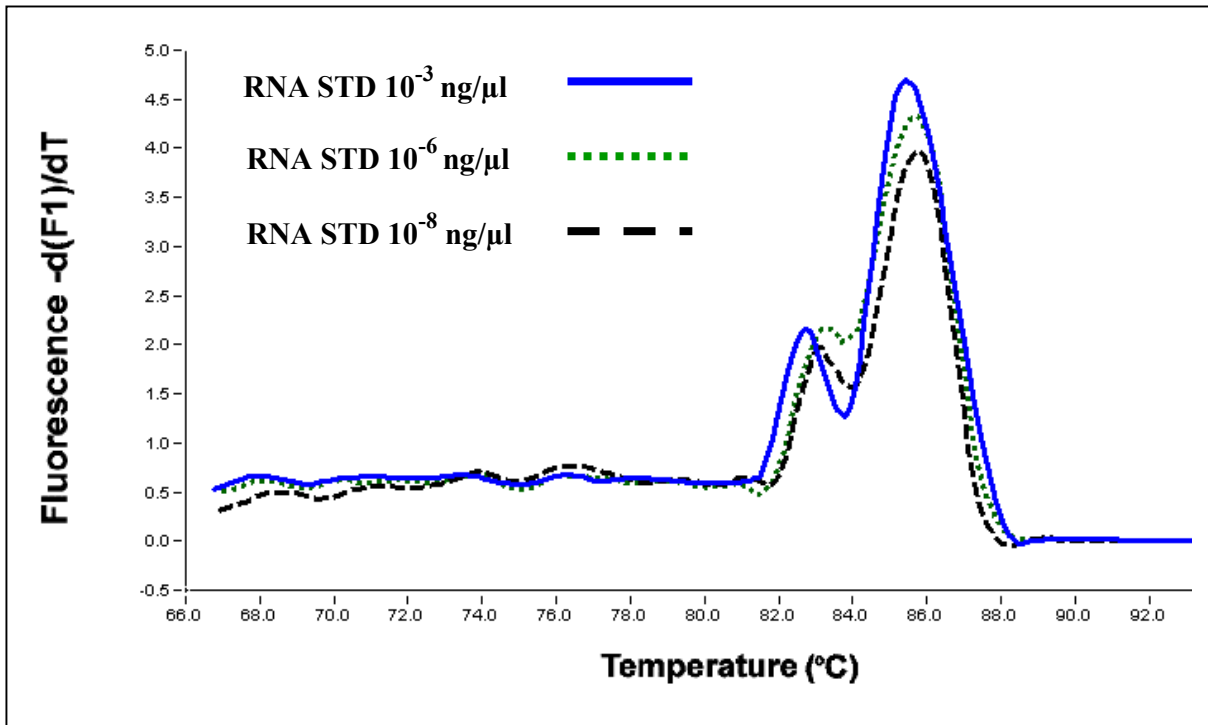
Im Rahmen der Optimierungsversuche wurde das SYBR-Green-Kit für RT-PCR am LightCycler von der Fa. Roche getestet. Bei den ersten Läufen, die mit dem Primerpaar 21, Templates aus der passenden Standardverdünnungsreihe und unter Verwendung der Basisangaben aus dem Handbuch eingestellt wurden, war kein Produkt detektierbar (Primerkonzentration 0,5  $\mu\text{M}$  (Primerpaar 21),  $\text{MgCl}$ -Konzentration 3,0 mM, Reverse Transkription bei 55 Grad für 10 min). Mit einer Verlängerung der Reversen Transkription auf 30 min und unter Einsatz höherer  $\text{MgCl}$ -Konzentrationen konnten Amplifikate identifiziert werden. Allerdings traten in der Schmelzkurvenanalyse mehrere deutliche, nahezu gleichgrosse Peaks auf. Die Schmelztemperatur war gegenüber dem bisher verwendeten Qiagen-Kit erheblich nach oben verschoben. Zur Kontrolle wurde ein Agarosegel angefertigt, welches ebenfalls 2 deutliche Banden aufwies, wovon die erste der Länge des Ziel-Amplifikats zu entsprechen schien. Somit scheint der Peak bei 90 Grad dem Produkt zu entsprechen und die Peaks der niedrigeren Temperaturen den Primerdimeren.



**Abb. 16:** Schmelzkurvenanalyse bei mehreren Magnesiumchloridkonzentrationen unter Verwendung des Roche-Kits und Einsatz von Primerpaar 21

Bei Einsatz des Roche-Kits für die Messungen mit Primerpaar 33 ergab sich mit den vorhandenen Standardverdünnungsstufen zwar eine einzige, jedoch sehr breite und zweigipflige

Schmelzkurve, die erneut auf die Bildung unspezifischer Produkte schliessen liess und keine exakte Messungen erlaubte. Von weiteren Optimierungsversuchen mit dem SYBR-Green-Kit der Firma Roche wurde daher Abstand genommen.



**Abb. 17:** Schmelzkurvenanalyse bei Verwendung des Roche-Kits und Einsatz von Primerpaar 33 (MgCl-Konzentration: 5 mM)

**Tab. 10:** Zusammenstellung von Laufparametern (Roche – Kit)

	Primerpaar 21		Primerpaar 33	
<b>Primerkonzentration</b>	0,5 µM		0,5 µM	
<b>MgCl<sub>2</sub> Konzentration</b>	3,0 - 7,0 mM		3,0 mM	
<b>Reverse Transkription</b>	55 Grad	30 min	55 Grad	30 min
<b>Denaturierung</b>	95 Grad	30 sec	95 Grad	30 sec
<b>Amplifikation:</b>				
Schmelzen	95 Grad	10 sec	95 Grad	10 sec
Annealingtemp.	60 Grad	15 sec	55 Grad	15 sec
Syntheseschritt	72 Grad	13 sec	72 Grad	13 sec
Messtemperatur	80 Grad	0 sec	83 Grad	0 sec
Zyklusanzahl	45		45	

	<b>Primerpaar 21</b>	<b>Primerpaar 33</b>
<b>Schmelzkurve Produktschmelzpunkt</b>	0,1 Grad/sec 65-95 83,5 Grad	0,1 Grad/sec 65-95 88 Grad
<b>Kühlung</b>	40 Grad	40 Grad

### 4.3 Histologiebefunde

#### 4.3.1 Kriterien der Befundung

Die Nierenpunktate wurden vom Pathologischen Institut am Universitätsklinikum Bonn gemäss der Banff 97-Klassifikation. Die Kriterien der Befundung sind in den Kapiteln 3.1.8.3 und 3.1.8.4 näher erläutert.

#### 4.3.2 Beschreibung des Patientenkollektivs

Zugrunde lag ein Gesamtkollektiv von 229 Urinproben, die von 90 nierentransplantierten Patienten asserviert werden konnten (siehe Tab. 11). Alle Patienten wiesen Zeichen der reduzierten Transplantatfunktion im Sinne einer vermuteten Rejektion auf und sollten sich einer Nierenpunktion unterziehen. Die immunsuppressive Medikation bestand bei 189 Patienten aus einer Tripel- und bei 38 Patienten aus einer Dualen Therapie. Im einzelnen erhielten 172 Patienten eine Steroid-, Calcineurininhibitor- und Mycophenolat-Mofetilbasierte (MMF) Immunsuppression, in 14 Fällen bestand das Regime aus einem Steroid, MMF und Rapamune. 38 Patienten waren auf eine Duale Immunsuppression mit einem Steroid und einem Calcineurininhibitor eingestellt. 4 Patienten bekamen eine Kombination aus einem Steroid und Azathioprin. Ein Patient erhielt ausschliesslich einen Calcineurininhibitor. 15 Patienten waren bis maximal eine Woche vor Probengewinnung transplantiert worden und befanden sich in der Phase der Induktionstherapie, bei der neben einer hochdosierten Tripel-Therapie noch Basiliximab verabreicht wurde.

Hinsichtlich des Cytomegalie-Status (CMV) zum Transplantationszeitpunkt waren 32 doppelt-negative und 68 doppelt positive Fälle zu verzeichnen. Ein Mismatch von negativem Spender bei positivem Empfänger lag in 53 Fällen vor, 41 mal gab es ein Mismatch von positivem Spender

bei negativem Empfänger. In 35 Fällen konnte der CMV-Status zum Transplantationszeitpunkt nicht mehr rekonstruiert werden (NTX auswärts oder vor mehr als 10 Jahren). Eine aktive primäre oder reaktivierte CMV-Infektion wurde bei 52 Patienten diagnostiziert.

**Tab. 11:** Charakterisierung des Gesamtkollektivs (Angaben in Median und Spannweite)

		<b>Gesamtkollektiv Transplantierte</b>
<b>Anzahl Patienten</b>		<b>90</b>
<b>davon</b>	<b>männlich</b>	<b>53</b>
	<b>weiblich</b>	<b>37</b>
<b>Alter</b>		<b>43 Jahre (18 - 72 Jahre)</b>
<b>Anzahl Proben</b>		<b>229</b>
<b>Zeitspanne seit NTX (Median Proben)</b>		<b>55 Tage (1 Tag - 19 Jahre)</b>
<b>Laborwerte (Serum)</b>	<b>Kreatinin (mg/dl)</b>	<b>2,3 (1,1-10,6)</b>
	<b>Harnstoff (mg/dl)</b>	<b>84(24-310)</b>

**Tab. 12:** Charakterisierung des Kollektivs für Evaluation (Angaben in Median und Spannweite)

		<b>Kollektiv Evaluation</b>
<b>Anzahl Patienten</b>		<b>55</b>
<b>davon</b>	<b>männlich</b>	<b>30</b>
	<b>weiblich</b>	<b>25</b>
<b>Alter</b>		<b>44 (20-72)</b>
<b>Anzahl Proben</b>		<b>82</b>
<b>Zeitspanne seit NTX (Median Proben)</b>		<b>170 Tage (3 Tagen- 16 Jahre)</b>
<b>Laborwerte (Serum)</b>	<b>Kreatinin (mg/dl)</b>	<b>2,7 (1,2-9,6)</b>
	<b>Harnstoff (mg/dl)</b>	<b>111 (30-310)</b>

### 4.3.3 Anteile der Diagnosen im Patientenkollektiv nach histologischer Befundung

Für die Evaluation der „one-step“ RT-PCR wurden nur Urinproben selektiert, die innerhalb von 24h vor der Nierenpunktion gewonnen werden konnten.

Die histologische Befundung der Nierenpunktate erfolgte gemäss der Banff 97-Klassifikation. Für die Evaluation der „one-step“ RT-PCR erfolgte eine Einteilung in folgende Untergruppen:

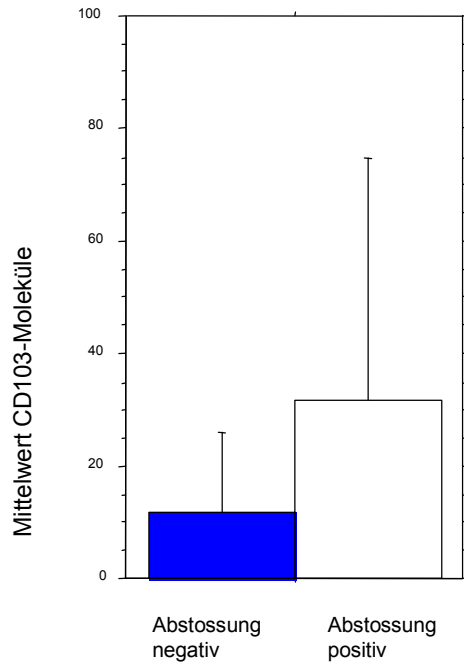
- Akute Abstossung
- Borderline-Abstossung
- Chronische Transplantatnephropathie.

Für die statistische Auswertung wurde daneben auch eine Dichotomisierung in die Kategorie „Abstossung“ (=Akute und Borderline Abstossung) sowie „Keine Abstossung“ durchgeführt.

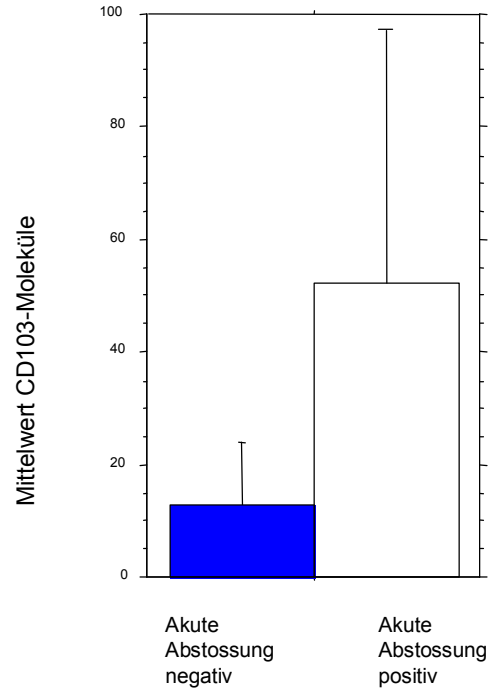
Bei der histologischen Befundung können neben typischen Infiltraten einer akuten Abstossung auch Zeichen nachweisbar sein, die auf eine chronische Transplantatnephropathie hinweisen. Daher kann eine Probe in mehreren Untergruppen auftauchen. Punktate, bei denen keine Abstossung diagnostiziert wurde, tauchen in den Untergruppen nicht auf. Es handelt sich um Gewebeproben mit diversen histopathologischen Diagnosen wie „Normale Transplantatfunktion“, „viraler Infekt“, „Ciclosporin-Toxizität“, „Akutes Nierenversagen“ und „ischämische Nekrose“. Die Untergruppe „Abstossung qualitativ“ ist die Zusammenfassung von „Akute Abstossung“ und „Borderline Abstossung“.

**Tab. 13:** Charakterisierung der Untergruppen gem. Histobefund (Median und Spannweite)

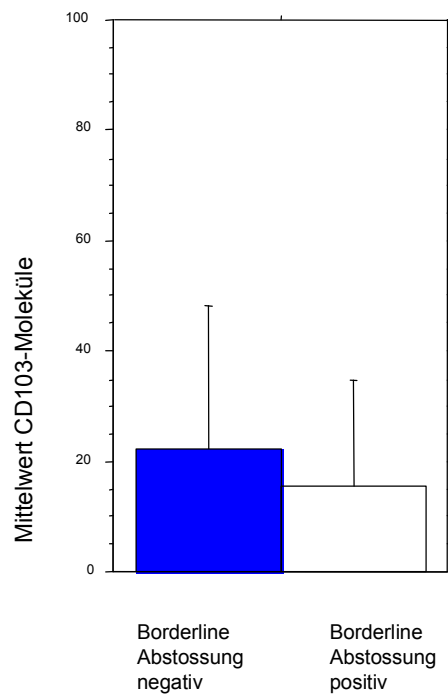
	<b>Gruppe Qualitative Abstossung</b>	<b>Gruppe Akute Abstossung</b>	<b>Gruppe Borderline Abstossung</b>	<b>Gruppe Chronische Abstossung</b>
<b>Anzahl Proben</b>	36	16	20	16
<b>Laborwerte (Serum)</b>				
<b>Kreatinin (mg/dl)</b>	3,0 (1,6-9,6)	3,8 (6-9,6)	2,6 (1,6-7,3)	2,7 (1,4-6,0)
<b>Harnstoff (mg/dl)</b>	121 (45-260)	121 (60-246)	115 (45-260)	101 (42-152)
<b>Zeit seit NTX (Tage)</b>	201 (8-5686)	71,5 (8-4229)	474 (10-5686)	1424,5 (155-6117)
<b>RT-PCR (Molek/µl)</b>				
<b>CD103 mRNA</b>	0 (0-750)	0 (0-750)	0 (0-176)	0 (0-281)
<b>CD103 Mittelwert</b>	32	52	15	39



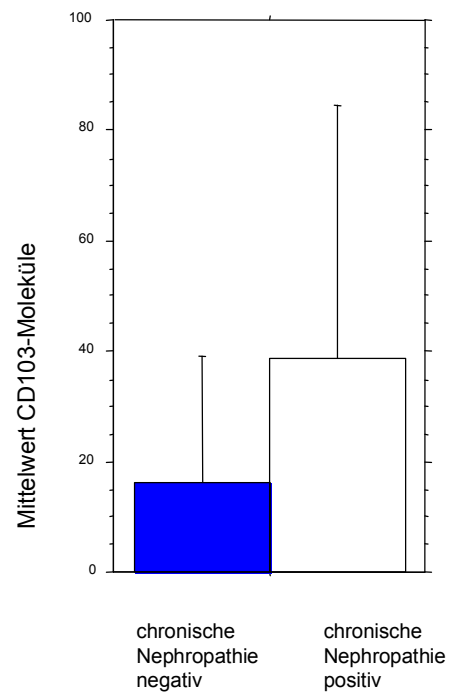
**Abb. 18a:** Mittelwerte und 95% Konfidenz-Intervall der Untergruppe qualitative Abstossung



**Abb. 18b:** Mittelwerte und 95% Konfidenz-Intervall der Untergruppe akute Abstossung



**Abb. 18c:** Mittelwerte und 95% Konfidenz-Intervall der Untergruppe Borderline Abstossung



**Abb. 18d:** Mittelwerte und 95% Konfidenz-Intervall der Untergruppe chron. Nephropathie

## 4.4 Messung der CD103-mRNA-Konzentrationen in Urinproben transplanteder Patienten mittels RT-PCR am LightCycler

### 4.4.1 Analyse der Gesamtergebnisse

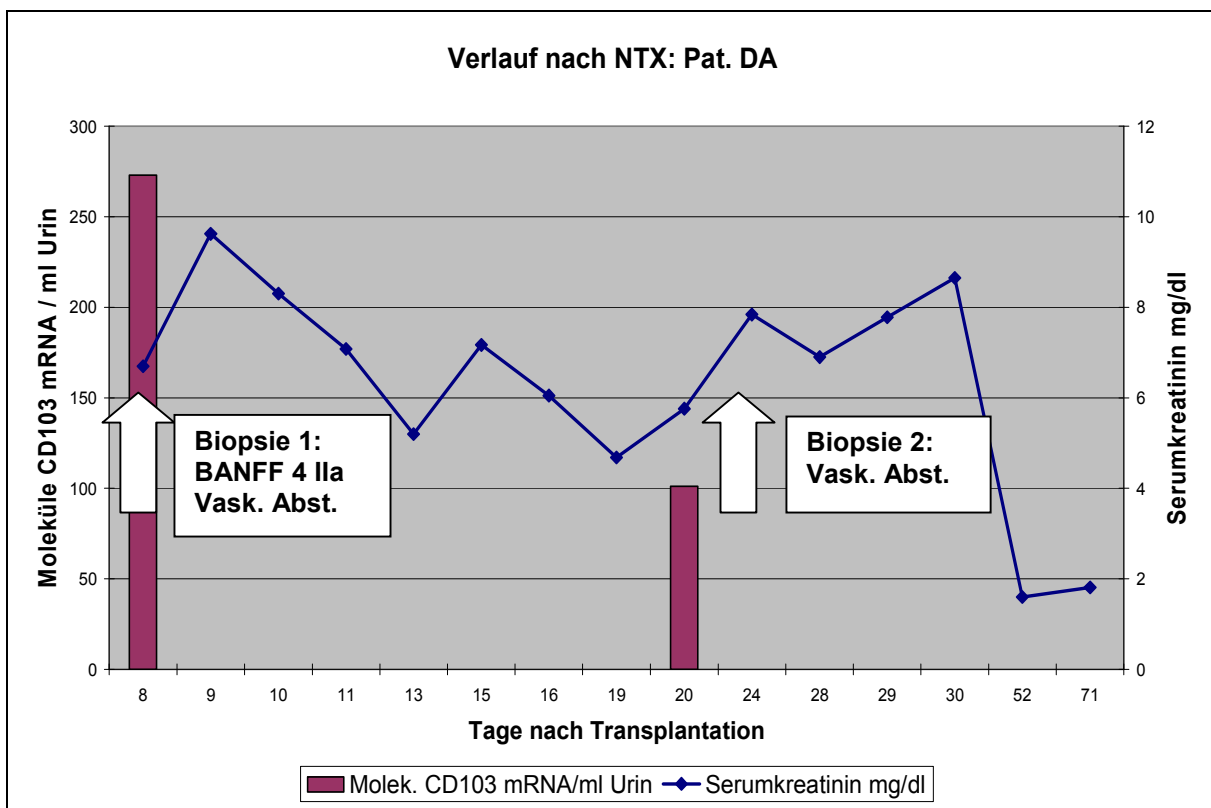
Bei der Messung der Patientenproben zeigte sich, dass von den 82 Proben 71 negativ und 11 für CD103 mRNA positiv waren. Die 11 positiven Proben wiesen Werte von 10 bis 750 Molekülen/ $\mu$ l auf.

**Tab. 14:** Verteilung der CD103 mRNA-positiven Ergebnisse im Evaluations-Kollektiv

Moleküle/ $\mu$ l	Anzahl	%	Kumulierte %
0	71	86,6	86,6
<100	7	8,6	95,2
100-200	2	2,4	97,6
200-300	1	1,2	98,8
>300	1	1,2	100

### 4.4.2 Entwicklung der CD103 mRNA Konzentrationen im Verlauf von Abstossungsreaktionen bei einzelnen Patienten

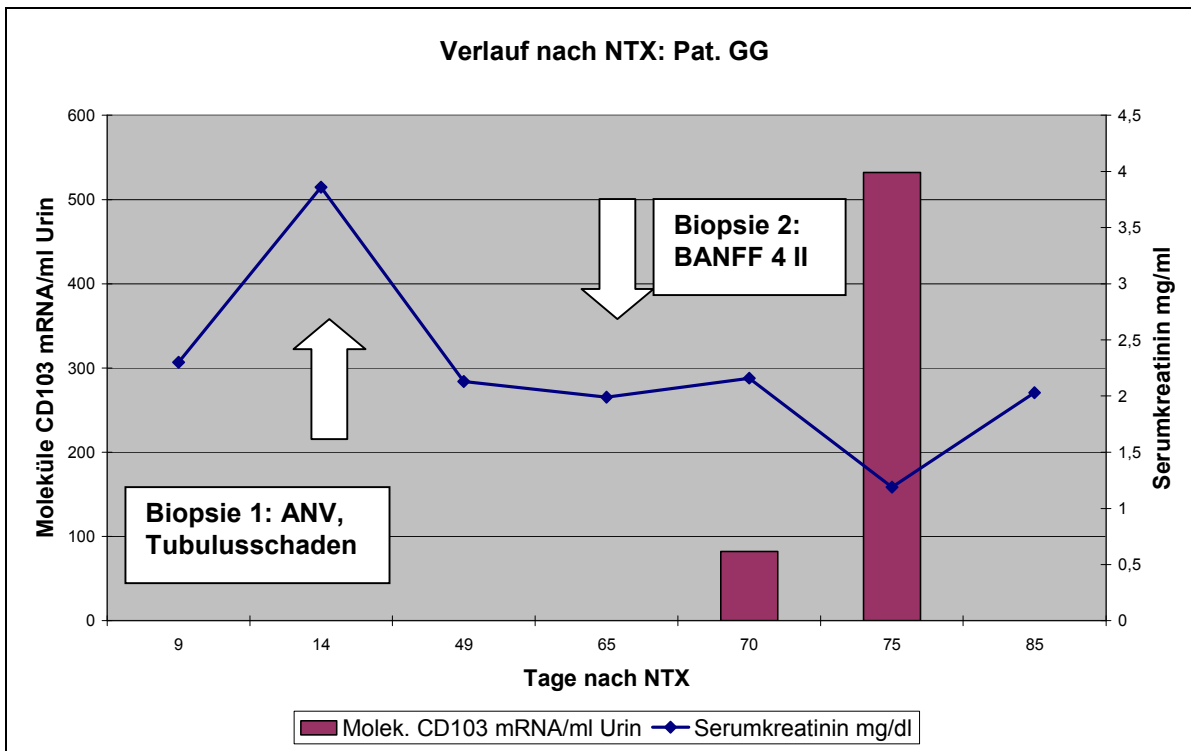
Bei 5 Patienten wurde im Anschluss an die Transplantation der Verlauf die Parameter Serumkreatinin, CD103-mRNA-Konzentration im Urin sowie die Befunde der stattgehabten Nierenpunktionen erfasst und dargestellt. Ziel war die Identifizierung eines bestimmten Zeitpunktes, zu dem die CD103-mRNA-Konzentration im Urin ansteigt. Es zeigten sich individuell sehr unterschiedliche Zeitpunkte der CD103-mRNA-Anstiege im Urin.



**Abb. 19:** Verlauf von Serumkreatinin, CD103-mRNA-Konzentration im Urin und Biopsiebefunden bei Patient DA

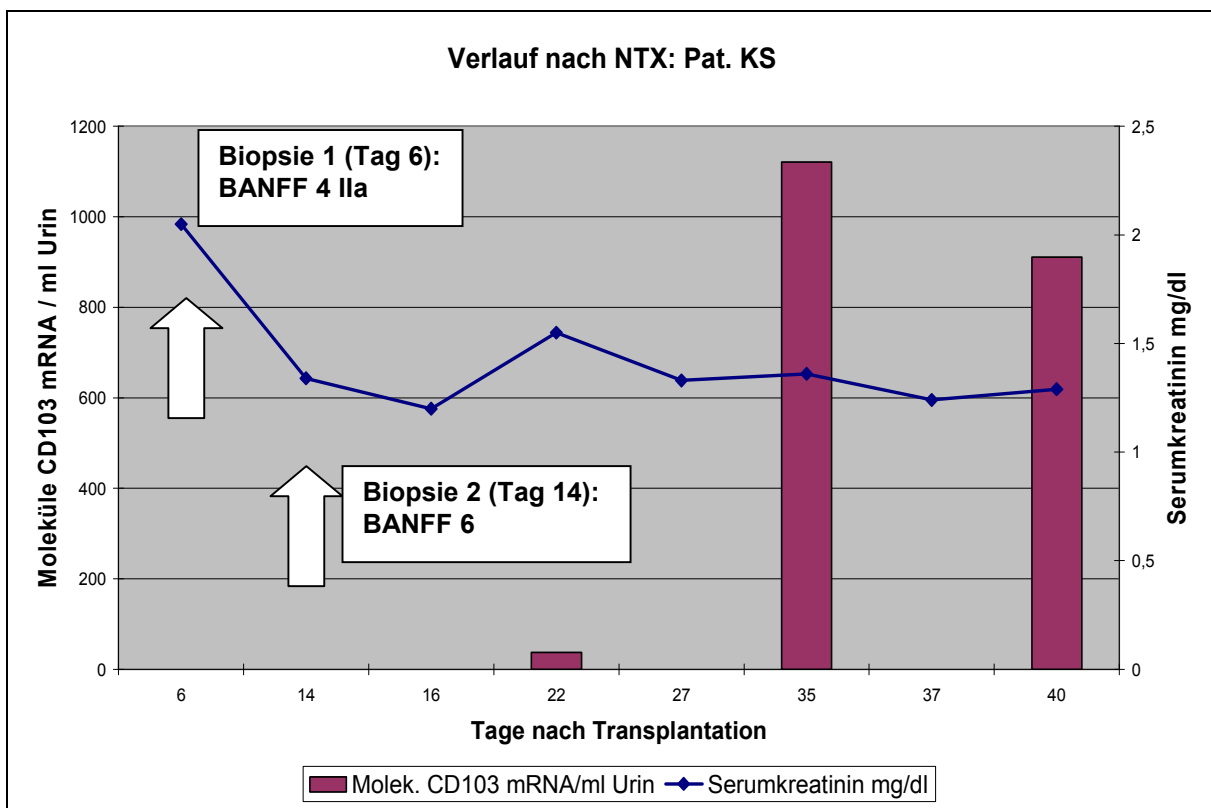
Bei Patient DA wurde am 8. postoperativen Tag wegen bestehender Oligurie und Dialysepflicht eine Nierenpunktion durchgeführt. Die Histologie wies Zeichen einer akuten Abstossung sowie einer Vaskulitis auf. Zeitgleich konnte eine CD103 mRNA-Konzentration von über 270 Molekülen pro ml Urin nachgewiesen werden. Patient DA erhielt eine OKT3-Therapie, in der Kontrollbiopsie am 24. postoperativen Tag wurde bei nur leicht gesteigener Diurese (140 auf 900 ml/Tag) eine persistierende Vaskulitis nachgewiesen. Am 20. Tag, kurz vor dem Zeitpunkt der zweiten Punktion, war wiederum eine erhöhte CD103 mRNA-Konzentration im Urin nachweisbar. Unter der anschliessend begonnenen ATG-Therapie und der Umstellung von Tacrolimus auf Sirolimus wurde der Patient schliesslich polyurisch und die Retentionsparameter begannen zu fallen. Die Anstiege der CD103-mRNA-Konzentration im Urin treten bei diesem Patienten jeweils vor erneuten Anstiegen der Kreatininkonzentration auf.





**Abb. 20:** Verlauf von Serumkreatinin, CD103-mRNA-Konzentration im Urin und Biopsiefunden bei Patient GG

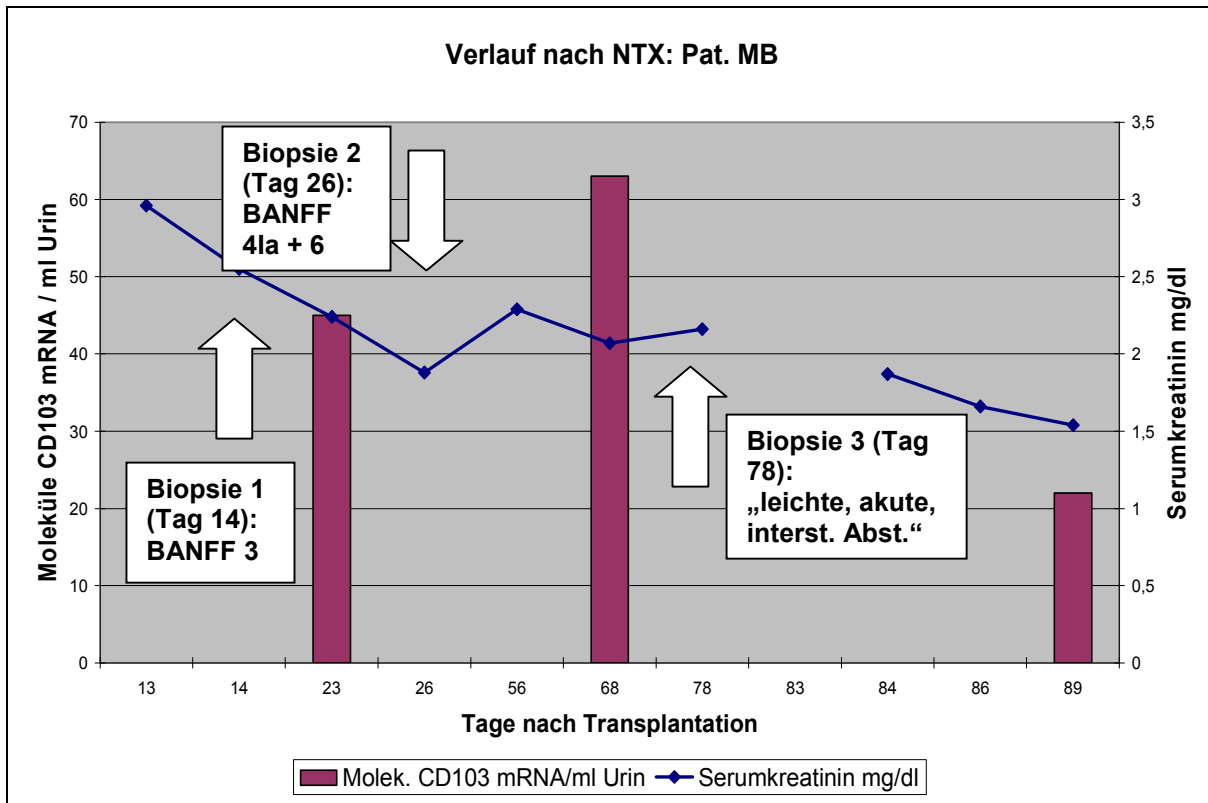
Nach einem primär unkomplizierten Verlauf kam es ab 8. postoperativen Tag innerhalb von 48 Stunden zum Diureserückgang bis zur Anurie. In der Bildgebung konnten flächige Perfusionsausfälle im Sinne von Niereninfarkten und Nekrosen nachgewiesen werden. Histologisch wurde ein toxischer Tubulusschaden mit Zeichen des akuten Nierenversagens diagnostiziert. Die Diurese kam anschliessend zunächst wieder in Gang, bevor der Patient am 5. Tag nach Punction Blutungskomplikationen zeigte, die eine Notoperation erforderlich machten. Patient GG stabilisierte sich anschliessend und konnte 6 Wochen nach Transplantation in die ambulante Nachbetreuung entlassen werden. Nach weiteren 3 Wochen war nach Anstieg der Retentionsparameter unter dem Verdacht auf eine akute Abstossungsepisode eine stationäre Aufnahme zur Nierenpunktion erforderlich. Die Histologie ergab eine tubulo-interstitielle Abstossung Grad II. Es wurde unverzüglich eine OKT3-Therapie eingeleitet später die immunsuppressive Medikation von Ciclosporin A auf Sirolimus umgestellt. 4 bzw. 9 Tage nach Beginn der OKT3-Therapie waren erhöhte von CD103-mRNA-Konzentrationen im Urin zu verzeichnen (82 bzw. 532 Moleküle pro ml Urin).



**Abb. 21:** Verlauf von Serumkreatinin, CD103-mRNA-Konzentration im Urin und Biopsiebefunden bei Patient KS

Patient KS wurde unmittelbar nach der Transplantation polyurisch wies abfallende Retentionswerte auf. Ab dem 5. postoperativen Tag wurden Schmerzen im Transplantat angegeben und das Serumkreatinin lag bei 2 mg%. Die Nierenpunktion erbrachte eine diskrete vaskuläre Abstossung, die mit einem 3tägigen Steroidstoss behandelt wurde. Das Kreatinin fiel auf Werte um 1 mg%, bevor am 14. postoperativen Tag ein erneuter Anstieg zu verzeichnen war. Die Biopsie ergab Veränderungen im Sinne eines akuten Nierenversagens, jedoch keine Abstossung. Dennoch fiel unter dem empirisch eingeleiteten Steroidstoss das Kreatinin wieder ab und der Patient konnte entlassen werden. In der ambulanten Nachbetreuung klagte der Patient 5 Wochen nach der Transplantation über Schmerzen im Transplantat, die sich während der empirisch eingeleiteten Steroidstosstherapie besserten. Eine Analyse des Urins ergab für den 35. postoperativen Tag eine hohe Konzentration von Perforin-mRNA, was für eine Abstossungsreaktion spricht (Li et al., 2001 sowie eigene, unveröffentlichte Daten). Ebenso war an diesem Tag wie auch 5 Tage später die CD103-mRNA-Konzentration im Urin massiv erhöht.

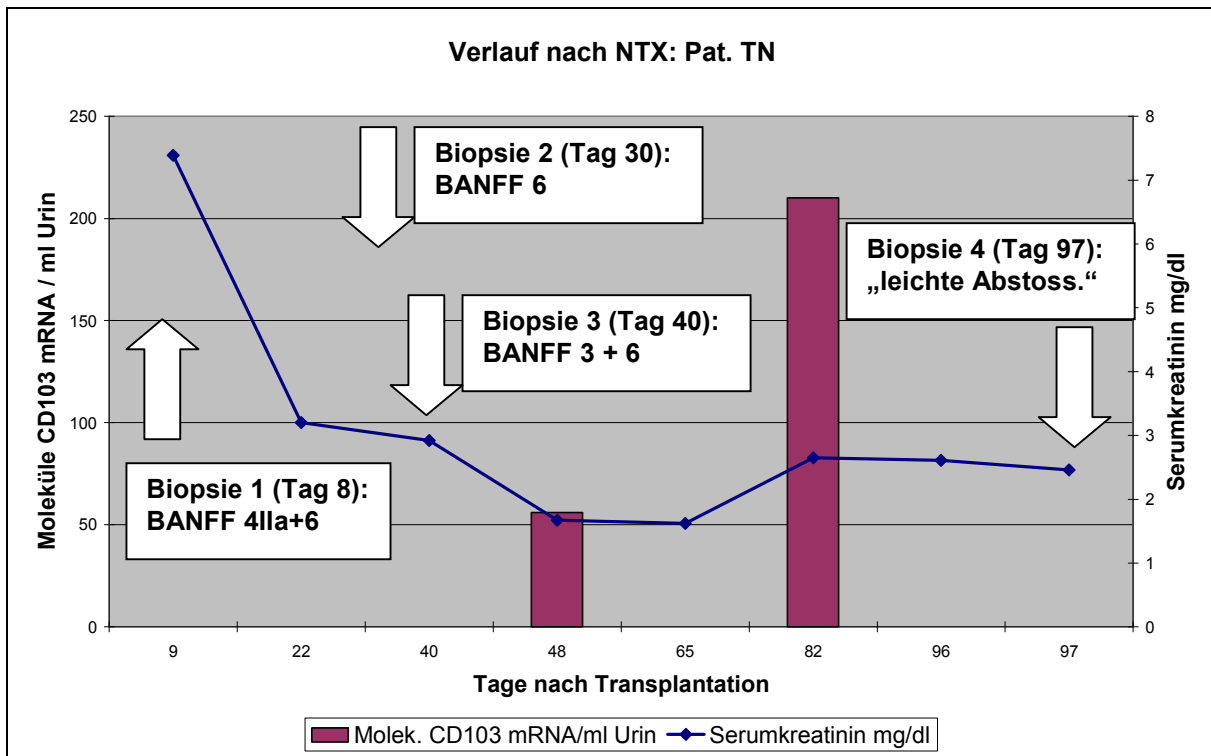
Eine Punktion erfolgte leider nicht, sodass eine Korrelation zu histologisch bestätigten Abstossungen nicht erfolgen konnte.



**Abb. 22:** Verlauf von Serumkreatinin, CD103-mRNA-Konzentration im Urin und Biopsiebefunden bei Patient MB

Patient MB zeigte postoperativ einen unkomplizierten Verlauf, bevor am 7. Tag die Retentionswerte stagnierten. Unter einer empirisch eingeleiteten Steroidtherapie kam es zu einem Abfall des Serumkreatinins und zu einer Zunahme der Diurese. Als am 15. postoperativen Tag erneut ein Anstieg der Retentionsparameter zu verzeichnen war, wurde eine Nierenbiopsie durchgeführt. Die Histologie ergab ein aktues Nierenversagen sowie leichte interstitielle und tubulo-aggressive Infiltrate. Als Konsequenz wurde die immunsuppressive Medikation von Ciclosporin auf Tacrolimus umgestellt und vorläufig die Steroiddosis erhöht. Nach einem vorübergehenden Abfall der Retentionswerte zeigte sich ein erneuter Anstieg. Die Histologie wies immer noch Zeichen einer Abstossung auf, sodass von einer steroidrefraktären Abstossung ausgegangen werden musste. Unter der ab 26. postoperativen Tag eingeleiteten ATG-Therapie kam es zum Abfall des Serumkreatinins auf 1,6 mg%. 11 Wochen nach der Transplantation

zeigten sich erneut steigende Retentionswerte, die eine stationäre Aufnahme zur Nierenpunktion erforderlich machten. Histologisch wurde eine akute tubulo-interstitielle Abstossung diagnostiziert, die mit einer OKT3-Therapie behandelt wurde woraufhin das Kreatinin abfiel. Anstiege der CD103-mRNA-Konzentrationen zeigen sich am 23., 68. und 89. Tag und sind nicht sicher bestimmten Abstossungsperioden zuzuordnen.



**Abb. 23:** Verlauf von Serumkreatinin, CD103-mRNA-Konzentration im Urin und Biopsiebefunden bei Patient TN

Patient TN benötigte postoperativ weitere Dialysesitzungen, da das Transplantat anfangs nur wenig Urin ausschied. Bei der am 8. postoperativen Tag durchgeführten Punktion wurde eine vaskuläre Abstossung mit Zeichen einer humoralen Komponente nachgewiesen. Der Patient erhielt über 14 Tage polyklonale Antikörper ATG sowie insgesamt 10 Plasmapheresesitzungen. Die Diurese kam in Gang und die Retentionsparameter fielen, sodass die Dialyse ausgelassen werden konnte. Bei einer Kontrollpunktion am 30. postoperativen Tag wurde histologisch ein Akutes Nierenversagen und ein CyA-Schaden festgestellt. Die immunsuppressive Therapie wurde im Verlauf mehrfach angepasst. Am 40. Tag wurde wegen steigenden Kreatinins eine erneute Punktion erforderlich, diesmal zeigte sich eine tubulusaggressive Abstossung. Mit einer

OKT3-Gabe konnte diese Abstossung soweit unter Kontrolle gebracht werden, dass Patient TN 8 Wochen nach Transplantation in die ambulante Nachsorge entlassen werden konnte. Die CD103-mRNA-Konzentration im Urin stieg 8 Tage nach Beginn der OKT3-Therapie an. In der Nachsorge wurde weitere 4 Wochen nach der Entlassung aus dem stationären Aufenthalt nochmals ein deutlich positiver Wert gemessen. Gut 3 Monate nach Transplantation kam es erneut zu einem Kreatininanstieg, der eine Biopsie erforderlich machte. Histologisch wurde eine leichte Abstossung diagnostiziert, die mit einer Kortisonstosstherapie behandelt wurde.

Bei den betrachteten Fällen lässt sich kein bestimmtes Verlaufsmuster der CD103-mRNA-Anstiege im Urin identifizieren. Die Verläufe in den Fällen DA und MB lassen den Schluss zu, dass CD103 einen frühen Zeitpunkt im Verlauf einer Abstossung markiert. Im Fall MB musste allerdings von einer steroidresistenten Abstossung mit einem persistierenden alloreaktiven Prozess ausgegangen werden. Eine Zuordnung der CD103-Konzentrationen zu bestimmten Ereignissen wäre hoch spekulativ. Bei GG und TN lassen sich 4 bis 8 Tage nach der Abstossungstherapie mit OKT3 jeweils CD103-Anstiege nachweisen. Denkbar ist, dass die beteiligten CD8+CD103+T-Zellen im Tubulusepithel der Transplantatniere im Laufe der Therapie eliminiert werden, in den Urin gelangen und ihre mRNA dann nachweisbar wird. Die Mehrzahl der CD103-Konzentrationsanstiege ist jedoch keinem spezifischen Ereignis zuzuordnen.

## **4.5 Evaluation der quantitativen „one-step“ RT-PCR am LightCycler anhand der Histologien**

### **4.5.1 Eckpunkte der Bewertung**

Erster Schritt war die Etablierung einer quantitativen „one-step“ RT-PCR unter Verwendung eines externen RNA-Standards, die die Konzentration von CD103-mRNA im Urin zuverlässig misst. Die Methode sollte anschliessend anhand von zeitnah erhobenen histopathologischen Befunden der Transplantatnieren evaluiert werden. Aus dem Patientenkollektiv wurden Untergruppen gebildet, die gleiche, nach der Banff 97-Klassifikation erhobene Befunde aufwiesen. Die entsprechenden CD103-mRNA-Konzentrationen wurden mit den histopathologischen Befunden korreliert. Ausserdem wurde die Werte der Parameter Serumkreatinin analysiert und im Vergleich mit der CD103-mRNA-Konzentration auf seine

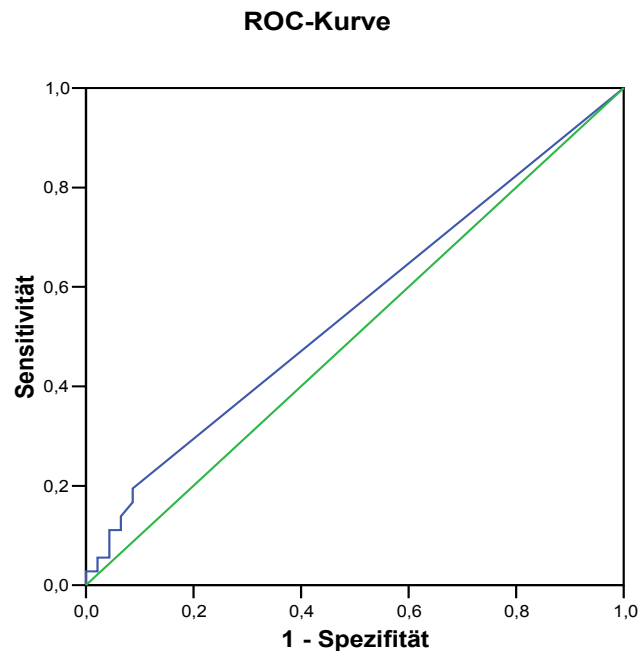
Aussagekraft hinsichtlich möglicher Abstossungsreaktionen verglichen. Auf einen Vergleich der RT-PCR mit anderen geeigneten Markern der Nierenfunktion wie z.B. Cystatin C musste wegen fehlender zeitnaher Bestimmung entsprechender Laborwerte verzichtet werden.

#### **4.5.2 CD103-mRNA-Konzentration als Marker für qualitative Abstossung**

Histopathologisch wurden 36 Punktate entweder als „Akute Abstossung“ oder als „Borderline Abstossung“ befundet. 46 Gewebszylinder wiesen keine entsprechenden Zeichen auf. Die CD103-mRNA-Konzentration im Urin war in 7 von 36 positiven Histologien ebenfalls positiv, blieb jedoch in 29 Fällen negativ. Von 42 negativen Histologien war CD103-mRNA in 4 Fällen positiv.

Die ROC Analyse ist eine statistische Methode, um die diagnostische Genauigkeit eines Testes zu analysieren oder auch Testverfahren miteinander zu vergleichen. Dabei wird jeder Messwert vom Minimum bis zum Maximum der bestimmten Messungen als „Cut-off“ Wert gesetzt und jeweils die Sensitivität und Spezifität des Verfahrens geschätzt. Die so entstandenen Paare aus Sensitivität und Spezifität werden in einem Koordinatensystem mit x-Achse (1-Spezifität = falsch positive Fälle) und y-Achse (Sensitivität = richtig positiv erkannte Fälle) aufgetragen. Durch Verbinden der Punkte entsteht die sogenannte „Receiver Operating Characteristic“(ROC)-Kurve, deren Fläche unter der ROC-Kurve („Area under the curve“ = AUC) ein Maß für die diagnostische Genauigkeit des Testverfahrens darstellt. Die AUC gibt die Wahrscheinlichkeit an, dass zwei zufällig gezogene Patienten aus den beiden Kollektiven über den gesamten Wertebereich richtig zugeordnet werden. Wenn keine speziellen Voraussetzungen an Sensitivität oder Spezifität bestehen, ist dies der beste Index zur Einschätzung eines diagnostischen Verfahrens.

Daneben kann mit einer Betrachtung der Fläche unter der entstandenen Kurve AUC (Area under curve) abgeschätzt werden, ob sich die Messwerte von zufälligen Ergebnissen unterscheiden. Ein Kurvenverlauf entlang der Diagonalen ergibt eine AUC von 0,5 und entspricht zufälligen Messergebnissen. Bezüglich der CD103-mRNA-Konzentrationen als Marker für qualitative Abstossungen ergab sich eine AUC von 0,553, was sich nur wenig von zufälligen Messwerten unterscheidet.



**Abb. 24:** ROC-Kurve für qualitative Abstossung (Akut oder Borderline),  $n=36$ ,  $AUC=0,553$ ,  $95\%CI[0,439-0,663]$ ,  $p=0,414$ , Sensitivität=19%, Spezifität=91%, Cut-off-criterium  $>0$  Moleküle

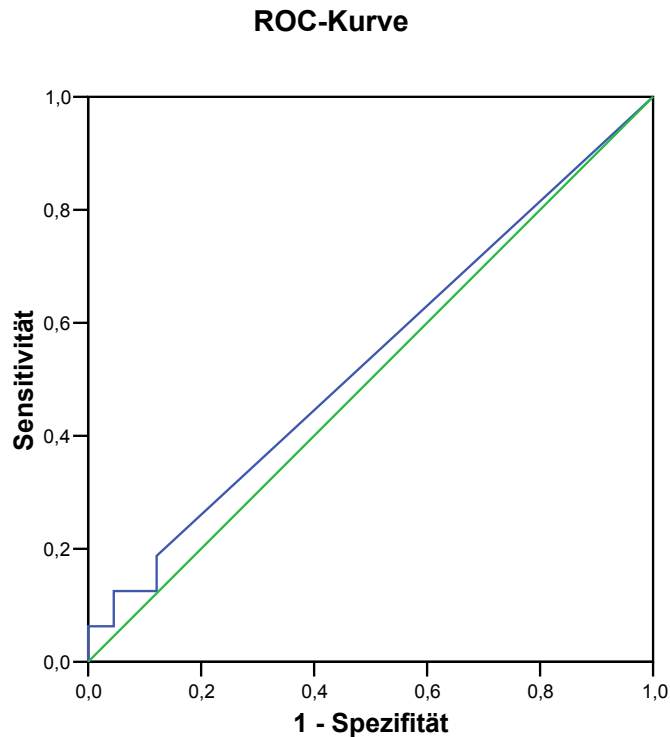
**Tab. 15:** Kreuztabelle CD103-Positive \* Qualitative Abstossung (Akut oder Borderline)

	Histologie: Akute oder Borderline Abstossung		Gesamt
	negativ	positiv	
CD103-mRNA positiv	4	7	11
CD103-mRNA negativ	42	29	71
Gesamt	46	36	82

Im  $\chi^2$ -Test ergibt sich ein Wert von  $\chi^2=2,0$  - was bei einem Signifikanzniveau von  $\alpha=0,05$  als nicht signifikant gilt. Das Ergebnis lässt darauf schliessen, dass positive CD103-mRNA-Ergebnisse unabhängig von dem Vorliegen einer Abstossung auftreten.

#### 4.5.3 CD103-mRNA-Konzentration als Marker für Akute Abstossung

Insgesamt wiesen 16 Nierenpunktate Zeichen einer akuten Abstossung auf, innerhalb dieser positiven Gruppe war CD103-mRNA in 3 Fällen positiv (Werte zwischen 10 und 750 Moleküle/ $\mu$ l). In 8 von 66 histologisch negativen Fällen wurde ein positives CD103-Ergebnis ermittelt. Die Fläche unter der ROC-Kurve beträgt 0,534.



**Abb. 25:** ROC-Kurve für akute Abstossung (n=16, AUC=0,534, 95%CI[0,421-0,645], p=0,674, Sensitivität=12,5%, Spezifität=95%, Cut-off-criterion >65)

**Tab. 16:** Kreuztabelle CD103-Positive \* Akute Abstossung

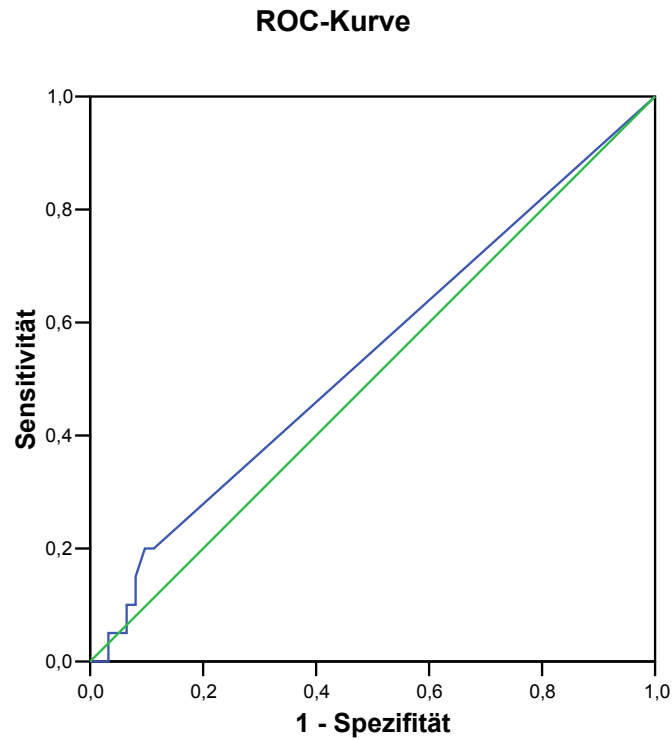
	Histologie: Akute Abstossung		Gesamt
	negativ	positiv	
CD103-mRNA positiv	8	3	11
CD103-mRNA negativ	58	13	71
Gesamt	66	16	82

Bei einem Chi-Wert von  $\chi^2 = 1,5$  bei einem Signifikanzniveau von  $\alpha=0,05$  ergibt sich kein signifikanter Zusammenhang.

#### 4.5.4 CD103-mRNA-Konzentration als Marker für Borderline-Abstossung

Von den 20 histologisch diagnostizierten Borderline-Abstossungen waren nur 4 auch positiv für CD103-mRNA. Jedoch wiesen 7 der 62 negativen Borderline-Histologien einen positiven CD103 mRNA – Wert auf. Die Fläche unter der ROC-Kurve beträgt 0,542.





**Abb. 26:** ROC-Kurve für Borderline Abstossung (n=20, AUC=0,542, 95%CI[0,428-0,652], p=0,578, Sensitivität=20%, Spezifität=90%, Cut-off-criterion >10)

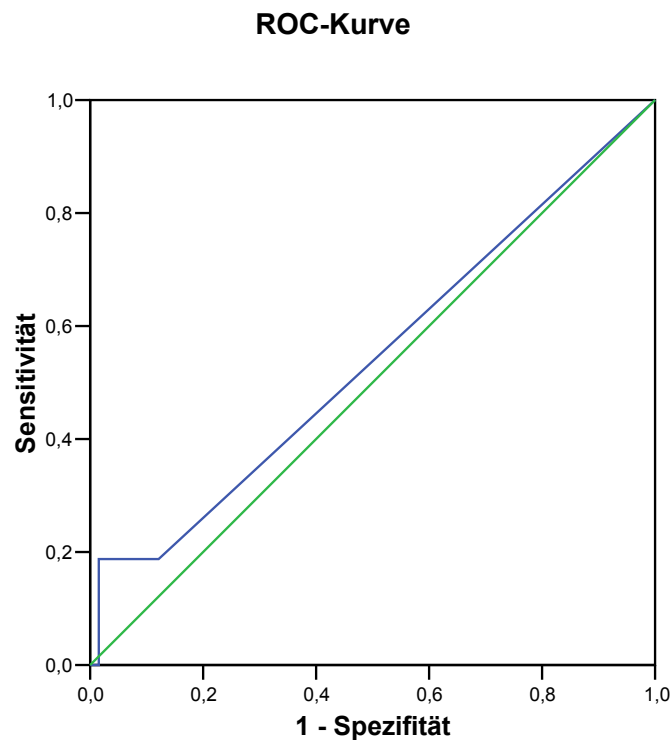
**Tab. 17:** Kreuztabelle CD103-Positive \* Borderline Abstossung

	Histologie: Borderline Abstossung		Gesamt
	negativ	positiv	
CD103-mRNA positiv	7	4	11
CD103-mRNA negativ	55	16	71
Gesamt	62	20	82

Der Chi-Wert beträgt  $\chi^2 = 2,66$ , bei einem Signifikanzniveau von  $\alpha = 0,05$  ergibt sich kein signifikanter Zusammenhang.

#### 4.5.5 CD103-mRNA-Konzentration als Marker für chronische Transplantatnephropathie

16 Gewebeproben wurden als chronische Transplantatnephropathie befundet. Davon war in 3 Fällen ein positiver Wert für CD103mRNA gemessen worden. Von den 66 negativen Histologien war in 8 Fällen CD103-mRNA positiv. Die Fläche unter der ROC-Kurve war 0,542.



**Abb. 27:** ROC-Kurve für CD103 bei chronischer Transplantatnephropathie (n=16, AUC=0,542, 95%CI[0,428-0,652], p=0,607, Sensitivität=18%, Spezifität=98%, Cut-off-criterion=73)

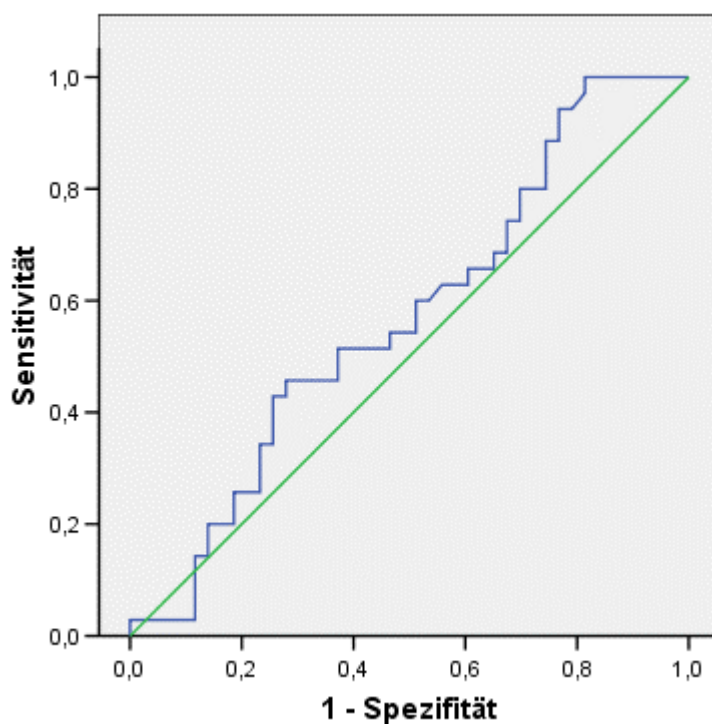
**Tab. 18:** Kreuztabelle CD103-Positive \* Chronische Transplantatnephropathie

	Histologie: Chronische Transplantatnephropathie		Gesamt
	negativ	positiv	
CD103-mRNA positiv	8	3	11
CD103-mRNA negativ	58	13	71
Gesamt	66	16	82

Bei einem Signifikanzniveau von  $\alpha=0,05$  ergibt sich mit dem Chi-Wert von  $\chi^2 = 1,5$  kein signifikanter Zusammenhang.

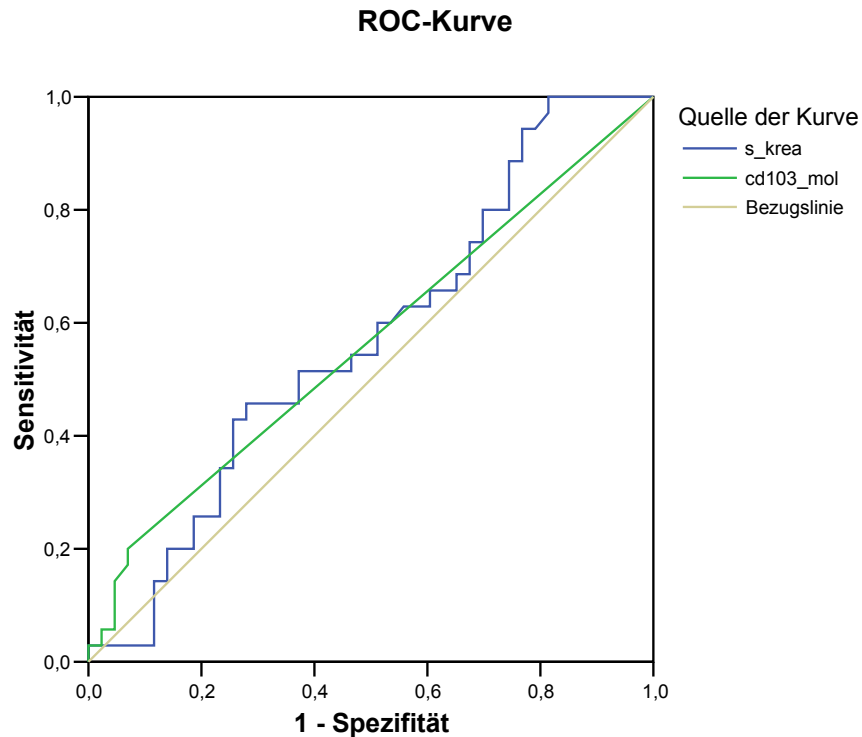
#### 4.5.6 Methodenvergleich: Serum-Kreatin – CD103-mRNA-Konzentration im Urin

Ein erster Anhaltspunkt für eine Funktionseinschränkung des Nierentransplantats wird oft durch einen erhöhten Serumkreatininwert geliefert. Das Kreatinin ist zwar ein sehr sensitiver, jedoch kein besonders spezifischer Marker. Eine Erhöhung kann auch durch zahlreiche andere Ursachen, z.B. akutes Nierenversagen, Cyclosporin-Toxizität oder einen viralen Infekt begründet sein. Um einen geeigneten Grenzwert für das Serum-Kreatinin im Kollektiv der Transplantierten festlegen zu können, wurden die eine ROC-Analyse durchgeführt, die einen Cutoff von 1,5 mg/dl ergab.



**Abb. 28:** ROC-Kurve für Serumkreatinin bei qualitativer Abstossung (n=36, AUC=0,571, 95%CI[0,443-0,698], p=0,285, Sensitivität=100%, Spezifität=19%, Cut-off-criterion=1,5 mg/dl)

In der folgenden ROC-Kurve wurden zum Methodenvergleich die Ergebnisse des Serumkreatinins (Werte >1,5 mg/dl) und der CD103-mRNA-Konzentration im Urin nebeneinander aufgetragen.



**Abb. 29:** ROC – Kurve für den Parametervergleich Serum-Kreatinin vs. CD103-RT-PCR zur Diagnose einer zellulären Rejektion.

Die Flächen unter den Kurven betragen für das Serumkreatinin 0,571 und für die CD103-mRNA-Konzentration 0,564. Das Serumkreatinin ist also in dieser Darstellung minimal besser als die RT-PCR. Insgesamt weichen beide Kurven nur wenig von zufälligen Ergebnissen ab. Wesentlicher Einflussfaktor für die Bewertung der CD103-RT-PCR ist hier die hohe Zahl von negativen Messergebnissen, die eine Quantifizierung erschwert. Beim Vergleich von Serumkreatinin mit der CD103-mRNA-Konzentration mit Hilfe des McNemar-Tests stellt sich aufgrund der hohen Sensitivität das Kreatinin signifikant besser dar (siehe exemplarisch Tab. 19).

**Tab. 19:** McNemar – Test für Methodenvergleich Serumkreatinin – CD103-mRNA anhand der Untergruppe „Akute Abstossung“

	Serumkreatinin >1,5 mg/dl		
	positiv	negativ	
CD103-mRNA positiv	3	0	3
CD103-mRNA negativ	13	0	13
	16	0	16
Signifikanzschranke	0,05		
TG	11,077		
Prüfgrösse	<b>0,001</b>	sign.	

Mit dem McNemar-Test für verbundene Stichproben kann eingeschätzt werden, ob sich die Häufigkeiten in den Stichproben signifikant unterscheiden oder rein zufällig auftreten. Dafür betrachtet man die Differenz der Proben, die in beiden diagnostischen Methoden unterschiedliche Ergebnisse aufweisen und setzt sie ins Verhältnis zur Summe dieser Proben. Die so errechnete Prüfgrösse wird mit den Werten der  $\chi^2$ -Verteilung für 1 Freiheitsgrad und in diesem Fall dem Konfidenzniveau von 95% verglichen. Im obigen Beispiel ist die errechnete Testgrösse mit 11,077 grösser als der kritische Wert aus der  $\chi^2$ -Verteilung (3,841). Man kann davon ausgehen, dass ein signifikanter Unterschied zwischen dem Auftreten der Ergebnisse des Serumkreatinins und der CD103-mRNA-Konzentration im Urin bei Abstossungsreaktionen von Nierentransplantierten besteht. Ein rein zufälliger Unterschied kann mit grosser Sicherheit ausgeschlossen werden.

#### 4.5.7 Zusammenfassung: Evaluation der „one-step“ RT-PCR am LightCycler

Anhand der Kreuztabellen wurden für die Evaluation der CD103-RT-PCR als diagnostischen Tests die Kennzahlen Sensitivität, Spezifität, positiver und negativer prädiktiver Wert errechnet (siehe Tab. 20). Es liegen bei dieser qualitativen Auswertung sehr niedrige Sensitivitäten bis 20%, jedoch passable Spezifitäten bis 91% vor. Der positive prädiktive Wert liegt für die Gruppe der qualitativen Abstossungen bei 0,64, in allen anderen Gruppen bei 0,27. Als negative prädiktive Werte wurden in den Gruppen 0,59 bis 0,82 ermittelt.

Insgesamt ergibt sich daraus, dass die CD103-mRNA-Konzentration in keiner der Untergruppen einen geeigneten Marker für eine Transplantatabstossung darstellt.

**Tab. 20:** Übersicht: CD103-RT-PCR Kennzahlen je Teilgruppe des Evaluationskollektivs (ermittelt anhand der Kreuztabellen)

	<b>Gruppe Qualitative Abstossung</b>	<b>Gruppe Akute Abstossung</b>	<b>Gruppe Borderline Abstossung</b>	<b>Gruppe Chronische Abstossung</b>
<b>Sensitivität (%)</b>	<b>19</b>	<b>19</b>	<b>20</b>	<b>19</b>
<b>Spezifität (%)</b>	<b>91</b>	<b>88</b>	<b>89</b>	<b>88</b>
<b>Pos. Präd. Wert</b>	<b>0,64</b>	<b>0,27</b>	<b>0,27</b>	<b>0,27</b>
<b>Neg. Präd. Wert</b>	<b>0,59</b>	<b>0,82</b>	<b>0,77</b>	<b>0,82</b>

## **5. Diskussion**

### **5.1 Bezug zu Fragestellung und Ergebnissen**

In dieser Arbeit wurde eine quantitative "one-step" RT-PCR am LightCycler etabliert, mit der die CD103-mRNA-Konzentration im Urin bestimmt werden kann. Mit Hilfe dieser Methode wurden 229 Urinproben von nierentransplantierten Patienten gemessen, die Zeichen einer Transplantatabstoßung aufwiesen. Die Patienten unterzogen sich parallel dazu einer Nierenbiopsie, bei der Gewebezylinder für eine histopathologische Befundung gewonnen wurden. Anhand der Ergebnisse des histologischen Befundes wurden die etablierte RT-PCR hinsichtlich ihrer Eignung, eine akute zelluläre oder chronische Rejektion zu diagnostizieren, evaluiert.

Während in bisher veröffentlichten Studien semiquantitative Messungen der CD103-mRNA im Urin eingesetzt wurden (Ding et al., 2003), sollte in dieser Arbeit eine quantitative Methode für die Messung absoluter Werte etabliert und evaluiert werden. Die wichtigsten Ergebnisse sind:

- Die etablierte quantitative „one-step“ RT-PCR ist aus technischer Sicht geeignet, CD103-mRNA-Konzentrationen im Urin zu messen.
- Die Konzentration von CD103-mRNA im Urin ist kein geeigneter Marker zur Erkennung von akuten oder chronischen Abstossungsreaktionen nach Nierentransplantation.
- Bei Messungen im Zeitverlauf nach Nierentransplantationen ist kein Zeitpunkt identifizierbar, an dem die CD103-mRNA-Konzentration im Urin reproduzierbar signifikant ansteigt.
- Im Vergleich der Methoden sind weder Serumkreatinin noch CD103 gut geeignete Marker für die Abstossungsdiagnostik.

### **5.2 Die Methode: Quantitative „one-step“ RT-PCR am LightCycler zur Messung der CD103-RNA-Konzentration im Urin**

Zentraler Aspekt war die Erstellung einer Verdünnungsreihe mehrerer CD103-mRNA-Konzentrationen, die als externer Standard für die Quantifizierung der Patientenproben nach der LightCycler-RT-PCR diente.

### 5.2.1 Messbereich und Detektionslimit

Nach anfänglichen Problemen mit diversen Primerpaarungen konnte mit dem Primerpaar 33 eine externe Standardreihe mit guten Eigenschaften erstellt werden. Das Detektionslimit lag bei 13 Molekülen, was einer Konzentration  $10^{-9}$  ng/ $\mu$ l entspricht und damit vergleichbar mit den Ergebnissen anderer Untersucher (z.B. Vaermann et al., 2004) ist. Ausserdem war mit diesem Primerpaar auch bei der Messung von extrahierter Gesamt-RNA aus Patienten-Urinproben eine klare Differenzierung positiver und negativer Proben möglich. Die Bildung von Primerdimeren trat nur noch in bis zu 6 % der Proben auf, statt wie bei den anderen Primerpaaren in bis zu 69%. Die Probleme mit scheinbar „instabilen“ Standardreihen konnten durch die Verwendung von „carrier-RNA“-haltigen Puffer eliminiert werden.

### 5.2.2 Intra-Test und Inter-Test-Variabilität

Bei allen getesteten Primerpaarungen kamen anfangs Schwankungen von bis zu 69% bezogen auf die CD103-mRNA-Konzentration im Urin vor. Das für die Evaluation verwendete Primerpaar wies bei der Intra- und Inter-Test-Variabilität Schwankungen von bis zu 33% auf. In Veröffentlichungen, die eine ähnliche Methode verwendeten, wurde als Maß für die Intra- und Inter-Test-Variabilität der Variabilitätskoeffizient verwendet (Bustin 2000, Vaermann et al., 2004). Darunter versteht man den Quotienten aus Standardabweichung und Mittelwert. Bustin nennt für LightCycler RT-PCR – Methoden Variabilitätskoeffizienten von 0 bis 4%. Vaermann gibt bei seinen Untersuchungen ebenfalls Variabilitätskoeffizienten von ca. 1 % als Mass für die Intra-Test-Variabilität einer leistungsfähigen quantitativen RT-PCR an. Bei der hier entwickelten RT-PCR errechnet sich ein Variabilitätskoeffizient von 0,6 bis 2%, was vergleichbar mit bisher veröffentlichten quantitativen realtime-PCR-Techniken ist.

In einer Studie von Stahlberg et al. wurden verschiedene Priming Strategien für den Schritt der Reversen Transkription verglichen und anschliessend die Güte der gesamten RT-PCR mit der Standardabweichung (Standard Deviation = SD) der Inter-Test-Variabilität angegeben (Stahlberg et al., 2004). Dabei erreichte man für die Amplifikation unterschiedlicher Gene unter der Verwendung genspezifischer Primer eine SD von 0,11 bis 0,24 Zyklen bezogen auf den  $C_t$ , den Schwellenzyklus, bei dem die loglineare Phase der PCR beginnt. Bei der in dieser Arbeit entwickelten Methode lagen die entsprechenden SD zwischen 0,23 und 0,40 Zyklen, was auf eine



breitere Streuung der Messwerte hinweist. Allerdings ist diese Studie nur eingeschränkt vergleichbar, da es sich bei Stahlbergs Experiment um eine two-step RT-PCR handelte.

### 5.2.3 Einschätzung möglicher Fehlerquellen

Verschiedene Einflussgrößen können zu falsch positiven oder falsch negativen Messergebnissen führen. Eine mögliche Fehlerquelle ist die hohe Empfindlichkeit von RNA gegenüber ubiquitären RNAsen, wie RNAspaltende Enzyme genannt werden. Durch das unverzügliche Einfrieren der Urinproben nach Entnahme, zügige Verarbeitung der Proben beim Extrahieren der Gesamt-RNA und bei der PCR-Vorbereitung sowie durch konsequentes Lagern der Proben auf Trockeneis wurde versucht, der Empfindlichkeit der RNA Rechnung zu tragen. Bekannter Faktor bei der Lagerung extrahierter RNA ist die Tendenz der Nukleinsäuremoleküle, an Kunststoffwänden der verwendeten Gefässe zu adsorbieren. Speziell bei niedrigen Konzentrationen kann es so zu erheblichen Verfälschungen in Form falsch negativer Ergebnisse kommen. Das verwendete Extraktionskit der Fa. Qiagen stellt einen Lösungspuffer mit carrier-RNA bereit, der einer Adsorption der Nukleinsäuren an Kunststoff entgegenwirkt. Ausserdem wurde, wenn immer möglich, die Messung der extrahierten RNA unmittelbar im Anschluss an den Extraktionsschritt durchgeführt.

Bei einer RT-PCR hängt viel von dem ersten Schritt – der Reversen Transkription - ab. Schon bei einer Differenz von wenigen revers transkribierten cDNA Molekülen kommt es aufgrund der exponentiellen Kinetik zu grossen Abweichungen des Quantifizierungsergebnisses. Neben Pipettierungenauigkeiten kommen hier unterschiedliche Enzymaktivitäten als Fehlerquelle in Frage, die schon allein bei der Verwendung neuer PCR-Kits spürbar werden können. Bei unserer Methode wurden bei jedem LightCycler-Lauf 2-3 Proben aus der Standardverdünnungsreihe mitgeführt, über die anschliessend mit Hilfe des externen Standards eine Quantifizierung erfolgte. Unterschiedliche Enzymaktivitäten verschiedener Kits wirken sich so auf alle Proben aus. Ein möglicher Fehler kann an dieser Stelle mittels externer Quantifizierung ausgeglichen werden.

Grundsätzlich besteht die Möglichkeit, dass bei sehr niedrigen RNA-Konzentrationen durch Primerdimerbildung die Amplifikation des spezifischen Produkts unterdrückt wird und so falsch negative Ergebnisse entstehen. Da allerdings Konzentrationen von  $10^{-9}$  ng/ $\mu$ l regelmässig

amplifizierbar waren und sich auch die Primerdimerbildung bei dem zur Evaluation verwendeten Primerpaar in akzeptablen Grenzen hielt, sollte hier kein grundsätzliches Problem liegen. Die Methode weist bei der Messung von RNA-Proben aus in-vitro transkribierten und aufgereinigten Standardverdünnungsstufen eine gute Leistungsfähigkeit auf. Es bleibt allerdings zu bedenken, dass die Messung eines Templates von extrahierter Gesamt-RNA aus Patientenurin womöglich mehr Fehlhybridisierungen der Primer zulässt und so zu falschen Ergebnissen führt. Es wurde daher versucht, durch eine exonübergreifende Positionierung der Primer möglichst spezifische Produkte zu amplifizieren, die auch mittels Schmelzkurvenanalyse und in vielen Fällen auch durch Agarosegelelektrophorese klar identifiziert werden konnten. Als ergänzenden Schritt könnte man eine Sequenzierung von nicht-spezifischen Produkten anstreben, um einschätzen zu können, ob es zu einer Amplifikation von Splicevarianten gekommen ist.

Bei der PCR von Ziel-DNA, die sich in sehr geringer Menge in einer komplexen Mischung von Nukleinsäuren befindet, ist die PCR-Amplifikation erschwert und das Produkt wird mit geringerer Wahrscheinlichkeit das tatsächliche Vorkommen widerspiegeln. Karrer hat für dieses Phänomen den Begriff „Monte Carlo Effekt“ geprägt. Er beschreibt das Primer-Annealing als ein zufälliges Ereignis, welches umso eher eintritt, je mehr Ziel-DNA das Template enthält (Karrer et al., 1995, Bustin et al., 2004 und 2005). Möglicherweise fielen einige der Proben mit niedrigem CD103-mRNA-Gehalt dem Monte Carlo Effekt zum Opfer, was einen Teil der falsch negativen Ergebnisse erklären könnte.

### **5.3 Messergebnisse und Evaluation der „one-step“ RT-PCR am LightCycler**

Bei einzelnen Patienten des Kollektivs war eine Erhöhung der CD103-mRNA-Konzentration bei bestätigter Abstossungsreaktion nachweisbar, jedoch lagen histologisch bei den CD103-positiven Fällen heterogene histologische Befunde vor. Die höchsten CD103-mRNA-Konzentrationen im Gesamtkollektiv wurden gemessen

- bei mehreren Patienten mit chronischen Glomerulopathien,
- bei einer vaskulären Abstossung mit begleitendem interstitiellen Infiltrat sowie mit vorliegender Arteriosklerose (Banff Kat. 4 IIa und 6),
- bei einer Patientin mit akutem Nierenversagen (Banff Kat. 6 – Akutes Nierenversagen).

Durch ein Überwiegen negativer Proben (87%) war eine quantitative Auswertung massiv erschwert.

### **5.3.1 Entwicklung der CD103-mRNA-Konzentrationen im Verlauf von Abstossungsreaktionen bei einzelnen Patienten**

Bei den betrachteten Fällen ließen sich im Zeitverlauf nach Transplantation keine bestimmten Zeitpunkte oder Verlaufsmuster der CD103-mRNA-Anstiege im Urin identifizieren. In 2 Fällen konnten relativ früh vor einer bestätigten Abstossungsreaktion positive Konzentrationen der CD103-mRNA im Urin nachgewiesen werden. Im Fall einer steroidresistenten Abstossung schien ein alloreaktiver Prozess auf verschiedenen Niveaus „vor sich hin zu schwelen“. Es traten CD103-mRNA-Erhöhungen auf, allerdings war nicht erkennbar, ob eine neuer früher Schub einer akuten Abstossung oder ein chronischer Verlauf ursächlich war. Bei 2 Patienten fiel auf, dass es 4-8 Tage nach Beginn einer OKT3-Therapie zu einem Anstieg der CD103-mRNA Konzentration im Urin kam. Dazu bietet sich folgender Erklärungsansatz an: Die Hauptfunktion eines Integrins, dessen Ligand im Zielgewebe exprimiert wird, besteht darin, dass die T-Zelle mit Hilfe des Integrins an die Zielzelle bindet, um dort ihre Effektorfunktion auszuführen. Ein Nachweis der enthaltenen mRNA im Urin ist zu diesem Zeitpunkt noch nicht möglich. Erst, wenn sich die Zelle wieder ablöst oder die infiltrierenden T-Zellen im Überschuss vorhanden sind, wird ein Nachweis denkbar. Auf diese Weise kann es nach der Gabe von Lymphozyten-Antikörpern zu einem positiven Nachweis von CD103-mRNA im Urin kommen. Als mögliche Gründe für ein Auftreten von CD103+T-Zellen im Urin sind anzunehmen:

- a) akute heftige Abstossungsreaktion mit Überschuss von CD8+CD103+ infiltrierenden T-Zellen, die nicht alle intraepithelial gebunden werden können,
- b) abklingende Abstossungsreaktion mit einem Wiederablösen der intraepithelialen T-Zellen nach Ausführung der Effektorfunktion,
- c) Folge von Antikörper-Therapie bei akuter Abstossung: Schubweise Elimination und Freisetzung von intraepithelialen CD103+T-Zellen,
- d) Freisetzung von CD4+CD103+ oder CD8+CD103+T-Zellen mit regulatorischer Funktion.

Die bisher veröffentlichten Studien zu Zeitpunkten einer CD103-Expression auf T-Zellen im Rahmen von Transplantatabstossungen sind uneinheitlich. Kilshaw et al. postulierten 2002, dass

CD103 bei einem kleinem Anteil früh infiltrierender CD8+T-Zellen exprimiert werde. Er schreibt dem Integrin am ehesten eine „Pfadfinderfunktion“ zu, wohingegen er im Laufe einer floriden akuten Abstossung keine signifikante CD103+ T-Zellpopulation nachweisen konnte. In der Arbeit von Wang et al., 2004, konnte gezeigt werden, dass es innerhalb von mehreren Wochen nach Transplantation zu einer kontinuierlichen Akkumulation von CD103+T-Zellen im Transplantat kommt. Schliesslich schlugen Robertson et al. 2003 CD103 als einen Marker für chronische Verläufe vor. Sie konnten zuvor eine Persistenz von proliferierenden CD103+T-Zellen in Geweben nachweisen, die akute Abstossungsepisoden durchlaufen hatten. Ein weiterer Mechanismus, der zu einem späten Auftreten von CD103 führen könnte, liegt in der immunsuppressiven Medikation begründet. Erhält der Patient Cyclosporin A, kann es über einen Anstieg von TGF- $\beta$  zu einer verstärkten Expression von CD103 kommen (Mohamed et al., 2000; Yuan et al., 2005). Andererseits erhielt die Mehrzahl der hier untersuchten Patienten eine Basis-Immunsuppression mit Cyclosporin A, sodass ein Bias im Sinne eines generell vermehrten CD103 Nachweises unwahrscheinlich ist, da 87% der Proben CD103 negativ waren..

Die Identifikation spezifischer Zeitpunkte eines CD103-mRNA-Anstiegs im Urin ist aus mehreren Gründen schwierig. Zum einen ist das Integrin wahrscheinlich an weiteren immunologischen Prozessen beteiligt und unterliegt zahlreichen Regulationsmechanismen durch lokale Zytokine und Chemokine. Zum anderen kann der zur Validierung der Methode herangezogene histopathologische Befund immer nur ein "Schlaglicht" auf den Zustand der Transplantatniere während eines fixen Momentes innerhalb eines länger andauernden komplexen immunologischen Prozesses werfen. Es erscheint daher schwer kalkulierbar, zu welchem Zeitpunkt welche Bedingungen während einer Abstossungsreaktion die Transkription und Expression von CD103 induzieren und schliesslich dazu führen, dass sich schubweise CD103+-T-Zellen aus den Epithelverbänden lösen und so einen Nachweis ihrer mRNA im Urin zulassen.

Grundsätzlich besteht die Stärke quantitativer RT-PCR-Methoden darin, dass man Informationen zu einem sehr frühen Zeitpunkt innerhalb der immunologischen Kaskaden abgreifen kann. Messenger-RNA ist das erste nachweisbare Produkt nach entsprechender Aktivierung und Induktion der Zelle. Das Transkript liegt bereits vor, wenn die Zelle noch gar kein Genprodukt synthetisiert hat und phänotypisch und funktionell unverändert ist. Die Messung von mRNA in Zellen des Urins findet jedoch in einer eher späten Phase im Ablauf des immunologischen

Prozesses statt. Da mRNA einem physiologischen Abbau unterworfen ist, muss man erwägen, ob RT-PCR-Messungen an Zellen des Urins möglicherweise in vielen Fällen „ins Leere greifen“. Die massgeblichen Studien zur Untersuchung von Expression und Funktion von CD103 im Rahmen von Abstossungsprozessen erfolgten mit Hilfe immunhistochemischer Analysen von Gewebeproben oder mit FACS-Analysen von stimulierten Zellkulturen. Diese Methoden basieren auf der Detektion der Genprodukte – also von Proteinen. Allgemein kann man feststellen, dass Proteine eine längere mittlere Halbwertszeit haben als ihre zugehörige mRNA. Bei mRNA geht man von einer Halbwertszeit aus, die im Bereich von Stunden liegt (Meyer et al., 2004), Proteine können mehrere Tage überdauern. So ist denkbar, dass einerseits immunhistochemisch CD103+T-Zellen an Gewebeschnitten nachweisbar sind, die Konzentration der ursprünglich erzeugten mRNA aber bereits wieder unter die Nachweisgrenze abgefallen sein kann. Konkrete Daten über die Halbwertszeit von CD103-mRNA liegen derzeit noch nicht vor.

Quantitative RT-PCR-Methoden sind besonders effektiv, wenn die Transkriptionsrate des betrachteten Gens gut mit dem Ausmass der Genexpression korreliert. In diversen Studien wird aktuell der Fokus auf die Regulation der mRNA-Stabilität verlagert. Man nimmt an, dass hochkomplexe Regulationsmechanismen mRNA entweder stabilisieren oder dem Abbau zuführen können (Cheadle et al., 2005). Folglich bestimmt nicht allein die absolute Menge, sondern vor allem auch die Stabilität der mRNA das Ausmass der Genexpression. Wenn wenige stabile Transkripte zur gleichen Genexpression führen können wie eine hohe Rate von synthetisierten und wieder abgebauten, dann mindert sich damit die Aussagekraft von absoluten mRNA-Konzentrationen.

### **5.3.2 Die CD103-mRNA-Konzentration als Abstossungsmarker**

Die Konzentration der CD103-mRNA im Urin zeigt **nicht** zuverlässig histologisch gesicherte Abstossungsreaktionen von Transplantatnieren an. Während Ding et al., 2003 bei seiner semiquantitativen Messung eine Sensitivität von 59% und eine Spezifität von 75% nachwies, lag die Sensitivität in dieser Arbeit nur bei max. 20%. Nach einer Studie von Robertson et al., 2003, wäre auch bei den chronischen Transplantatnephropathien mit einer höheren Rate an CD103-positiven Proben zu rechnen gewesen. Robertson beschreibt die Persistenz von CD103+CD8+T-Zellen in Nierentransplantaten nach dem Abklingen akuter Abstossungsreaktionen. Eine u.a. von

IL-15 erzeugte antiapoptotische Mikroumgebung führt ihrer Meinung nach zum Überdauern des inflammatorischen Infiltrats, was zum Teil mit einer stabilen Transplantatfunktion einhergehen kann. Im Gegensatz dazu konnte in dieser Arbeit eine regelmässige Erhöhung der CD103-mRNA im Urin nicht nachgewiesen werden. Unter den beschriebenen Bedingungen ist jedoch eine intermittierende Freisetzung von CD103<sup>+</sup>T-Zellen durchaus denkbar und könnte einen Grund für mögliche falsch positive Ergebnisse darstellen. Eine weitere Ursache für falsch negative Ergebnisse in der chronischen Gruppe liegt möglicherweise in der Natur des zwar kontinuierlich destruierenden, aber wenig fulminanten Prozesses begründet. Bei einer allmählichen Infiltration des Tubulusepithels mit T-Effektorzellen ist die Wahrscheinlichkeit gegeben, dass die T-Zellen ihre Liganden finden, intraepithelial zurückgehalten werden und ihre Funktionen ausführen. Dabei entsteht nicht unbedingt ein massiver Überschuss von Zellen, die dann in den Urin freigesetzt und nachweisbar werden.

Ein weiterer Erklärungsansatz für die zahlreichen falsch negativen Ergebnissen besteht darin, dass der Urin möglicherweise keinen kontinuierlich repräsentativen Spiegel der intraepithelialen Zell-Anteile darstellt. Wie bereits beschrieben, besteht die Hauptfunktion des Integrins CD103 in der Bindung von E-Cadherin, das von epithelialen Zellverbänden exprimiert wird. Nach der Bindung von Ligand und Rezeptor kommt es zu kostimulatorischen Signalen, die eine Lyse der allogenen Zellverbände begünstigen. Zu einem Zeitpunkt, an dem bereits ein Abstossungsprozess im Gange ist, muss noch nicht zwangsläufig CD103-mRNA im Urin nachweisbar sein. Entscheidend scheint der Zeitpunkt einer Freisetzung von CD103<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>T-Zellen aus dem epithelialen Zellverband zu sein. Die entsprechenden Zellen gelangen dann in die harnableitenden Wege und die enthaltene RNA wird über die beschriebenen Verfahren im Urin messbar. Desweiteren ist zu bedenken, dass das Integrin CD103 bei diversen immunologischen Prozessen beteiligt ist. Neben den bisher erwähnten Funktionen des Integrins bei akuten und chronischen Abstossungen (Banff 97 Kat. 4+5) gibt es auch Ansätze, die einen Zusammenhang von CD103-positiven RT-PCR-Ergebnissen mit histologischen Befunden der Banff 97 Kat. 6 (z.B. Cyclosporin-Toxizität) möglich erscheinen lassen. Mehrere Studien konnten aufzeigen, dass die langfristige Cyclosporin-Gabe zu einer erhöhten TGF- $\beta$ -Konzentration in Transplantaten führt (Mohamed et al., 2000; Yuan et al, 2005). TGF- $\beta$  wiederum ist gut charakterisiert als ein Zytokin, das eine CD103-Expression auf CD8<sup>+</sup>T-Zellen induziert. Die Beteiligung von CD103<sup>+</sup>T-Zellen

an verschiedenen immunologischen Prozessen reduziert die Indikatorfunktion des Integrins für einen bestimmten Teilprozess im Rahmen der Abstoßung.

### **5.3.3 Übergreifende Aspekte zur Evaluation der „one-step“ RT-PCR am LightCycler**

Die höchsten im Gesamtkollektiv gemessenen CD103-mRNA-Konzentrationen waren bei Patienten mit chronischen Glomerulopathien zu verzeichnen. Es liegt die Vermutung nahe, dass auch eine rein mechanische Schädigung des glomerulären Filterapparats zu einem positiven CD103-mRNA-Messergebnis führen kann. Da von 2-6 % der PBMC konstitutiv CD103 exprimiert wird, könnte die entsprechende mRNA im Rahmen einer Leukozyturie im Urin messbar werden. Dagegen spricht allerdings folgende Beobachtung: Zum Zeitpunkt der RNA-Extraktion wurde bei jedem Patienten ein Urinsediment erhoben und für jede Probe notiert, ob sich nach der Zentrifugation ein Zellpellet am Boden des Uringefässes gebildet hatte (Daten nicht angeführt). Dabei wurde kein spezieller Zusammenhang zwischen dem Vorhandensein eines Zellpellets nach Zentrifugation und einer CD103-Positivität gefunden. Die Rate von konstitutiv exprimiertem CD103 scheint nicht auszureichen, um bei einer Leukozyturie zu positiven Messergebnissen bei der RT-PCR zu führen. Dazu ist offensichtlich eine vorangehende allospezifische Aktivierung erforderlich.

Die Expression von CD103 wird von zahlreichen Faktoren beeinflusst, unter anderem von der lokalen TGF- $\beta$ -Konzentration. Veränderungen der jeweils anderen Einflussfaktoren führen zu Variationen der CD103-mRNA-Konzentration. Mehrere Autoren konnten bestätigen, dass TGF- $\beta$  eine verstärkte Expression von CD103 auf CD8+ T-Zellen zur Folge hat (Hadley et al. 1999; Robinson et al., 2001; Robertson et al., 2003; Wang et al., 2004). Daraus entwickelt sich die Hypothese, dass allospezifische CD8+T-Zellen, die das Transplantat infiltrieren, erst nach dem Durchtritt durch die tubuläre Basalmembran unter lokalem TGF- $\beta$ -Einfluss CD103 exprimieren. Die Funktionen des Zytokins TGF- $\beta$  sind vielseitig und teilweise widersprüchlich. TGF- $\beta$  fördert eine Fibrosierung in Geweben mit chronischen Entzündungsprozessen, hemmt die Proliferation von T-Zellen, kann die Bildung von regulatorischen T-Zellen induzieren und die T-Zell-Effektorfunktionen hemmen (Gorelik et al., 2002). Daher könnte TGF- $\beta$  zur Entstehung chronischer Transplantatnephropathien und einem langfristigen Transplantatverlust beitragen.

Robertson et al. stellten im Jahr 2002 fest, dass IL-15 und TGF- $\beta$  zu einer massiv erhöhten Expression von CD103 auf CD8+T-Zellen führt, gleichzeitig aber die Bildung von Perforin und Granzyme hemmt. Perforin und Granzyme sind als wirkungsvolle Effektormechanismen zytotoxischer T-Zellen unentbehrlich. Eine signifikant erhöhte Perforin-mRNA-Konzentration im Urin bei Vorliegen von Abstossungsreaktionen konnte mit eigenen, nicht veröffentlichten Daten bestätigt werden (siehe auch Li et al., 2001).

Einerseits wird damit klar, dass CD103 wichtige Teilschritte bei einer Abstossung epithelialer Organe übernimmt. Andererseits wird die CD103-Expression von TGF- $\beta$  hochreguliert, einem Zytokin, dem eher proliferationshemmende und antiinflammatorische Funktionen zugeschrieben werden. Es liegt damit die Vermutung nahe, dass CD103 neben den bekannten abstossungsfördernden auch immunmodulatorische Funktionen ausüben kann.

Das Integrin CD103 wurde in einem Mausmodell als spezifischer Marker für eine hochpotente Subpopulation von CD4+CD25+ regulatorischen T-Zellen identifiziert (Lehmann et al., 2002). Somit ist denkbar, dass ein Anteil der im Urin messbaren CD103-Transkripte von regulatorischen T-Zellen stammt (Ding et al., 2003). Wang et al., 2004 und Hadley, 2004 betonen allerdings, dass beim Menschen eine CD103-Expression bisher fast ausschliesslich auf CD8+T-Zellen beobachtet werden konnte. Erste Ausnahme bildet eine Studie von Shao et al. aus dem Jahr 2005, die belegt, dass bei schwangeren Frauen der Trophoblast die Aktivierung eines Klonns von CD8+CD103+ regulatorischen T-Zellen bewirkt. Möglicherweise tragen diese Zellen dazu bei, dass gegenüber dem Feten, der aus immunologischer Sicht einem „semi-allogenen Transplantat“ ähnelt, Toleranz induziert wird. Uss et al. konnten ein Jahr später an einem Zellkulturmodell zeigen, dass eine Population von CD103+CD8+T-Zellen nach alloantigener Stimulation in vitro nur geringe zytotoxische Kapazität aufwies und ausserdem die weitere T-Zell-Proliferation hemmt (Uss et al., 2006). Die Bedeutung von regulatorischen T-Zellen und ihre Rolle bei einer Induktion von Toleranz gegenüber Transplantaten ist derzeit Gegenstand lebhafter Forschung. Es bleibt abzuwarten, ob für CD103 weitere immunmodulatorische Beiträge bei Transplantatabstossungen aufgeklärt werden können.

Um Einsichten zu gewinnen, bei welchen weiteren, nicht abstossungsspezifischen Prozessen CD103 mögliche Beiträge liefert, bietet sich die Messung eines Kollektivs nichttransplantierter Patienten mit verschiedenen nephrologischen Diagnosen an (IgA-Nephritis, Minimal Change



GN, Lupus-Nephritis, virale Infekte). Wegen der vermuteten immunregulatorischen Funktionen von CD103 sollte aber auch eine Auswertung der langfristigen Verläufe und des Transplantatüberlebens bei den Patienten mit histologisch bestätigten Abstossungen erfolgen. So könnten sich Anhaltspunkte ergeben, ob eine CD103-Positivität Hinweise auf die langfristige Prognose des Nierentransplantats geben kann.

## 5.4 Zusammenfassung

Bei unklarer Genese einer Funktionseinschränkung von Nierentransplantaten wird in der Regel eine Biopsie durchgeführt, die bis heute als diagnostischer Goldstandard gilt. Um die mit einer Biopsie verbundenen Risiken zu vermeiden, wird nach neuen, nicht-invasiven Verfahren gesucht, mit denen ein Abstoßungsprozess sicher identifiziert und von anderen Ursachen abgegrenzt werden kann. Dem T-Zell-Integrin CD103 wurde in Studien der vergangenen Jahre eine wichtige Rolle bei der Abstoßung von Transplantaten zugeschrieben, insbesondere bei Organen, die epitheliale Gewebsanteile aufweisen. Ding et al. konnten 2003 mit Hilfe einer semiquantitativen RT-PCR zeigen, dass die CD103-mRNA-Konzentration im Urin bei akuten Abstoßungen ansteigt und ein brauchbarer Marker für die Diagnostik sein könnte. In der vorliegenden Arbeit wurde eine quantitative "one-step" RT-PCR am LightCycler etabliert, mit der die absolute CD103-mRNA-Konzentration im Urin gemessen wird. Die Methode wurde auf 229 Urinproben von 90 nierentransplantierten Patienten angewandt, die Zeichen eines Transplantatversagens aufwiesen und bei denen eine Nierenbiopsie durchgeführt wurde. Anschließend erfolgte eine Evaluation der RT-PCR anhand der histopathologischen Befunde.

Die neu etablierte Methode erwies sich als technisch geeignet, CD103-mRNA-Konzentrationen im Urin zu messen. Die Nachweisgrenze lag bei 13 Molekülen, was einer Konzentration von  $10^{-9}$  ng/ $\mu$ l entspricht. Es zeigte sich jedoch, dass die Höhe der CD103-mRNA-Konzentration im Urin Abstoßungsprozesse nicht zuverlässig diagnostizieren kann. Im Verlauf von Abstoßungsreaktionen bei einzelnen Transplantierten lässt sich kein definierter Zeitpunkt eines CD103-Anstiegs identifizieren. Ursächlich scheint zu sein, dass der Urin nicht kontinuierlich und repräsentativ die Zellanteile eines Tubulusinfiltrats widerspiegelt. Außerdem unterliegt CD103 zahlreichen Regulationsmechanismen und trägt selbst zu diversen immunregulatorischen oder toleranzinduzierenden Prozessen bei. Darüber hinaus sind die komplexen Funktionen von CD103 in der Transplantationsimmunologie nicht restlos verstanden und bedürfen weiterer Aufklärung. In einem nächsten Schritt könnte dazu der Fragestellung nachgegangen werden, ob sich die CD103-positiven und -negativen Abstoßungen hinsichtlich ihres Verlaufs und des langfristigen Transplantatüberlebens unterscheiden.

## 6. Literaturverzeichnis

1. Agace WW, Higgins JMH, Sadasivan B, Brenner MB, Parker CM. T-lymphocyte-epithelial-cell interactions: integrin  $\alpha E(CD103)\beta 7$ , LEEP-CAM and chemokines. *Curr Opin Cell Biol* 2000; 12: 563-568.
2. Amara FM, Junaid A, Clough RR, Liang B. TGF- $\beta 1$  regulation of Alzheimer amyloid precursor protein mRNA expression in a normal human astrocyte cell line: mRNA stabilization. *Molecul Brain Res* 1999; 71: 42-49.
3. Banz A, Peixoto A, Pontoux C, Cordier C, Rocha B, Papiernik M. A unique subpopulation of Cd4+ regulatory T cells controls wasting disease, IL-10 secretion and T cell homeostasis. *Eur J Immunol* 2003; 33: 2419-2428.
4. Barry M, Bleackley RC. Cytotoxic T Lymphocytes: all roads lead to death. *Nature Reviews Immunology* 2002; 2: 401-409.
5. Baumgart M, Wit C, Hüge W, Müller B. Increase in the expression of alpha E beta 7, characteristic of intestinal intraepithelial lymphocytes, on cells in the lung epithelium of patients with interstitial lung diseases and in synovial fluid of patients with rheumatic diseases. *Immunobiology* 1996; 196: 415-424.
6. Begue B, Sarnacki S, le Deist F, Buc H, Gagnon J, Meo T, Cerf-Bensussan N. HML-1, a novel integrin made of the beta7 chain and of a distinctive alpha-chain exerts an accessory function in the activation of human IEL via the CD3-TCR pathway. *Adv Exp Med Biol* 1995; 371A: 67-75.
7. Bustin SA. Absolute quantification of mRNA using real-time reverse transcription polymerase chain reaction assays. *Journal of Molecular Endocrinology*; 2000; 25: 169-193.
8. Bustin SA, Nolan T. Pitfalls of quantitative real-time reverse-transcription polymerase chain reaction. *J Biomol Tech* 2004; 15: 155-166.
9. Bustin SA, Benes V, Nolan T, Pfaffl MW. Quantitative real-time RT-PCR – a perspective. *J Mol Endocrinol* 2005; 34: 597-601.
10. Cecka JM. The UNOS renal transplant registry. In: Cecka JM, Terasaki PI, ed. *Clinical Transplants 2000*. UCLA Tissue Typing Laboratories, Los Angeles: 2001; 1-18.
11. Cepek KL, Parker CM, Madara JL, Brenner MB. Integrin alpha E beta 7 mediates adhesion of T lymphocytes to epithelial cells. *J Immunol* 1993; 150: 3459-3470.

12. Cepek KL, Shaw SK, Parker CM, Russel GJ, Morrow JS, Rimm DL, Brenner MB. Adhesion between epithelial cells and T lymphocytes mediated by E-cadherin and the alpha E beta 7 integrin. *Nature* 1994; 372: 190-193.
13. Cerf-Bensussan N, Jarry A, Brousse N, Lisowska-Grospierre B, Guy-Grand D, Griscelli C. A monoclonal antibody (HML-1) defining a novel membrane molecule present on human intestinal lymphocytes. *Eur J Immunol* 1987; 17: 1279-1285.
14. Cheadle C, Fan J, Cho-Chung YS, Werner T, Ray J, Do L, Gorospe M, Becker KG. Stability regulation of mRNA and the control of gene expression. *Ann N Y Acad Sci* 2005; 1058: 196-204.
15. Chen WJ, Jin W, Hardegen N, Lei KJ, Li L, Marinos N, McGrady G, Wahl SM. Conversion of peripheral CD4+CD25- naive T cells to CD4+CD25+ regulatory T cells by TGF- $\beta$  induction of Transcription factor Foxp3. *J Exp Med* 2003; 198: 1875-1886.
16. Cresswell J, Robertson H, Neal DE, Griffiths TRL, Kirby JA. Distribution of the alpha(E)beta(7) phenotype and E-cadherin in normal human urothelium and bladder carcinomas. *Clinic Exp Immunol* 2001; 126: 397-402.
17. Darnell JE, Kerr IM, Stark GR. JAK-STAT pathways and transcriptional activation in response to IFNs and other extracellular signaling proteins. *Science* 1994; 264: 1415-1421.
18. Denton MD, Reul RM, Dharnidharka VR, Fang JC, Ganz P, Briscoe DM. Central Role for CD40/CD40 ligand (CD154) interactions in transplant rejection. *Pediatr Transplant* 1998; 2: 6-15.
19. Desvaux D, Schwarzingler M, Pastural M, Baron C, Abtahi M, Berrehar F, Lim A, Lang P, le Gouvello S. Molecular diagnosis of renal-allograft rejection: correlation with histopathologic evaluation and antirejection-therapy resistance. *Transplantation* 2004; 78: 647-653.
20. Ding R, Li B, Muthukumar T, Dadhania D, Medeiros M, Hartono C, Serur D, Seshan SV, Sharma V, Kapur S, Suthanthiran M. CD103-Levels in urinary cells predict acute rejection of renal allografts. *Transplantation* 2003; 75: 1307-1312.
21. El-Sawy T, Fahmy NM, Fairchild RL. Chemokines: directing leukocyte infiltration into allografts. *Curr Opin Immunol* 2002; 14: 562-568.
22. Ericsson A, Arya A, Agace W. CCL25 enhances CD103-mediated lymphocyte adhesion to E-cadherin. *Ann N Y Acad Sci* 2004; 1029: 334-336.

23. Erle DJ, Brown T, Christian D, Aris R. Lung epithelial lining fluid T cell subsets defined by distinct patterns of beta-7 and beta-1 integrin expression. *Am J Respir Cell Molec Biol* 1994; 10: 237-244.
24. Feng Y, Wang D, Yuan R, Parker CM, Farber DL, Hadley GA. CD103 expression is required for destruction of pancreatic islets allografts by CD8+ Cells. *J Exp Med* 2002; 196: 877-886.
25. Fujihara T, Fujita H, Saito K, Tsuzaka K, Abe T, Takeuchi T. Preferential localisation of CD8+ alpha E beta 7 positive T cells around acinar epithelial cells with apoptosis in patients with Sjogren's syndrome. *J Immunol* 1999; 163: 2226-2235.
26. Gerritsen ME, Soriano R, Yang S, Zlot C, Ingle G, Toy K, Williams PM. A molecular fingerprint of endothelial differentiation into tube-like structures generated by Affimetrix oligonucleotide arrays. *Microcirculation* 2003; 10: 63-81.
27. Gilks WR, Bradley BA, Gore SM, Klouda PT. Substantial benefit of tissue matching in renal transplantation. *Transplantation* 1987; 43: 669-674.
28. Goodman GR, Bethel KJ, Saven A. Hairy Cell Leukemia: an update. *Curr Opin Hematol* 2003; 10: 258-266.
29. Gorelik L, Flavell RA. Transforming growth factor- $\beta$  in T cell biology. *Nat Rev* 2002; 2: 46-53.
30. Hadley GA, Bartlett ST, Via CS, Rostapshova EA, Moainie S. The epithelial cell specific integrin, CD103 (alpha E integrin) defines a novel subset of alloreactive CD8+CTL. *J Immunol* 1997; 159: 3748-3756.
31. Hadley GA, Rostapshova EA, Gomolka DM, Taylor BM, Bartlett ST, Drachenberg CI, Weir MR. Regulation of the epithelial cell-specific integrin, CD103, by human CD8+ cytolytic T lymphocytes. *Transplantation* 1999; 67: 1418-1425.
32. Hadley GA, Charandee C, Weir MR, Wang D, Bartlett ST, Drachenberg CB. CD103+ CTL accumulate within the graft epithelium during clinical renal allograft rejection. *Transplantation* 2001; 72: 1548-1555.
33. Hadley GA. Role of integrin CD103 in promoting destruction of renal allografts by CD8+ T Cells. *American Journal of Transplantation* 2004; 4: 1026-1032.
34. Hargrove JL, Schmidt FH. The role of mRNA and protein stability in gene expression. *FASEB* 1989; 3: 2360-2370.

35. Hariharan S, Johnson CP, Bresnahan BA et al. Improved graft survival after renal transplantation in the United States, 1988 to 1996. *N Engl J Med* 2000; 342: 605-612.
36. Higgins JMG, Mandelbrot A, Shaw SK, Russell J, Murphy YT, Chen YT, Neslson WJ, Parker CM, Brenner MB. Direct and regulated interaction of integrin  $\alpha E\beta 7$  with E-Cadherin. *J Cell Biol* 1998; 140: 197.
37. Higgins JMG, Cernadas M, Tan K, Irie A, Wang JH, Takada Y, Brenner MB. The role of the alpha and beta chains in ligand recognition by beta 7 integrins. *J Biol Chem* 2000; 275, 33: 25652-25664.
38. Janssen EM, Lemmens EE, Wolfe T, Christen U, Von Herrath MG, Schoenberger SP. CD4+ T cells are required for secondary expansion and memory in CD8+ T lymphocytes. *Nature* 2003; 421: 852-856.
39. Jiang S, Herrera O, Lechler RI. New Spectrum of allorecognition pathways: implications for graft rejection and transplantation tolerance. *Curr Opin Immunol* 2004; 16: 550-557.
40. Karecla PI, Bowden SJ, Gree SJ, Kilshaw PJ. Recognition of E-cadherin on epithelial cells by the mucosal T cell integrin alpha M290 beta 7 (alpha E beta 7). *Eur J Immunol* 1995; 25: 852-856.
41. Karrer EE, Lincoln JE, Hogenhout S, Bennett AB, Bostock RM, Martineau B, Lucas WJ, Gilchrist DG, Alexander D. *In situ* isolation from individual plant cells: creation of cell-specific cDNA libraries. *PNAS* 1995; 92: 3814-3818.
42. Keith DS, Demattos A, Golconda M, Prather J, Norman D. Effect of donor recipient age match on survival after first deceased donor renal transplantation. *J Am Soc Nephrol* 2004; 15: 1086-1091.
43. Kilshaw PJ, Murant SJ. A new surface antigen on intraepithelial lymphocytes in the intestine. *Eur J Immunol* 1990; 20: 2201-2207.
44. Kilshaw PJ, Murant SJ. Expression and regulation of beta 7 (beta P) integrins on mouse lymphocytes: relevance to the mucosal immune system. *Eur J Immunol* 1991; 21: 2591-2597.
45. Krieg PA, Melton DA. Functional messenger RNAs are produced by SP6 *in vitro* transcription of cloned cDNAs. *Nucleic Acids Res.* 1984; 12: 7057-7070.
46. Kutlesa S, Wessels J, Speiser A, Steiert I, Mueller C, Klein G. E-Cadherin mediated interactions of thymic epithelial cells with CD103+ thymocytes lead to enhanced thymocyte cell proliferation. *J Cell Sci* 2002; 115: 4505-4515.

47. Lefrancois L. Intraepithelial Lymphocytes of the intestinal mucosa: curiouser and curiouser. *Semin Immunol* 1991; 3: 99.
48. Lefrancois L, Parker CM, Olson S et al. The role of beta 7 integrins in CD8 T cell trafficking during an antiviral immune response. *J Exp Med* 1999; 189: 1631-1638.
49. Lehmann J, Huehn J, de la Rosa M, Maszyzna F, Kretschmer U, Krenn V, Brunner M, Scheffold A, Hamann A. Expression of the integrin  $\alpha E\beta 7$  identifies unique subsets of CD25+ as well as CD25- regulatory T cells. *Proc Natl Acad Sci* 2002; 99: 13031-13036.
50. Leteurtre E, Copin MC, Labalette M, Noel C, Roumilhac D, Pruvot FR, Lecomte-Houcke M, Gosselin B, Dessaint, JP. Negative immunohistochemical detection of CD103( $\alpha$ )E( $\beta$ )7 Integrin in the infiltrates of acute rejection in liver and kidney transplantation. *Transplantation* 2000; 70: 227-229.
51. Li B, Hartono C, Ruchuang D, Sharma V, Ramaswamy R, Qian B, Serur D, Mouradian J, Schwartz JE, Suthanthiran M. Noninvasive diagnosis of renal-allograft rejection by measurement of messenger RNA for perforin and granzyme b in urine. *N Engl J Med* 2001; 344: 947-954.
52. Li D, Roberts R. WD-repeat proteins: structure characteristics, biological function, and their involvement in human diseases. *Cell Mol Life Sci* 2001; 58: 2085-2097.
53. Lohmeyer J, Friedrich J, Grimminger F, Maus U, Tenter R, Morr H, Velcovsky HG, Seeger W, Rosseau S: Expression of mucosa-related integrin  $\alpha E\beta 7$  on alveolar T cells in interstitial lung diseases. *Clin Exp Immunol* 1999; 116: 340-346.
54. McHugh R, Witters MJ, Piccirillo CA, Young DA, Shevach EM, Collins M, Byrne MC. CD4+CD25+ Immunoregulatory T cells: Gene expression analysis reveals a functional role for the glucocorticoid-induced TNF-receptor. *Immunity* 2002; 16: 311-323.
55. Meier-Kriesche HU, Ojo AO, Hanson JA, Cibrik DM, Punch JD, Leichtman AB, Kaplan B. Increased impact of acute rejection on chronic allograft failure in recent era. *Transplantation* 2000; 70: 1098-1100.
56. Meier-Kriesche HU, Kaplan B. Waiting-time on dialysis as the strongest modifiable renal transplant outcomes: a paired donor kidney analysis. *Transplantation* 2002; 74: 1377-1381.
57. Meier-Kriesche HU, Schold JD, Srinivas TR, Kaplan B. Lack of improvement in renal allograft survival despite a marked decrease in acute rejection rates over the most recent era. *Am J Transpl* 2004; 4: 378-383.

58. Meyer S, Temme C, Wahle E. Messenger RNA turnover in eukaryotes: pathways and enzymes. *Crit Rev Biochem Mol Biol.* 2004; 39: 197-216.
59. Melton DA, Krieg PA, Rebagliati MR, Maniatis T, Zinn K, Green MR. Efficient in vitro synthesis of biologically active RNA and RNA hybridization probes from plasmids containing a bacteriophage SP6 promoter. *Nucleic Acids Res.* 1984; 12: 7035-7056.
60. Micklem KJ, Dong Y, Willis A, Pulford KA, Visser L, Durkop H, Poppema S, Stein H, Mason DY. HML-1-Antigen on mucosal associated T cells, activated cells and hairy leucemic cells is a new integrin containing  $\beta 7$  subunit. *Am J Pathol* 1991, 139: 1297-1301.
61. Mohamed MA, Robertson H, Booth TA, Balupuri S, Kirby JA, Talbot D. TGF-beta expression in renal transplant biopsies: a comparative study between cyclosporin-A and tacrolimus. *Transplantation* 2000; 69: 1002-1005.
62. Mullis KB, Faloona FA. Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction. *Methods Enzymol.* 1987; 155: 335-350.
63. Nagar B, Overduin M, Ikura M, Rini JM. Structural basis of calcium-induced E-Cadherin rigidification and dimerization. *Nature* 1996; 380: 360-364.
64. Oshitani N, Watanabe K, Maeda K, Fujiwara Y, Higuchi K, Matsumoto T, Arakawa T. Differential expression of homing receptor CD103 on lamina propria lymphocytes and association of CD103 with epithelial adhesion molecules in inflammatory bowel disease. *Int J Mol Med* 2003; 12: 715-719.
65. Pardoux C, Asselin-Paturel C, Chehimi J, Gay F, Mami-Chouaib F, Chouaib S. Functional interaction between TGF- $\beta$  and IL12 in human primary allogeneic cytotoxicity and proliferative response. *J Immunol* 1997; 158: 136-143.
66. Parker CM, Ceppek KL, Russel GJ, Shaw SK, Posnett DN, Schwarting R, Brenner MB. A family of beta 7 integrins on human mucosal lymphocytes. *Proc Natl Acad Sci USA* 1992; 89: 1924-1928.
67. Picker LJ, Terstappen LW, Rott LS, Streeter PR, Stein H, Butcher EC. Differential expression of homing-associated adhesion molecules by T cell subsets in man. *J Immunol* 1990; 145: 3247-3255.
68. Pribila JT, Quale AC, Mueller KL, Shimizu Y. Integrins and T cell-mediated immunity. *Ann Rev Immunol* 2004; 22: 157-180.
69. Quasi-Niere gGmbH Berlin, Jahresbericht 2004-2005.



70. Quinn E, Hawkins N, Yip YL, Suter C, Ward R. CD103+ intraepithelial lymphocytes – a unique population in microsatellite unstable sporadic colorectal cancer. *Eur J Cancer* 2003; 39: 469-475.
71. Racusen LC, Solez K, Colvin RB, Bonsib SM, Castro MC, Cavallo T, et al. The BANFF 97 working classification of renal allograft. *Kidney International* 1999; 55: 713-723.
72. Racusen LC, Colvin RB, Solez K, Mihatsch MJ, Halloran PF, Campbell PM, Cecka MJ, Cosyns JP, Demetris AJ, Fishbein MC, Fogo A, Furness P, Gibson IW, Glotz D, Havry P, Hunsickern L, Kashgarian M, Kerman R, Magil AJ, Montgomery R, Morozumi K, Nickleit V, Randhawa P, Regele H, Seron D, Seshan S, Sund S, Trpkov K. Antibody-mediated rejection criteria – an addition to the Banff 97 classification of renal allograft rejection. *Am J Transplant* 2003; 3: 708-714.
73. Ransohoff RM. Cellular responses to interferons and other cytokines: The JAK-STAT paradigm. *N Engl J Med* 1998; 338: 616-618.
74. Rappolee DA, Mark D, Banda MJ, Werb Z. Wound macrophages express TGF- $\alpha$  and other growth-factors in vivo: analysis by mRNA-phenotyping. *Science* 1988, 241: 708-712.
75. Ridge JP, Di Rosa F, Matzinger P. A conditioned dendritic cell can be a temporal bridge between a CD4+T-helper and a T-killer cell. *Nature* 1998; 393: 474-478.
76. Rietzler M, Bittner M, Kolanus W, Schuster A, Holzmann B. The human WD repeat protein WAIT-1 specifically interacts with the cytoplasmatic tails of  $\beta$ 7-integrins. *J Biol Chem* 1998; 273: 27459-27466.
77. Rihs S, Walker C, Virchow JC, Boer C, Kroegel C, Giri SN, Braun RK. Differential Expression of alpha E beta 7 integrins on bronchoalveolar lavage T lymphocyte subsets: regulation by alpha-4 beta 1-integrin crosslinking and TGF-beta. *Am J Respir Cell Mol Biol*; 1996, 15: 600-610.
78. Roberts IS, Reddy S, Russel C, Davies DR, Friend PJ, Handa AL, Morris PJ. Subclinical rejection and borderline changes in early protocol biopsy specimens after renal transplantation. *Transplantation* 2004; 77: 1194-1198.
79. Roberts K, Kilshaw PJ. The mucosal T cell integrin alpha M290 beta 7 recognizes a ligand on mucosal epithelial cell lines. *Eur J Immunol* 1993; 23: 1630-1635.
80. Robertson H, Wong WK, Talbot D, Burt AD, Kirby JA. Tubulitits after renal transplantation: demonstration of an association between CD103+ T cells, transforming growth factor beta1 expression and rejection grade. *Transplantation* 2001; 71: 306-313.

81. Robertson H, Kirby JA. Post-transplant renal tubulitis: The recruitment, differentiation and Persistence of intra-epithelial T cells. *Am J Transpl* 2003; 3: 3-10.
82. Robinson PW, Green SJ, Carter C, Coadwell J, Kilshaw PJ, Studies on transcriptional regulation of the mucosal T cell integrin alphaEbeta7 (CD103). *Immunology* 2001; 103: 146-154.
83. Rocha PN, Plumb TJ, Crowley SD, Coffman TM. Effector mechanisms in transplant rejection. *Immunological Reviews* 2003; 196: 51-64.
84. Rostapshove EA, Burn JM, Bartlett ST, Hadley GA. Integrin-mediated interactions influence the tissue specificity of CD8+ cytolytic T lymphocytes. *Eur J Immunol* 1998; 28: 3031-3039.
85. Russel GJ, Parker CM, Cepek KL, Mandelbrot DA, Sood A, Mizguchi E, Ebert EC, Brenner MB, Bhan AK. Distinct structural and functional epitopes of the alpha E beta 7 integrin. *Eur J Immunol* 1994; 24: 2832-2842.
86. Sarnacki S, Begue B, Buc H, Le Deist F, Cerf-Bensussan N. Enhancement of CD3-induced activation of human intestinal intraepithelial lymphocytes by stimulation of the beta 7-containing integrin defined by HML-1 monoclonal antibody. *Eur J Immunol* 1992; 22: 2887-2892.
87. Sayegh MH, Turka LA. The role of costimulatory activation in transplant rejection. *N Engl J Med* 1998; 338: 1813-1821.
88. Schieferdecker HL, Ullrich R, Weiss-Breckwoltd AN, Schwarting R, Stein H, Riecken EO, Zeitz M. The HML-1 antigen of intestinal lymphocytes is an activation antigen. *J Immunol* 1990; 144: 2541-2549.
89. Schoen MP, Arya A, Murphy EA, Adams CM, Strauch UG, Agace WW, Marsal J, Donohue, JP, Er H, Beier DR, Olson S, Lefrancois L, Brenner MB, Grusby MJ, Parker CM. Mucosal T-Lymphocyte numbers are selectively reduced in integrin alpha E (CD103) – deficient mice. *J Immunol* 1999; 162: 6641-6649.
90. Shao L, Jacobs AR, Johnson VV, Mayer L. Activation of CD8+ Regulatory T Cells by Human Placental Trophoblasts. *J Immunol* 2005, 174: 7539-7547.
91. Shaw SK, Cepek KL, Murphy EA, Russell GJ, Brenner MB, Parker CM. Molecular cloning of the human mucosal lymphocyte integrin alpha e subunit. *The Journal of Biological Chemistry* 1994, 269: 6016-6025.

92. Simonitsch I, Volc-Platzer B, Mosberger I, Radaszkiewicz T. Expression of monoclonal antibody HML-1-defined alpha E beta 7 integrin in cutaneous T cell lymphoma. *Am J Pathol* 1994; 145: 1148-1158.
93. Simpson E, Roopenian D. Minor histocompatibility antigens. *Curr Opin Immunol* 1997; 9: 655-661.
94. Smith TJ, Ducharme LA, Shaw SK, Parker CM, Brenner MB, Kilshaw PJ, Weis JH. Murine M290 integrin expression modulated by mast cell activation. *Immunity* 1994; 1: 393-403.
95. Smyth MJ, Strobl SL, Young HA, Ortaldo JR, Ochoa AC, Regulation of the lymphokine-activated killer activity and pore-forming protein gene expression in human peripheral blood CD8+ T lymphocytes. Inhibition by transforming growth factor beta. *J Immunol* 1991; 146: 3289-3297.
96. Solez K, Axelsen RA, Benediktsson H, Burdick JF, Cohen AH, Colvin RB, Croker BP, Droz D, Dunnill MS, Halloran PF, Havry P, Mennette JC, Keown PA, Maccussen N, Mihatsch MJ, Morozumi K, Myers BD, Nast CC, Olsen S, Racusen LC, Ramos EL, Rosen S, Sachs DH, Salomon DR, Sanfilippo F, Verani R, von Willebrand E, Yamaguchi Y. International standardization of criteria for the histologic diagnosis of renal allograft rejection: The Banff working classification of kidney transplant pathology. *Kidney Int* 1993; 44: 411-422.
97. Stahlberg A, Hakansson J, Xian X, Semb H, Kubista M. Properties of the Transcription Reaction in mRNA Quantification. *Clin Chem* 2004; 50: 509-515.
98. Strauch UG, Mueller RC, Li XY, Cernadas M, Higgins JMG, Binion DG, Parker CM. Integrin alphaE(CD103)β7 mediates adhesion to intestinal microvascular endothelial cell lines via an E-Cadherin-independent interaction. *J Immunol* 2001; 166: 3506-3514.
99. Strehlau J, Pavlakis M, Lipman M, Shapiro M, Vasconcellos L, Harr W, Strom TB. Quantitative detection of immune activation transcripts as a diagnostic tool in kidney transplantation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1997; 94: 695-700.
100. Su X, Zenios SA, Chakkera H, Milford EL, Chertow GM. Diminishing significance of HLA matching in kidney transplantation. *Am J Transpl* 2004; 4: 1501-1508.
101. Suthanthiran M. Clinical application of molecular biology: a study of allograft rejection with polymerase chain reaction. *Am J Med Sci* 1997; 313: 264-267.
102. Takemoto SK, Terasaki PI, Gjertson DW, Cecka JM. Twelve years' experience with national sharing of HLA-matched cadaveric kidneys for transplantation. *N Engl J Med* 2000; 343: 1078-1084.

103. Taraszka KS, Higgins JMG, Tan K, Mandelbrot DA, Wang JH, Brenner MG. Molecular basis of alphaEbeta7 recognition of E-Cadherin. *J Exp Med* 2000; 191: 1555-1567.
104. Tatapudi RR, Muthukumar T, Dadhania D, Ding R, Li B, Sharma VK, Lozada-Pastorio E, Seetharamu N, Hartono C, Serur D, Seshan SV, Kapur S, Hancock WW, Suthanthiran M. Noninvasive detection of renal allograft inflammation by measurements of mRNA for IP-10 and CXCR3 in urine. *Kidney Int.* 2004; 65: 2390-2397.
105. Teraki Y, Shiohara T. Preferential expression of  $\alpha\beta 7$  integrin (CD103) on CD8<sup>+</sup> T cells in the psoriatic epidermis: regulation by interleukins 4 and 12 and transforming growth factor- $\beta$ . *British J Dermatology* 2002; 146: 1365-2133.
106. Tlsty T. Cell-adhesion dependent influences on genomic instability and carcinogenesis. *Curr Opin Cell Biol* 1998; 10: 647-653.
107. Uss E, Rowshani AT, Hooibrink B, Lardy NM, van Lier RAW, ten Berge IJM. CD103 is a marker for alloantigen-induced regulatory CD8<sup>+</sup>T-Cells. *J Immunol* 2006; 177: 2775-2783.
108. Vaerman JL, Saussoy P, Ingargiola I. *J Biol Regul Homeost Agents* 2004; 18: 212-214.
109. Vasconcellos LM, Schachter AD, Zheng XX, Vasconcellos LH, Shapiro M, Harmon WE, Strom TB. Cytotoxic lymphocyte gene expression in peripheral blood lymphocytes correlates with rejection renal allografts. *Transplantation* 1998; 66: 562-566. [published erratum appears in *Transplantation* 1998 ; 66: 1264.]
110. Wang AM, Doyle MV, Mark DF. Quantitation of mRNA by the polymerase chain reaction [published erratum appears in *Proc Natl Acad Sci USA* 1990; 87: 2865]. *Proc Natl Acad Sci USA* 1989; 86: 9717-9721.
111. Wang D, Yuan R, Feng Y, El-Asady R, Farber DL, Gress RE, Lucas PJ, Hadley GA. Regulation of CD103 expression by CD8<sup>+</sup> T Cells responding to renal allografts. *J Immunol* 2004; 172: 214-221.
112. Werkmeister JR, Blomme EA, Weckmann MT, Grone A, McCauley LK, Wade AB, O'Rourke J, Capen CC, Rosol TJ. Effect of Transforming Growth Factor-beta1 on parathyroid hormone-related protein secretion and mRNA expression by normal human keratinocytes in vitro. *Endocrine* 1998; 3: 291-299.
113. Wesselborg S, Fruman DA, Sagoo JK, Bierer BE, Burakoff SJ. Identification of a physical interaction between calcineurin and nuclear factor of activated T cells (NFATp). *J Biol Chem* 1996; 271: 1274-1277.

114. Wittwer CT, Fillmore GC, Garling DJ. Minimizing the time required for DNA amplification by efficient heat transfer to small samples. *Anal Biochem* 1990; 186: 328-331.
115. Wittwer CT, Garling DJ. Rapid cycle DNA amplification: time and temperature optimization. *Biotechniques* 1990; 10: 76-83.
116. Wittwer CT, Herrmann MG, Moss AA, Rasmussen RP. Continuous fluorescence monitoring of rapid cycle DNA amplification. *Biotechniques* 1997; 22: 130-138.
117. Wong WK, Robertson H, Carroll HP, Ali S, Kirby JA. Tubulitis in renal allograft rejection: role of transforming growth factor beta and interleukin-15 in development and maintenance of CD103+ intraepithelial T Cells. *Transplantation* 2003; 75: 505-514.
118. Wood KJ, Sakaguchi S. Regulatory T cells in transplantation tolerance. *Nature Reviews* 2003; 3: 199-210.
119. Yuan R, El-Sady R, Liu K, Wang D, Drachenberg CB, Hadley GA. Critical role for CD103+CD8+ effectors in promoting tubular renal injury following allogeneic renal transplantation. *J Immunol* 2005; 175: 2868-2879.
120. Zelenika D, Adams E, Humm S, Graca L, Thompson S, Cobbold SP, Waldmann H. Regulatory T cells overexpress a subset of Th2 gene transcripts. *J Immunol* 2002; 168: 1069-1079.
121. Zuckermann SH, Evans GF, Guthrie L. Transcriptional and post-transcriptional mechanisms involved in the differential expression of LPS-induced IL-1 and TNF mRNA. *Immunology* 1991; 73: 460-465.