Aus dem Lehrstuhl für Herz-, Thorax- und herznahe Gefäßchirurgie
Direktor Professor Dr. med. Christof Schmid

DER MEDIZINISCHEN FAKULTÄT DER UNIVERSITÄT REGENSBURG

Anti-Endothelzell-Antikörper und Endothelzellaktivierung – Biomarker zur Vorhersage einer akuten Abstoßung nach Herztransplantation?

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades der Medizin

Dr. med.

der medizinischen Fakultät

der Universität Regensburg

vorgelegt von Johannes Karl Maria Kroher

geboren am 26.05.1985

in Regensburg

(2015)

Aus dem Lehrstuhl für Herz-, Thorax- und herznahe Gefäßchirurgie
Direktor Professor Dr. med. Christof Schmid

DER MEDIZINISCHEN FAKULTÄT DER UNIVERSITÄT REGENSBURG

Anti-Endothelzell-Antikörper und Endothelzellaktivierung – Biomarker zur Vorhersage einer akuten Abstoßung nach Herztransplantation?

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades der Medizin

Dr. med.

der medizinischen Fakultät

der Universität Regensburg

vorgelegt von Johannes Karl Maria Kroher

geboren am 26.05.1985

in Regensburg

(2015)

Dekan:	Professor Dr. Dr. Torsten Reichert
1. Berichterstatter:	Professor Dr. Karla Lehle
2. Berichterstatter:	PD Dr. Frank Haubner
Tag der mündlichen Prüfung:	01.12.2015

Meinen Eltern in Dankbarkeit für die lebenslange Unterstützung gewidmet.

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung ... 1

1.1 Pathomechanismen der Abstoßungsreaktion am Herzen ... 2

1.2 Bedeutung des vaskulären Endothels bei Abstoßungsreaktionen ... 3

1.2.1 Interaktionen zwischen Leukozyten und Endothelzellen im Rahmen der Entwicklung einer Transplantatabstoßung ... 4

1.2.2 E-Selektin ... 5

1.2.3 VCAM-1 ... 5

1.2.4 ICAM-1 ... 6

1.3 Bedeutung von Anti-Endothelzell-Antikörpern ... 6

2. Material und Methoden ... 8

2.1 Verwendete Geräte und Hilfsmittel ... 8

2.2 Verwendete Lösungen, Medien und Antikörper ... 8

2.3 Methoden ... 8

2.3.1 Studiendesign ... 8

2.3.2 Votum der Ethikkommission ... 10

2.3.3 Methoden zur Isolierung und Lagerung von humanen Endothelzellen ... 10

Isolierung humaner Endothelzellen aus Nabelschnüren ... 10

Kultivierung und Passagieren humaner Endothelzellen ... 11

Kryokonservierung und Lagerung der Endothelzellen ... 11

Auftauen und Anzüchten einer Endothelzellkultur ... 12

Mediumwechsel ... 12

Ablösen von Endothelzellen ... 12

Anlegen einer Zwischenkultur ... 13

Zellzahlbestimmung mittels CASY-Cellcounter ... 13

2.3.4 Nachweis von AECA im Serum ... 13

2.3.4 Aktivierung von Endothelzellen durch Serumbestandteile – Zell-ELISA ... 17

Bestimmung der optimalen Serumprobenkonzentration, des Messungszeitpunkts und der Schwellenwerte ... 19

2.4 Statistische Auswertung und graphische Darstellung ... 21

SigmaPlot® 11.0 ... 21

3. Ergebnisse ... 24

3.1 Nachweis von AECAs bei herztransplantierten Patienten ... 24

Patientenkollektiv 24
Nachweis von AECAs 25
Differenzierung der Patienten mittels AECA 25
3.2 Proinflammatorische Wirkung von Serum auf humane Endothelzellen 29
3.2.1. E-Selektin 29
3.2.2. VCAM-1 30
3.2.3. ICAM-1 34
3.3 Vergleich der Oberflächenmolekülexpressionen untereinander 43
3.4 Vergleich der Expression von Oberflächenmolekülen und Antiendothelzellantikörpern 43
4. Diskussion 44
4.1 Methodendiskussion 44
4.2 Nachweis von AECA im Patientenserum – Bedeutung für die Transplantation 45
4.3 Expression von Adhäsionsmoleküle (E-Selektin, ICAM-1, VCAM-1) durch Patientenserum – Bedeutung für die Transplantation 47
5. Zusammenfassung und Ausblick 51
5. Anhang 52
6. Tabellenverzeichnis 56
7. Abbildungsverzeichnis 57
8. Literaturverzeichnis 59
9. Danksagungen 65
10. Curriculum vitae ..... **Fehler! Textmarke nicht definiert.**
Persönliche Daten: ..... **Fehler! Textmarke nicht definiert.**
Ausbildung: ..... **Fehler! Textmarke nicht definiert.**
Berufstätigkeit: ..... **Fehler! Textmarke nicht definiert.**

1. Einleitung

Die Herztransplantation ist eine große Erfolgsgeschichte der modernen Medizin. Das erste menschliche Herz wurde am 3.12.1967 in Kapstadt transplantiert. Dieses Ereignis weckte großes Interesse an der Transplantation, welches aber durch große postoperative Schwierigkeiten, welche vor allem in Transplantatabstoßung und Infektionen bestanden, bald einer Ernüchterung folgte. Erst als das Immunsuppressivum Cyclosporin A (Colombo and Ammirati, 2011) entdeckt wurde, konnten vermehrt Erfolge erzielt werden. Bei einer Transplantation wurde es zum ersten Mal 1978 eingesetzt und die Herztransplantation konnte sich von vereinzelten Behandlungen mit experimentellem Charakter in das gängige klinische Spektrum einer herzchirurgischen Klinik erweitern. Dennoch ist die Herztransplantation auch heute noch ein schwerer und komplizierter Eingriff und es gibt viele mögliche Komplikationen. Eine der schwerwiegendsten und nach wie vor schwierig zu diagnostizierenden und behandelnden Komplikation ist die Transplantatabstoßung. Bei vielen Patienten entwickelt sich innerhalb weniger Jahre eine chronische Transplantatvaskulopathie (TVP). Sie gilt als Haupttodesursache nach HTX.

Die Früherkennung akuter Abstoßungsreaktionen ist entscheidend für den Erfolg der Herztransplantation und den Erhalt der Funktionsfähigkeit des Herzens. Die Diagnostik und Behandlung wird in den letzten Jahren zunehmend wichtiger in Hinblick auf rückläufige Spenderzahlen. So wurden nach vorläufigen Zahlen im Jahr 2014 in Deutschland 294 Herzen transplantiert, demgegenüber standen 573 Neuanmeldungen zur Transplantation (“Deutsche Stiftung Organtransplantation,” n.d.). Insgesamt standen Ende 2014 858 Patienten in Deutschland auf der Warteliste für ein neues Herz (“Eurotransplant 2015,” n.d.).

Diese Zahlen verdeutlichen die Bedeutung eines guten postoperativen Managements bei der Vorhersage und Bekämpfung der Abstoßungsreaktion. Bei der Detektion von Abstoßungsreaktionen dieser Transplantate und der dadurch ermöglichten, rechtzeitigen Bekämpfung spielt die Myokardbiopsie nach wie vor eine tragende Rolle (Thiene et al., 2013). Dieses invasive Verfahren (Klingel and Kandolf, 2004), stellt für den Patienten jedes Mal eine Herausforderung dar, ist mit Risiken verbunden (z. B. Blutungen, Infektion) und schränkt die Lebensqualität des betroffenen Patienten zusätzlich ein. Zusätzlich eignet sich eine Herzmuskelbiopsie nicht für das tägliche Monitoring einer Abstoßungsreaktion.

Gesucht wird eine nicht-invasive Methode, um die momentan obligate Myokardbiopsie irgendwann entbehrlich machen zu können. Das würde eine bessere Nachsorge für den Patienten bedeuten und sogleich seine postoperative Lebensqualität erhöhen. In der Forschung gibt es viele Ansätze, um Biomarker im Blut der Transplantierten aufzuspüren, die es erlauben würden, eine Abstoßungsreaktion rechtzeitig zu erkennen, ohne dabei den Patienten zu gefährden und die Abstoßung auch frühzeitig behandeln zu können (Cravedi and Heeger, 2012). Diese Diagnostik ist auch bei anderen Organen sinnvoll und wird teils bereits angewandt. So ist in einer Revision des Banff-Schemas die Antikörper-Serologie in der Diagnostik der Organabstoßung verankert worden (Haas, 2014). Im Bereich der Herztransplantation wird zwar viel in diesem Bereich geforscht, jedoch ist diese Diagnostik teils noch nicht im klinischen Alltag angekommen und es gibt noch keine klaren Aussagen von Seiten Klinikerverbänden, welche Rolle eine ebensolche Diagnose momentan einnimmt bzw. einnehmen sollte. Mittlerweile sind auf dem Markt schon Testkits erhältlich die

mittels Crossmatching von non-HLA-Antikörpern zwischen Spender und Empfänger ein erhöhtesTransplantationsrisiko detektieren sollen (Breimer et al., 2009). In Zukunft wird bei weniger verfügbaren Organen das Management eines transplantierten Patienten wichtiger und somit werden auch ähnliche Untersuchungen wie ein erweitertes Risikoscreening an Bedeutung gewinnen. Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich mit Methoden zur serologischen Früherkennung von Abstoßungsreaktionen, welche ein solches Management vereinfachen könnten.

1.1 Pathomechanismen der Abstoßungsreaktion am Herzen

Die genaue Pathogenese der Abstoßungsreaktion am Herzen ist noch nicht exakt geklärt. Es handelt sich um ein multifaktorielles Geschehen und beinhaltet nicht-immunologische und immunologische Faktoren, die auf das Transplantat einwirken können (Vassalli, 2013).

Bei den Abstoßungsreaktionen am Herzen unterscheidet man zwischen drei verschiedenen Zeitpunkten. Eine direkte Abstoßung des Transplantates durch thrombotischen Verschluss der Herzkranzgefäße direkt bei der Reperfusion des Organs während der Operation ist sehr selten. Später kommt es gegebenenfalls zur sogenannten akuten Abstoßung. Sie wird unterteilt in die akute vaskuläre Abstoßung und in die akute zelluläre Abstoßung. Die akute Form der Transplantatabstoßung kann man effektiv mit Immunsuppressiva behandeln. Erst ihre Entdeckung machte die Erfolgsgeschichte der Herztransplantation, auf die man heute zurückblicken kann, möglich. So gibt es mittlerweile eine Reihe an Medikamenten, die teilweise seit langen Jahren unverändert eingesetzt werden. Obwohl man direkt nach der Transplantation eine Induktionstherapie einleitet, um eine Abstoßung zu verhindern und direkt im Anschluss eine lebenslange Basistherapie folgen lässt, kann es zu akuten Abstoßungsperioden kommen. Die dritte Form ist die chronische Abstoßung, bei der das transplantierte Organ im Laufe der Zeit pathologischen Veränderungen unterliegt. Diese Veränderungen ähneln sehr stark einer Arteriosklerose, weshalb man auch von Transplantatvaskulopathie (TVP) spricht (Jansen et al., 2015). Für diese Form der Abstoßung gibt es leider keine kausale Therapie, da „ein Restitutio ad integrum“ durch die Umbauvorgänge nicht möglich ist (Schmid et al., n.d.).

Die histologische Klassifizierung von 1990 teilt die Abstoßungsreaktion in 5 histologische Stadien ein (Tabelle 1) (Billingham et al., 1990). Im klinischen Alltag brachte diese Einteilung verschiedene Schwierigkeiten und im praktischen Alltag irrelevante Subgruppen mit sich, sodass sie 2004 überarbeitet wurde. In der aktuellen Einteilung finden sich keine Subgruppen mehr und es gibt nur 4 verschiedene Gruppen der Abstoßungsreaktion (Tabelle 2) (Stewart et al., 2005).

Grade	Description
0	No evidence of acute cellular rejection
1A	Focal perivascular and/or interstitial infiltrate without myocyte damage
1B	Diffuse infiltrate without myocyte damage
2	One focus of infiltrate with associated myocytes damage
3A	Multifocal infiltrate with myocyte damage
3B	Diffuse infiltrate with myocyte damage
4	Diffuse, polymorphous infiltrate with extensive myocyte damage +/- edema, +/- hemorrhage, +/- vasculitis

Tabelle 1 Einteilung der zellulären Abstoßungsreaktion aus dem Jahre 1990.

ISHLT-2004 Acute Cellular Rejection Grading Scheme

Grade	Histopathologic findings
0R, none	None
1R, mild	Interstitial and/or perivascular infiltrate with up to 1 focus of myocyte damage
2R, moderate	Two or more foci of infiltrate with associated myocyte damage
3R, severe	Diffuse infiltrate with multifocal myocyte damage ± edema ± hemorrhage ± vasculitis

From Stewart et al JHLT, 2005

Tabelle 2 Überarbeitete Einteilung der zellulären Abstoßungsreaktion. Das R hinter der Gradeinteilung steht für „revised".

Bei der Entstehung einer akuten und möglicherweise auch einer chronischen Transplantatabstoßung wird die Bedeutung der Endothelzellaktivierung und Zytokinproduktion sowie die Induktion einer Endothelzellapoptose diskutiert (Holzknecht et al., 2002; Salom et al., 1998).

1.2 Bedeutung des vaskulären Endothels bei Abstoßungsreaktionen

Die vaskulären Endothelzellen, die die Gefäße des Transplantats auskleiden, stellen nicht nur die Grenzfläche zwischen Empfängerkreislauf und Spenderorgan dar (Weis et al., 2000)), sie sind auch das primäre Ziel für das Immunsystem des Empfängers während einer Abstoßungsreaktion (Glotz et al., 2006). Sie fungieren als Antigen präsentierende Zellen (Expression von polymorphen Transplantationsantigenen, z. B. Blutgruppenantigene des ABO-Systems, MHC-I und II-Moleküle), als Ziel der allogenen Lymphozytenreaktion (Pober, 1999) und sie spielen eine zentrale Rolle bei der

Rekrutierung der Extravasation von Immunzellen unterschiedlicher Art (Vestweber, 2007). Die Aktivierung des Endothels bedingt die Entwicklung einer Transplantatvaskulopathie und vermittelt ein erhöhtes Risiko für Transplantatverlust (Labarrere et al., 1997). Wichtige Induktoren einer Endothelzell-Aktivierung sind der Hirntod des Spenders, Ischämie-Reperfusions-Schäden, Virusinfektionen (wie z.B. CMV-Infektionen), zytotoxische Wirkung von Immunsuppressiva und nicht zu vergessen die klassischen Risikofaktoren (Weis and von Scheidt, 1997). Fortgesetzte Aktivierung der Endothelzellen führt zur Endotheldysfunktion und weiter zur Intimahyperplasie (Weis et al. 2000). Die Verletzung des Endothels führt letztlich zur verstärkten Einwanderung von Lymphozyten, Monozyten und dendritischen Zellen (Weis, von Scheidt 2000). Damit wird die allogen-immunologisch bereits subendothelial vorhandene inflammatorische Reaktion durch Induktion von Cytokinen und Wachstumsfaktoren verstärkt. Im Langzeitverlauf kommt es zu funktionellen Gefäßveränderungen durch Proliferation der Glattmuskelzellen (SMCs, smooth muscle cells) (Weis, von Scheidt 2000).

Bei der Aktivierung der Endothelzellen spielen gerade die Oberflächenmoleküle E-Selektin, VCAM-1 (vascular cell adhesion molecule 1) und ICAM-1 (intercellular adhesion molecule-1) eine bedeutende Rolle. So werden diese unter anderem von den Endothelzellen exprimiert, um ein Anheften der Immunzellen aus den Gefäßen und die Diapedese zu ermöglichen. Daher wurden diese Moleküle in dieser Arbeit als Marker für Endothelzellaktivierung verwendet.

1.2.1 Interaktionen zwischen Leukozyten und Endothelzellen im Rahmen der Entwicklung einer Transplantatabstoßung

Bei vielerlei Abwehrmechanismen des Körpers gegen Bakterien, Viren und andere Mikroorganismen, aber auch bei Reparaturmechanismen des Gefäßsystems, spielen Leukozyten eine zentrale Rolle (Ghasemzadeh and Hosseini, 2015). Diese Stellung nehmen sie auch im Rahmen einer Entwicklung und eines Fortschreitens einer akuten und chronischen Transplantatabstoßung am Herzen ein (Denton et al., 2000; Dietrich et al., 2000; Salom et al., 1998).

Hierbei nehmen Interaktionen zwischen Endothelzellen und Leukozyten (Abb: 1) einen entscheidenden Teil dieser Abwehrkaskade ein (Langer and Chavakis, 2009; Pohlman and Harlan, 2000). Dieser prinzipiell nützliche Mechanismus kann aber auch bei entzündlichen und autoimmunen Erkrankungen eine Rolle spielen, im Rahmen derer Leukozyten pathologisch wirken. Es kommt hierbei unter anderem zu einer Expression von Rezeptoren wie E-Selektin, ICAM-1 und VCAM-1 durch Endothelzellen. Leukozyten ihrerseits besitzen Liganden für diese Rezeptoren und werden durch Ligand-Rezeptor-Interaktionen aus dem Blutfluss heraus gebremst. Diesen Vorgang bezeichnet man als Rolling. Sobald die Leukozyten zum Stillstand gekommen sind, werden diese aktiviert und beginnen nun durch den Zellverband der Endothelzellen hindurchzuwandern. Man nennt diesen Vorgang auch Transmigration. Nun können die Leukozyten ihrer immunologischen Aufgabe nachgehen.

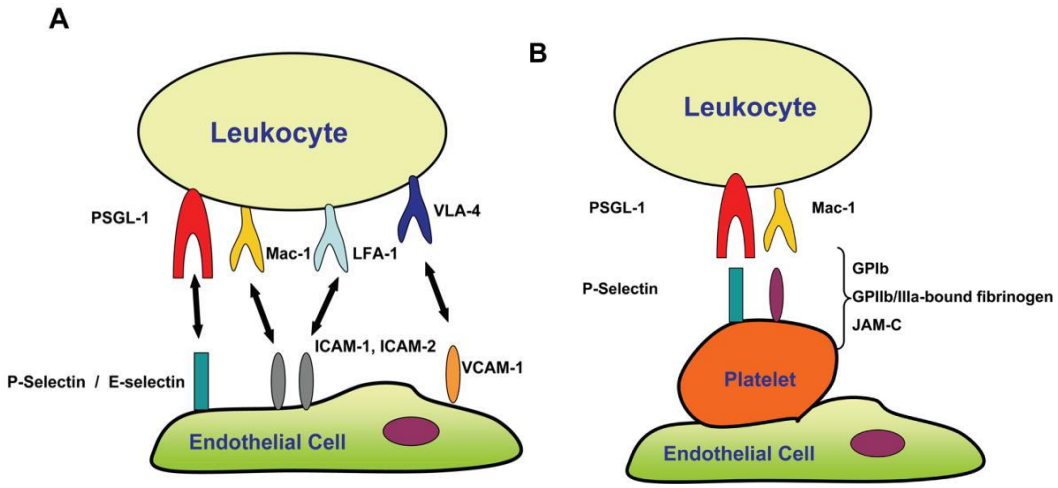

Abbildung 1 Interaktion zwischen Endothelzellen und Leukozyten (Langer and Chavakis, 2009).

1.2.2 E-Selektin

Bei E-Selektin, welches auch als CD62 antigen-like family member (CD62E), oder endothelial leukycyte adhesion molecule-1 (ELAM-1) bezeichnet wird, handelt es sich um ein Oberflächenmolekül, welches ausschließlich von Endothelzellen produziert wird. E-Selektin spielt bei der Anheftung von verschiedenen Zellen des Immunssystems an dem Endothel eine wichtige Rolle. So binden vor allem Leukozyten mit ihren Liganden an E-Selektin. Hierbei werden die Leukozyten erst gebremst(Enrolling) und bleiben anschließend an Endothelzellen haften. Danach ist es den Leukozyten durch verschiedene, komplexe Mechanismen möglich das Endothel zu durchdringen (Diapedese). Dort angekommen spielen sie eine große Rolle bei entzündlichen Prozessen. Die Expression durch Endothelzellen wird über Zytokine gesteuert (Bevilacqua et al., 1989).

Mehrere Studien konnten einen Anstieg der Expression von E-Selektin im Rahmen von Transplantatabstoßungen am Herzen nachweisen (Allen et al., 1993; Ferran et al., 1993; Smith et al., 1998; Yamazaki et al., 1998). Da eine Abstoßungsreaktion unweigerlich mit einer Vaskulitis einhergeht und diese eine entscheidende Rolle bei der Entstehung dieser Vaskulitis spielt, ist von einer Beteiligung von E-Selektin bei einer Transplantatabstoßung auszugehen.

1.2.3 VCAM-1

Bei VCAM-1 (CD106) handelt es sich um ein Immunglobulin, das nahezu ausschließlich von Endothelzellen (teilweise auch von glatten Muskelzellen) auf ihrer Oberfläche exprimiert wird (Osborn et al., 1989). Es ist ein Ligand der VLA-4 (very late antigen-4, Integrin alpha4beta1) (Elices et al., 1990), welches zu den Integrinen gezählt wird. Es spielt ebenso wie E-Selektin und ICAM-1 eine zentrale Rolle bei der Diapedese und dem Enrolling am Endothel.

Ohne immunsuppressive Therapie konnte im Tiermodell eine signifikante Zunahme der Expression von VCAM-1 und ICAM-1 in den Koronararterien von transplantierten Rattenherzen gezeigt werden

(Song et al. 2008). Weiterhin war auch bei herztransplantierten Patienten mit diagnostizierter TVP eine signifikante Zunahme an löslichem VCAM-1 im Koronarsinus nachweisbar, während lösliches E-Selektin und ICAM-1 unverändert war (Wu et al., 2003).

1.2.4 ICAM-1

ICAM-1 (CD54), ist ein Glykoprotein, welches typischerweise von Endothelzellen und immunkompetenten Zellen, wie Makrophagen und Lymphozyten, auf der Oberfläche exprimiert wird (Hubbard and Rothlein, 2000a). Diese Expression wird vor allem durch Interleukin-1 (IL-1) und Tumor-Nekrose-Faktor-α (TNF-α) ausgelöst. Es handelt sich hierbei um ein transmembranständiges Molekül. ICAM-1 stabilisiert Zell-Zell-Interaktionen und ermöglicht die Diapedese von Leukozyten durch den Endothelzellverband. Somit spielt ICAM-1 ebenso wie VCAM-1 und E-Selektin eine wichtige Rolle beim Enrolling und der Diadepese von Leukozyten und somit eine zentrale Rolle bei entzündlichen Reaktionen.

Das Enrolling spielt auch bei der Abstoßungsreaktion am transplantierten Herzen eine Rolle, da am Endothel eine Kaskade begonnen wird, welche entscheidend bei der Entstehung und dem Fortschreiten einer Immunantwort gegen das fremde Gewebe ist (Hubbard and Rothlein, 2000a).

1.3 Bedeutung von Anti-Endothelzell-Antikörpern

Nachdem die Rolle von HLA-Antikörpern bei der Transplantation von Organen oder Geweben im Allgemeinen schon seit längerem bekannt ist, rücken nun mehr und mehr die nicht-HLA-Antikörper (z.B. in Form von anti-Endothelzellantikörpern, AECAs, anti-endothelial cell antibodies) in den Fokus aktueller Forschung (Mehra et al., 2013). Es gibt Studien, die eine Korrelation zwischen Abstoßung und dem Nachweis von AECAs aufzeigen. Dies trifft hauptsächlich für nierentransplantierte Patienten zu (Ismail et al., 2009; Jackson et al., 2011). Bei herztransplantierten Patienten gibt es ähnliche Beobachtungen (Alvarez-Márquez et al., 2008; Faulk et al., 1999; Ferry et al., 1997; Rose, 2000), jedoch ist die entsprechende Analytik nicht Teil der Routinediagnostik.

Bei AECAs handelt es sich um Autoantikörper, welche sich gegen Antigene von Endothelzellen richten. Diese Autoantikörper finden sich bei verschiedensten vaskulitischen und autoimmunen Erkrankungen (Lundqvist et al., 1992; Müller and Csernok, 2002; Robak et al., 2007). Die AECAs können die Aktivierung von proinflammatorischen Signalen induzieren (Lee et al., 2002), die Expression von Adhäsionsmolekülen erhöhen (Carvalho et al., 1999; Lee et al., 2002; Triolo et al., 1998), und die Freisetzung von Endothelin-1 (Yamamoto et al., 1997) bewirken, nachdem sie an Endothelzellen binden. Die Frage, inwieweit AECAs bei Transplantierten eine Bedeutung für den Endothelzellaktivierung haben, wird untersucht (Lawson et al., 2005), ist aber nach wie vor unklar.

1.4 Fragestellung

Die Endothelzellkultur eignet sich hervorragend, um die spezifische Wirkung von Serumbestandteilen von Herztransplantierten auf die Funktion von humanen Endothelzellen auf zellulärer Ebene zu untersuchen. Dieses Verfahren wurde in der vorliegenden Arbeit genutzt, um

1. die Anwesenheit von AECAs als nicht-HLA-Antikörper im Serum von herztransplantierten Patienten zu überprüfen und gleichzeitig eine Korrelation mit den histologisch gesicherten Abstoßungsepisoden dieser Patienten im ersten Jahr nach HTX herzustellen.

2. die proinflammatorische Wirkung von löslichen Faktoren im Serum von herztransplantierten Patienten im ersten Jahr nach HTX auf humane Endothelzellen zu zeigen. Mittels zellulärem ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay) sollte eine Unterscheidung zwischen der Expression von E-Selektin, VCAM-1 und ICAM-1 möglich sein. Bei einer vermehrten Expression dieser Moleküle sollte ein Zusammenhang mit klinisch gesicherten Abstoßungsreaktionen überprüft werden.

2. Material und Methoden

2.1 Verwendete Geräte und Hilfsmittel

Die verwendeten Geräte und Hilfsmittel sind im Anhang gelistet.

2.2 Verwendete Lösungen, Medien und Antikörper

Die verwendeten Lösungen, Medien und Antikörper sind im Anhang gelistet.

2.3 Methoden

2.3.1 Studiendesign

Vorgestellt wird eine offene, nicht randomisierte *ex-vivo-in-vitro*-Studie unter Verwendung von Serumproben von herztransplantierten Patienten (gesamt n=35) und gesunden Probanden (gesamt n=38). Die Anzahl der Patienten/Probanden, die für die jeweilige Bestimmung der AECA-Titer bzw. der inflammatorischen Wirkung von Serumbestandteilen auf vitale Endothelzellen untersucht wurde, ist im Ergebnisteil angegeben.

Insgesamt wurden 263 Blutproben von 34 herztransplantierten Patienten gesammelt (zeitgleich mit einer routinemäßig angesetzten Myokardbiopsie) und untersucht (31 Männer, 4 Frauen, Durchschnittsalter 57+/-35 Jahre). Patientencharakteristika sind in Tabelle 1 aufgelistet. Die Blutproben wurden im Rahmen des klinischen Vorgehens vor der Transplantation und im Verlauf des ersten Jahres nach Transplantation über eine Venenpunktion in entsprechenden S-Monovetten (Sarstedt, Nürnbrecht, Deutschland) gesammelt und nach einer 30 minütigen Gerinnungszeit zentrifugiert (3000xg, 10 min, Raumtemperatur). Serum wurde aus dem Überstand vorsichtig entnommen und portioniert eingefroren (Lagerung bei -80°C).

Diese Proben wurden dann für die Bestimmung des AECA-Titers (Kapitel 2.3.3) und die Untersuchung zur proinflammatorischen Wirkung von Serumbestandteilen auf vitale Endothelzellen aufgetaut und entsprechend dem Protokoll (Kapitel 2.3.3) eingesetzt. Als Kontrollgruppe wurde Serum von gesunden Probanden verwendet (Ermittlung der Grundfrequenz von AECAs im Probandenserum, Ermittlung von Schwellenwerten zur inflammatorischen Wirkung von Serumbestandteilen im Probandenserum zur Abgrenzung der Studiengruppe).

Anzahl der Patienten gesamt	34
Männer [n (%)]	30 (88)
mittleres Alter [Jahre]	53 ± 9
Grunderkrankung [n (%)] dilatative Kardiomyopathie inflammatorische Kardiomyopathie koronare Herzkrankheit Herzinsuffizenz	 24 (68) 10 (24) 2 (6) 1 (3)
Herzunterstützungssystem vor HTX [n (%)]	7 (21) (5x INCOR, 1x EXCOR, 1x Heartmate)
Größe [cm]	173,7 ± 7,3
Gewicht[kg]	73,9 ± 10,5
Primäre Immunsuppression [n (%)] Prograf Rapamycin Cyclosporin A Mycophenolsäure Azathioprin Everolimus	 15 (44) 1 (3)] 18 (53) 21 (62) 7 (21) 5 (15)
BMI (body mass index)	24,5 ± 3,6
Ischämiezeit [min]	201,5 ± 46,5
Dauer der extrakorp. Oxygenierung [min]	165,1 ± 33,0
Reperfusionsdauer [min]	78,1 ± 28,8
Tod nach HTX (Stand 18.08.2014) [n (%)]	13 (38)
Todesursache [n (%)] Herzversagen Tumor cerebrale Massenblutung Sepsis Aspiration Infekt	 7 (54) 2 (14) 1 (8) 1 (8) 1 (8) 1 (8)
Mittlere Überlebensdauer [Tage]	2328 ± 1399
Überlebende nach 1 Jahre nach HTX [n (%)]	29 (85)
Überlebende nach 3 Jahren nach HTX [n (%)]	28 (82)
Überlebende nach 5 Jahren nach HTX [n (%)]	25 (74)

Tabelle 3 Patientencharakteristika (Daten sind in Mittelwert +/- Standardabweichung oder als Anzahl n und in % angegeben; INCOR, Berlin Heart – INCOR®-System; Berlin Heart EXCOR®-System; HeartMate II, Thoratec) HTX, Herztransplantation)

2.3.2 Votum der Ethikkommission

Die Blutentnahme von gesunden Probanden wurde durch das Ethikvotum No. 10-101-0259 bestätigt. Weiterhin wurde die Blutentnahme der herztransplantierten Patienten für die vorliegenden Untersuchungen über ein positives Ethikvotum abgesichert. Die entsprechenden Blutproben wurden bei den Routineuntersuchungen entnommen und erforderten keine zusätzliche Punktion. Alle Probanden und Patienten gaben schriftlich ihr Einverständnis.

Für die Isolierung von humanen Endothelzellen aus Nabelschnurvenen wurde von Dr. Markus Hönicka ein entsprechender Ethikantrag bei der hiesigen Ethikkommission gestellt und genehmigt. Die Aufklärung erfolgte durch das ärztliche Personal der St. Hedwigsklinik in Regensburg.

2.3.3 Methoden zur Isolierung und Lagerung von humanen Endothelzellen

Zusammensetzung, Konzentration und Herstellerangaben zu den Komponenten sämtlicher Lösungen, Puffer und Medien sowie die verwendeten Materialien finden sich im Anhang.

Isolierung humaner Endothelzellen aus Nabelschnüren

Die in einer speziellen Nabelschnur-Transportlösung (Zusammensetzung und Herstellung siehe Anhang) aufbewahrten Nabelschnüre wurden nach Erhalt durch unser Labor nach folgendem Schema verarbeitet, um humane Endothelzellen aus Nabelschnurvenen (HUVEC, human umbilical vein endothelial cells) zu erhalten:

1 Desinfizierung der Nabelschnur in 70%igem vergälltem Ethanol für 5 min
2 Waschung der Nabelschnur mit PBS (phosphate buffered saline)
3 Verwerfung der jeweils randständigen 3cm der Nabelschnur
4 Waschung der Nabelschnur mit Hepes-Lösung
5 Durchspülung der Nabelschnur mit Hepes-Lösung durch Einspritzung mit einer 20ml Spritze (2x à 20ml)
6 Aufsuchen eines ca. 10cm langen Teilstücks der Nabelschnurvene und herauspräparieren dieses 10cm langen Teilstücks aus der gesamten Nabelschnur
7 Erneutes Durchspülen der Vene mit Hepes-Lösung (2x à 20ml)
8 Ablösung der Endothelzellen aus der Nabelschnurvene mit 5ml Collagenase über 10 min bei 37°C
9 Abstoppen der Collagenase-Reaktion mit 5ml Medium
10 Ausplattierung der Zellen-Collagenase-Lösung in einer T25-Zellkulturflasche und Abstoppen der Collagenase-Aktivität mit 5ml Medium
11 Inkubation der Zellen im Brutschrank bei 37°C und 5%CO_2 über Nacht

Kultivierung und Passagieren humaner Endothelzellen

Am 2. Tag nach Isolierung der Zellen wurden diese nach folgender Vorgehensweise passagiert und zur Kryokonservierung vorbereitet:

1. Vorsichtiges Waschen der Zellen in der T25-Zellkulturflasche mit PBS-Lösung (3x à 5ml)
2. Inkubation der Zellen mit 5ml frischem Medium im Brutschrank
3. Mediumwechsel am 3. oder 4.Tag
4. Ausplattieren auf T175 in 25ml Medium

Je nach Wachstum waren die Zellen am 6.-12.Tag nach Isolierung bereit für eine Kryokonservierung.

Kryokonservierung und Lagerung der Endothelzellen

Um Zellen für spätere Verwendung zu konservieren, wurden diese in flüssigem Stickstoff gelagert. Um eine schädigende Kristallbildung zu verhindern, werden Frostschutzmittel (DMSO, Dimethylsulfoxid) eingesetzt. Zusätzlich wurde Serum zugesetzt, da einige Bestandteile einen schützenden Effekt besitzen. Die Zugabe von DMSO zu den Zellen erfolgt zügig. Die Zellen werden dann in einen Freezing Container (Nalgene Mr. Frosty, Thermo Scientific) eingesetzt und bei -80°C über Nacht kryokonserviert. Der Isopropylalkohol in dem Kontainer erlaubte eine definierte Kühlungsrate von -1°C/min bei einer Außentemperatur von -80°C. Am nächsten Tag wurden die Zellen im flüssigen Stickstoff gelagert.

Zur Vorbereitung wurden die Zellen nach folgendem Schema bearbeitet, wobei die Zellen ständig gekühlt wurden und ausschließlich gekühlte Lösungen und Materialien verwendet wurden:

1. Ablösung der Zellen aus einer T175 mit 10ml Trypsinlösung
2. Abstoppen der enzymatischen Reaktion mit 10ml Medium
3. Anreicherung der Zellen mittels Zentrifugation bei 1200rpm und 4°C
4. Waschung der Zellen mit CPtes-Puffer-Lösung
5. Bestimmung der Zellzahl mit Cellcounter CASY (Messverfahren siehe Zellzahlbestimmung mittels CASY-Cellcounter„)
6. Bestimmung des Verhältnisses zwischen lebenden und abgestorbenen Zellen mit Trypan-Blau-Lösung in Neubauer-Zählkammer unter Verwendung eines Lichtmikroskops (Kapitel 5)
7. Resuspendieren der Zellen mit Medium (Konzentration 90%, 30% HS, 10%Hepes [20mM])
8. Aliquotieren der entsprechenden Menge an resuspendierten Zellen und Einbringung von 6e5 Zellen pro Cryoröhrchen (6 Portionen pro Kultur)
9. Versetzung der Zellen mit DMSO-CPtes-Lösung
10. Sofortiges Einfrieren der Cryoröhrchen in einem Freezing-Container bei -80°C über Nacht
11. Überführung der Cryoröhrchen in einen Stickstoff-Tank

Auftauen und Anzüchten einer Endothelzellkultur

Die Vorbereitung einer Versuchsreihe begann immer mit dem Auftauen und dem Anzüchten von Endothelzellen, bei welchem folgendermaßen vorgegangen wurde:

1. Schnelles Auftauen der Cryoröhrchen in einem 37°c warmem Wasserbad (Dauer 2-3 min) – Es sollten sich noch kleine Eiskristalle in der Lösung befinden.
2. Kurze Lagerung der Cryoröhrchen auf Eis (Aufschütteln der Zellsuspension ohne Eiskristalle)
3. Entnahme von 415µl Zellsuspension und Überführung in 15ml vorbereitetes Medium
4. Zentrifugation bei 1200rpm und 4°C; Vorsichtiges Absaugen des Überstandes
5. Resuspendierung der Zellen in 1ml Medium; Zellzahlbestimmung mit CASY (siehe unten) Herstellung einer Zellsuspension mit entsprechender Konzentration
6. Aussaat auf gelatinierte T25-Zellkulturzflasche
7. Inkubation bei 37°C und 5%CO_2 für 3 Stunden
8. Vorsichtiges Absaugen des Mediums
9. Spülung der Zellen mit PBS-Lösung zur Entfernung restlicher DMSO-CPtes-Lösung
10. Zugabe von 25ml frischem Medium und weitere Inkubation der Zellen im Brutschrank

Mediumwechsel

1. Vorsichtiges Absaugen des alten Mediums
2. Spülung der Zellen mit PBS-Lösung
3. Zugabe von 5ml frischen Mediums

Ablösen von Endothelzellen

1. Vorsichtiges Absaugen des Mediums
2. Dreimalige Waschung mit PBS-Lösung
3. Zugabe von 2ml Trypsin-EDTA-Lösung*
4. Kontrolle der vollständigen Zellablösung mittels Lichtmikroskops, „Abklopfen der Zellen“, Resuspendieren der abgelösten Zellen mit der Pipette
5. Abstoppen der enzymatischen Reaktion durch Zugabe von 4ml Medium

*Trypsin, eine alkalische Pankreasprotease aus den Bauchspeicheldrüsen von Rindern oder Schweinen isoliert, ist eine Endopeptidase, die Peptidbindungen am Carboxylende eines Lysins oder Arginins spaltet. In der Zellkultur macht man sich diese Eigenschaft zunutze, um Zell-Matrix-Verbindungen anzudauen und die Zellen von der Kulturunterlage abzulösen. EDTA dient als Ca^{2+}-Chelator, um Zell-Zell-Verbindungen zu lösen.

Anlegen einer Zwischenkultur

1. Beschichtung einer T25-Zellkulturflasche (3ml Gelatinelösung), Inkubation bei 37°C, 30 min
2. Absaugung der Gelatine-Lösung mit Pasteurpipette
3. Spülung der Zellkulturflasche mit PBS-Puffer
4. Zentrifugation der abgelösten Endothelzellen bei 1200rpm und 4°C
5. Vorsichtiges Absaugen des Mediumüberstandes
6. Resuspendierung des Zellpellets mit 1ml frischen Medium
7. Konzentrationsbestimmung der Zellen via CASY
8. Entnahme der gewünschten Zellmenge mit Pipette und Auffüllen auf 5ml Zelllösung mit der entsprechenden Konzentration
9. Gabe der Zellsuspension in eine T25 Zellkulturflasche
10. Inkubation der Zellkultur bei 37°C und 5% CO_2

Zellzahlbestimmung mittels CASY-Cellcounter

Zur Zellzählung wurde eine automatisierte Zellzählung (Hämocytometer) benutzt, welche auf dem Prinzip der Widerstandsmessung und einer Pulsflächenanalyse stattfindet. Bei diesem Cell Account System der Firma OLS OMNI Life Science, Bremen (CASY® Modell TTC) werden die, in einem schwachen Elektrolyten vorliegenden Zellen, durch eine Messpore gesaugt. Durch die Zellen kommt es hier innerhalb der Kapillare zu einer Widerstandserhöhung. Diese Impendanzerhöhung kann mittels Programmsoftware auf die Zellzahl (Abtastung hierbei 1MHz), den Durchmesser der Zelle und das Volumen umgerechnet werden. Details zum Messprinzip siehe Herstellerangaben.

2.3.4 Nachweis von AECA im Serum

Der Begriff „Autoantikörper gegen Endothelzellen“ (AECA, anti-endothelial cell antibodies) bezeichnet eine heterogene Gruppe von Antikörpern, die mit unterschiedlichen, nicht exakt charakterisierten Endothelzell-Antigenen reagieren. (Produktbeschreibung Euroimmun, FA_1960_I_DE_A02; http://www.hpseelig.de/autoantikoerper/endothelzellen-autoantikoerper.pdf).

In der vorliegenden Studie wurden HUVEC als Substrat für den Nachweis von AECA (FA 1960-1005) verwendet. Als Positivkontrolle wurde das Serum eines Patienten mit systemischen Lupus erythematodes verwendet (freundlicherweise von Prof. Rainer Straub, Klinik für Innere Medizin I, Uniklinik Regensburg, zur Verfügung gestellt).

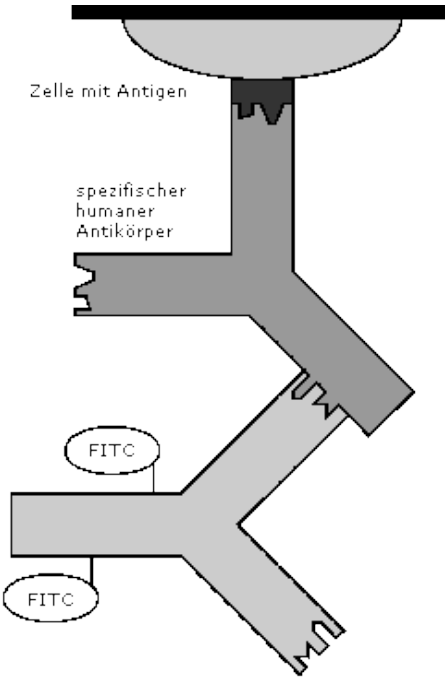

Abbildung 2 Um AECA zu identifizieren, wurden HUVEC verwendet. Im ersten Inkubationsschritt binden sich bei positiven Proben die nachzuweisenden Antikörper aus dem verdünnten Patientenserum an die Antigene auf den Endothelzellen. Im zweiten Schritt werden diese Antikörper mit Fluorescein-markierten Anti-Human-IgG-Antikörpern (AF 102-0115, Euroimmun) sichtbar gemacht. Im Fluoreszenzmikroskop werden die gebundenen Antikörper identifiziert. Die Methode der indirekten Immunfluoreszenz ermöglicht die Detektion in der Zelle (www.euroimmun.de/index.php?id=99ft_beschreibung&L=0)

Im folgendem wird das Vorgehen bei der Herstellung von AECA-Präparaten beschrieben:

1. Aussaat von 2,5-3,0 Millionen HUVECs pro Objektträger (Kulturfläche, 10 cm^2)
2. Bebrütung von jeweils sechs Objektträgern in einer Box mit 30ml Medium (M199 + Supplement + 10% FKS)
3. Inkubation im Brutschrank (3 Stunden, Absetzen der Zellen auf Objektträgeroberfläche)
4. Fixieren der Zellen auf Objektträger mit 4% Paraformaldehyd für 5 Stunden
5. Aufbringen eines Rasters (6 Felder pro Objektträger) mittels Fettstift, damit verschieden Proben getrennt voneinander aufgebracht werden können
6. Waschung der Zellen 5 min in PBS-Lösung
7. Blockierung der Zellen über Nacht in einer 10%BSA-Lösung in PBS-Puffer
8. Abkippen der Blockierlösung
9. Inkubation der Zellen mit Patientenseren 1:10 verdünnt in PBS-Lösung mit 0,1% Tween bei Raumtemperatur in einer feuchten Kammer für 60 min
10. Zweimalige 5-minütige Waschung der Objektträger mit PBS-Lösung mit 0,1% Tween
11. Inkubation der Zellen mit dem Antikörper FITC-Conjugate-IgG (Firma Euroimmun) für 60 min bei Raumtemperatur in einer feuchten Kammer (Dunkel)
12. Zweimalige 5-minütige Waschung der Objektträger mit PBS-Lösung mit 0,1% Tween
13. Trocknung der Objektträger und Eindeckeln mit Fluoromount
14. Begutachtung, Auswertung und Anfertigungen von Ablichtungen unter dem Fluoreszenzmikroskop

Zunächst wurde die spezifische Positivkontrolle aus dem Euroimmun-Kit verwendet, um die Lokalisation der AECA im Zytoplasma der Endothelzellen darzustellen. Als Negativkontrolle wurde Serum von gesunden Probanden verwendet. Abbildung 3 zeigt entsprechende Beispiele.

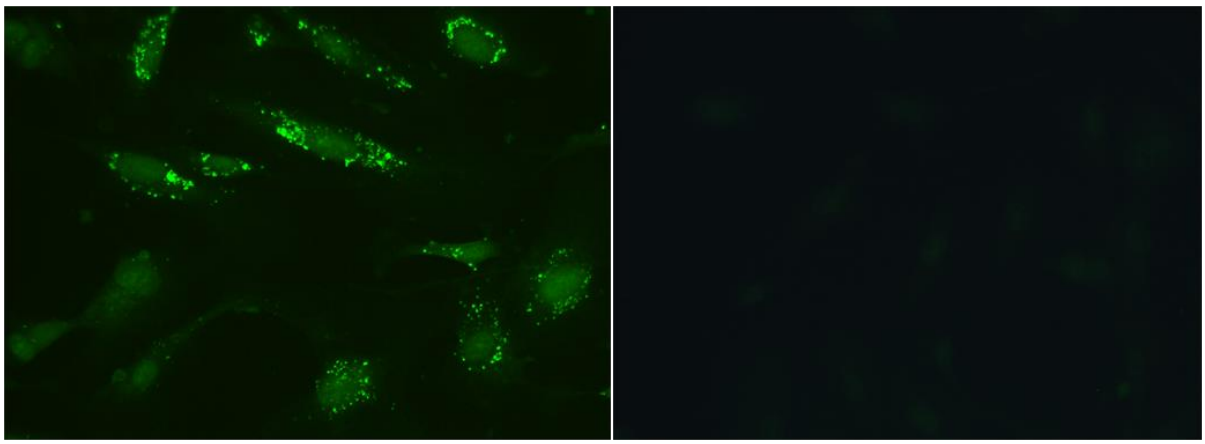

Abbildung 3 Nachweis von AECA mittels indirekter Immunfluoreszenz. Bei der Positivkontrolle (links) zeigt sich eine positive Reaktion im Zytoplasma (grün), bei der Negativkontrolle (rechts) zeigt sich keine Anfärbung.

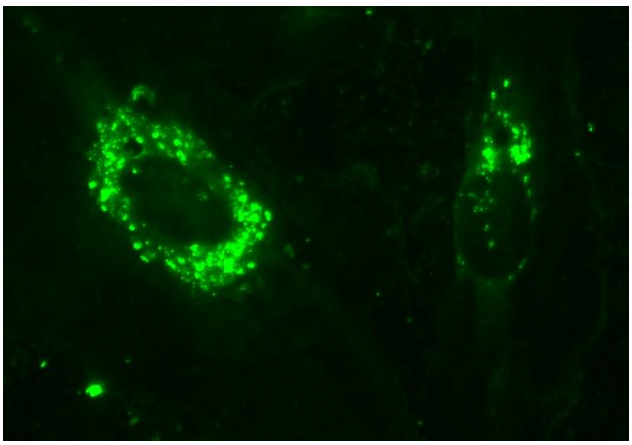

Abbildung 4 Nahaufnahme zweier AECA-positiven Zellen eines herztransplantierten Patienten.

Dieses charakteristische Bild wurde als positiver Antikörperbefund gewertet und die Patientenseren als positiv bzw. negativ eingeteilt (Abbildung 4). Der Nachweis einer positiven Zelle pro Gesichtsfeld (Vergrößerung 1:1000) wurde als AECA-positiv gewertet.

Da aus der Literatur der Nachweis von AECAs hauptsächlich bei Patienten mit Autoimmunerkrankungen gezeigt wurde, sollte die Methodik der indirekten Immunfluoreszenz auch mit Serumproben eines an systemischen Lupus erythematodes erkrankten Patienten überprüft werden. Wie aus Abb. 5 ersichtlich, wurden hier nur die Kerne angefärbt.

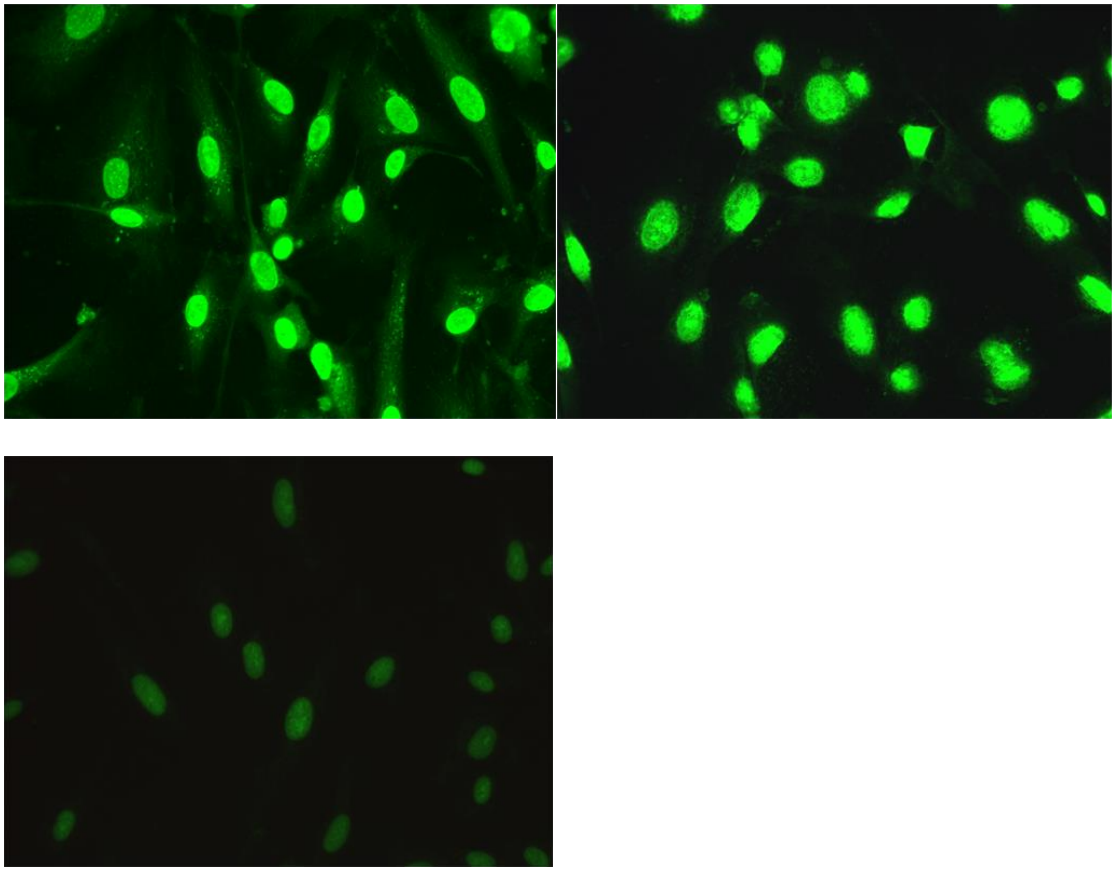

Abbildung 5 Verdünnungsreihe zum Nachweis von AECAs bei einem Lupus-Patienten. Fixierte HUVEC wurden mit einer verdünnten Serumprobe eines Patienten mit systemischen Lupus erythematodes inkubiert und gefärbt (Methodik). Es ist eine deutlich positive Reaktion zu erkennen, welche im Verlauf der Verdünnungsreihe abnimmt. Allerdings handelt es sich hier um eine Kernfärbung, sodass sie als „Positivkontrolle“ ausscheidet. Verdünnung 1:10, 1:100, 1:1000.

Aus früheren Untersuchungen wurde ein Patient (Patient 1) aus dem Patientenkollektiv als AECA-positiv befunden (nicht veröffentlichte Daten aus AECA-ELISA-Untersuchungen von K. Hollnberger, HTC-Labor). Eine Probe dieses Patienten wurde verdünnt (1:100), mit HUVEC koinkubiert und gefärbt. Wie aus Abb. 6 ersichtlich, war ein Teil der Zellen um den Zellkern angefärbt (AECA-positiv). Gleichzeitig war auch eine positive Kernfärbung zu sehen, was nicht als AECA-positiver Befund gewertet wurde.

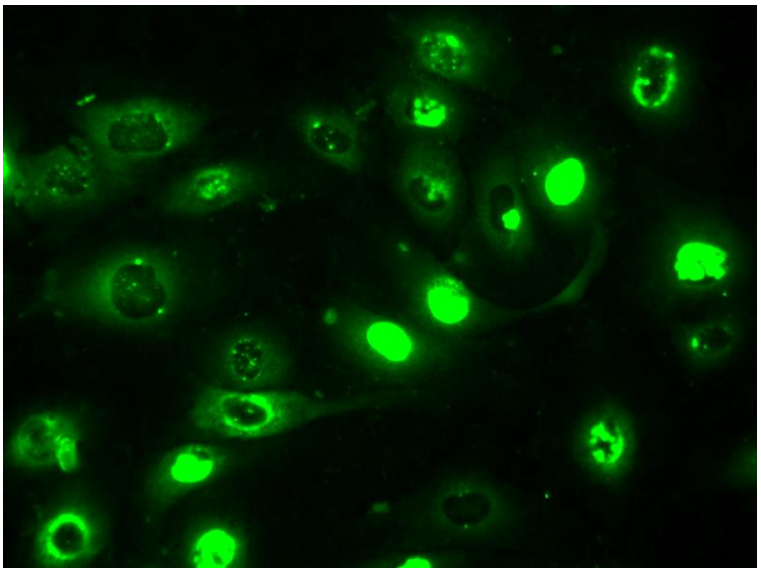

Abbildung 6 Stark positive Probe von Patient 1 in Verdünnung 1:100. Deutlich zu erkennen das Leuchtsignal um den Zellkern. Bei dieser Probe sind zusätzlich einige Kerne angefärbt. Diese Kerne wurden nicht als AECA-positiv gewertet.

Anhand dieser Bilder wurden die Proben (n=2 pro Patient) nach positiver und negativer Antikörperbildung ausgezählt. Hierzu wurden die Gesamtanzahl der Zellen und die Anzahl positiv gefärbter Zellen bestimmt. Daraus wurde im Anschluss der Prozentsatz positiver Zellen an der Gesamtzellzahl errechnet. So konnten die Daten mit den anderen Versuchsreihen und Patientenfakten verglichen werden.

2.3.4 Aktivierung von Endothelzellen durch Serumbestandteile – Zell-ELISA

Bei verschiedenen Erkrankungen(z.B. Polymiositis) konnte ein Zusammenhang zwischen Autoantikörpern im Serum und der Aktivierung von Endothelzellen nach Kontakt mit dem Serum nachgewiesen werden (Barbasso Helmers et al. 2009; Lundberg et al. 2000; De Bleecker et al. 1994). Zu diesem Zweck wurden vitale HUVEC unter in vitro Bedingungen mit Patienten- und Probandenserum inkubiert und mittels Zellelisa (Münzel et al. 2007) die Expression von ICAM-1, VCAM-1 und E-Selektin auf der Zelloberfläche nachgewiesen.

Um die inflammatorische Reaktion der Endothelzellen zu überprüfen (Positivkontrolle), wurde ein Teil der Zellen in jedem Versuchsansatz zusätzlich mit Tumornekrosefaktor (TNF-α) stimuliert. Als Negativkontrolle wurden die Endothelzellen mit Basalmedium ohne Zusätze inkubiert.

Zur Untersuchung der stimulierenden Wirkung von Serumproben, wurden diese verdünnt und mit den nicht-aktivierten Zellen inkubiert.

Methodisches Vorgehen:

1. Aussaat HUVECs der Passage 3 mit einer Dichte von 1200 Zellen pro well auf 96-well-Platte mit Medium (Promocell + 10% Humanserum Gruppe AB von PAA)
2. Anzüchten der Zellen bis 90% konfluentem Wachstum
3. Inkubation der Zellen mit serumarmem Medium (Promocell + 0,1% Humanserum der Gruppe AB von PAA) für 12 Stunden
4. Herstellung der Patientenseren (jeweils 400µl Promocell-Basalmedium + 200µl Patientenserum, entspricht 30%)
5. Waschung der Zellen mit PBS-Lösung und anschließende Inkubation der Zellen mit den jeweiligen verdünnten Patientenseren, TNF-α zur Positivkontrolle (Endkonzentration 10ng/ml in Promocell Basalmedium) und Promocell-Basalmedium zur Negativkontrolle (Inkubationszeit bei ICAM-1 und VCAM-1 24 Stunden, bei E-Selektin 4 Stunden)
6. Fixierung der Zellen in den 96-well-Platten mit 50µlAcetonmethanol/well (Herstellung siehe Anhang) für 10 Minuten, anschliessend abkippen der Lösung und Lagerung bei -20°C (Durchführung der Elisas innerhalb von 7 Tagen)
7. Herstellung des ELISA-Substrates (Angaben pro 100ml Substrat): Auflösung von 1,051g Diethanolamin in bidestilliertem Wasser, Einstellung des pH-Wertes auf exakt 10,3 (mit 2M HCL), Auflösung von 1 Tablette Paranitrophenylphosphat pro 20ml Diethanolaminlösung (Arbeiten im Dunkeln)
8. Zweimalige Waschung der 96-well-Platten mit 250µl PBS-Lösung mit 0,25% BSA pro well
9. Inkubation der Zellen mit Anti-ICAM (1:1000, 50µl/well) / Anti-VCAM (1:1000, 50µl/well) / Anti-ELAM (1:500, 50µl/well) bei 37°C und 5%CO_2 für eine Stunde
10. Zweimalige Waschung der 96-well-Platten mit 250µl PBS-Lösung mit 0,25% BSA pro well
11. Inkubation der Zellen mit biotyniliertem Anti-Maus-Antikörper (1:1000, 50µl/well) bei 37°C und 5%CO_2 für 30 min
12. Zweimalige Waschung der 96-well-Platten mit 250µl PBS-Lösung mit 0,25% BSA pro well
13. Inkubation der Zellen mit Substrat (Herstellung siehe Schritt 7) bei 37°C und 5%CO_2 im Dunkeln für 30 min
14. Messung der Extinktion im ELISA-Reader R25 bei 405nm Wellenlänge

Im Folgenden ist eine beispielhafte Belegung einer 96-well-Platte gezeigt, wie sie im Versuchsaufbau zur Bestimmung der einzelnen ELISAs verwendet wurde. Um die Datensätze untereinander vergleichen zu können, wurde jeweils eine 8-fach Bestimmung Positivkontrolle (+TNF-α) und Negativkontrolle (Basal) pro 96-well-Platte eingefügt:

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	+TNF	Basal	Pat1	Pat3	Pat5	Pat7	Pat9	Pat11	Pat13	Pat15	Pat17	Pat19
B	+TNF	Basal	Pat1	Pat3	Pat5	Pat7	Pat9	Pat11	Pat13	Pat15	Pat17	Pat19
C	+TNF	Basal	Pat1	Pat3	Pat5	Pat7	Pat9	Pat11	Pat13	Pat15	Pat17	Pat19
D	+TNF	Basal	Pat1	Pat3	Pat5	Pat7	Pat9	Pat11	Pat13	Pat15	Pat17	Pat19
E	+TNF	Basal	Pat2	Pat4	Pat6	Pat8	Pat10	Pat12	Pat14	Pat16	Pat18	Pat20
F	+TNF	Basal	Pat2	Pat4	Pat6	Pat8	Pat10	Pat12	Pat14	Pat16	Pat18	Pat20
G	+TNF	Basal	Pat2	Pat4	Pat6	Pat8	Pat10	Pat12	Pat14	Pat16	Pat18	Pat20
H	+TNF	Basal	Pat2	Pat4	Pat6	Pat8	Pat10	Pat12	Pat14	Pat16	Pat18	Pat20

Tabelle 4 Beispielhafte Belegung einer 96-well-Platte, die Positivkontrolle mit TNF-α: 8-fach-Bestimmung, die Negativkontrolle mit Basalmedium von Promocell: 8-fach-Bestimmung, Patientenseren: 4-fach-Bestimmung. Aus Gründen der Praktizierbarkeit wurden max. sechs 96-well-Platten gleichzeitig verarbeitet.

Bestimmung der optimalen Serumprobenkonzentration, des Messungszeitpunkts und der Schwellenwerte

Um den idealen Anteil an Patientenserum im Koinkubationsmedium festzulegen wurden zwei 96-well-Platten mit HUVEC gezüchtet. Auf diese wurden AB-Serum von PAA + TNF-α(Positivkontrolle; 4-fach-Bestimmung), AB-Serum von PAA ohne TNF-α(Negativkontrolle; 4-fach-Bestimmung), HUVEC ohne Zusatz (blank; 4-fach-Bestimmung) und insgesamt 5 Patientenproben in aufsteigender Konzentration aufgetragen. Es wurden jeweils Serumkonzentrationen von 30% hergestellt und verwendet.

In einem Vorversuch wurde die optimale Koinkubationszeit des Versuchsansatzes mittels Assay vor der Extinktionsmessung ermittelt. Zu diesem Zweck wurden die Messungen nach jeweils 15min, 30min und 60min Inkubationszeit durchgeführt. Es zeigte sich, dass eine Koinkubation mit Substrat von 30min Dauer ideal ist, da hier Messwerte < 1,000 erzielt werden konnten. Bei der Messung nach 15min war hingegen ein zu geringes Messsignal erreicht, nach 60min lagen die maximalen Absorptionswerte immer > 1,000. Beispiele für ICAM-1 Messwerte nach unterschiedlichen Messzeitpunkten sind in Tabelle 5 aufgezeigt. Vergleich der E-Selektin-Absorption nach 15 vs. 30 min Messzeit (Abb. 7) bzw. nach 30 versus 60 min Messzeit (Abb. 8).

Koinkubationsdauer	ICAM-1-Expression ohne TNF-Stimulation	ICAM-1-Expression mit TNF-Stimulation
15min	0,058	1,108
30min	0,097	1,960
60min	0,204	2,649

Tabelle 5 mittlere ICAM-1-Expression in Abhängigkeit der Koinkubationsdauer (relative Absorption bei 450 nm).

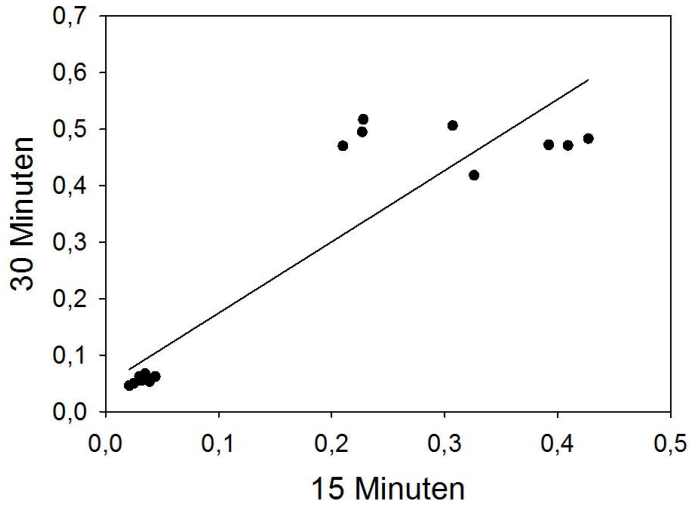

Abbildung 7 Vergleich der Koinkubationszeiten von Substrat bei 15min und 30min am Beispiel E-Selektin.

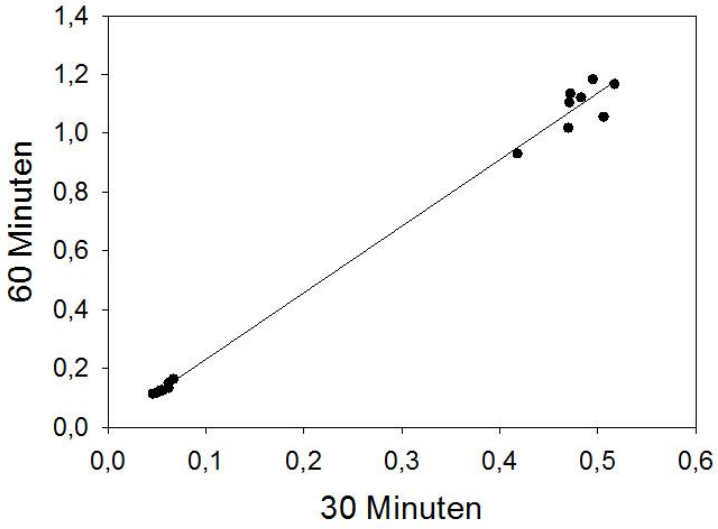

Abbildung 8 Vergleich der Koinkubationszeiten von Substrat bei 30min und 60min am Beispiel E-Selektin.

Als Schwellenwerte für E-Selektin, ICAM-1 und VCAM-1 wurde jeweils die Grundexpression der Negativkontrolle (Basalexpression in % der Positivkontrolle TNF-α) plus die zweifache Standardabweichung verwendet.

Es ergaben sich folgende Schwellenwerte:

	Schwellenwert
E-Selektin	3,6% TNF
VCAM-1	3,3% TNF
ICAM-1	4,6% TNF

Tabelle 6 Schwellenwerte

2.4 Statistische Auswertung und graphische Darstellung

SigmaPlot® 11.0

Zum Erstellen von den graphischen Darstellungen kam SigmaPlot® 11.0 zur Anwendung. Die gewonnenen Datensätze wurden in das Programm geladen und kodiert. Ergänzende Berechnungen konnten hiermit durchgeführt werden und die Daten graphisch aufbereitet werden.

Graphen der Art „line and scatter“:

Bei dieser graphischen Darstellung wird jedem Wert ein Punkt im Koordinatensystem zugeordnet. Die Punkte werden durch Linien verbunden, um den Verlauf besser darstellen zu können. Häufig wurde aus Gründen der Übersichtlichkeit die Signifikanzschwelle als gestrichelte, horizontale Linie eingezeichnet. Abbildung 9 zeigt ein Beispiel.

Graphen der Art „simple error bars“:

Hier wird einem Wert ein Punkt im Koordinatensystem zugeordnet. Dieser Punkt stellt die Oberkante einer Säule dar, welche ihre Basis an der X-Achse des Koordinatensystems hat. Durch einen vertikalen Strich wird gleichzeitig die Standardabweichung des Wertes angezeigt. Häufig wurde gleichzeitig ein horizontaler Strich eingefügt um den Mittelwert aller „simple-error-bars“ darzustellen. Abbildung 10 zeigt ein Beispiel.

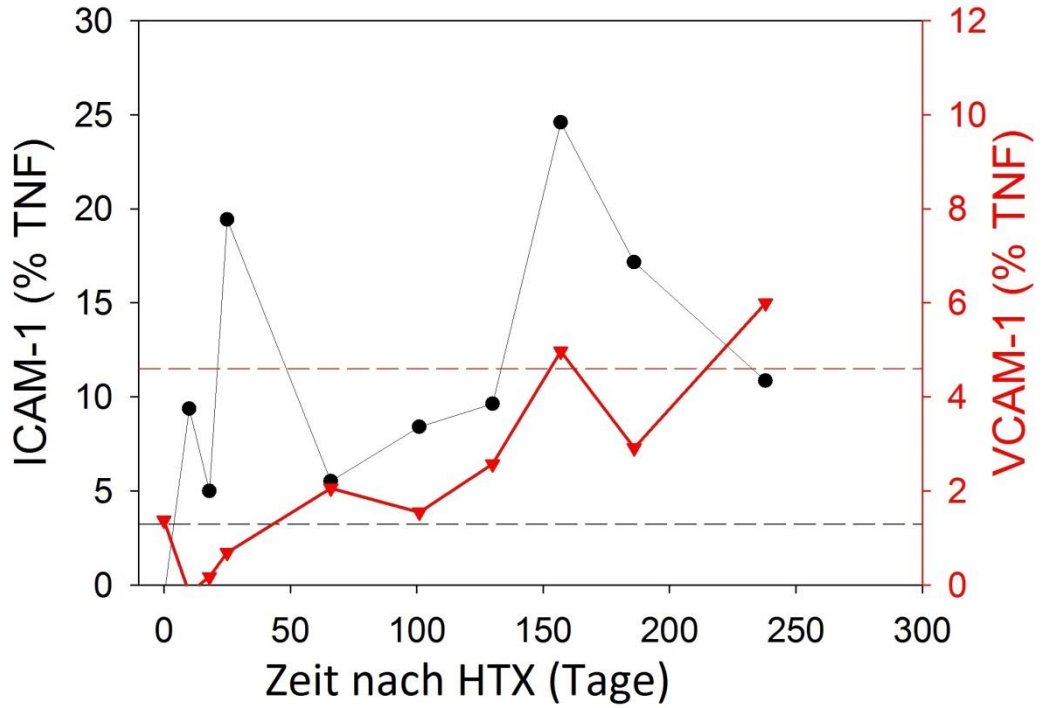

Abbildung 9 Beispiel "line and scatter". Dargestellt ist der Zeitverlauf nach Herztransplantation (HTX) für die Expression von ICAM-1 (schwarz) bzw. VCAM-1 (rot) nach Inkubation der entsprechenden Serumprobe mit HUVEC. Angegeben ist der Absorptionswert relativ zur Expression der HUVEC nach Stimulierung mit TNF.

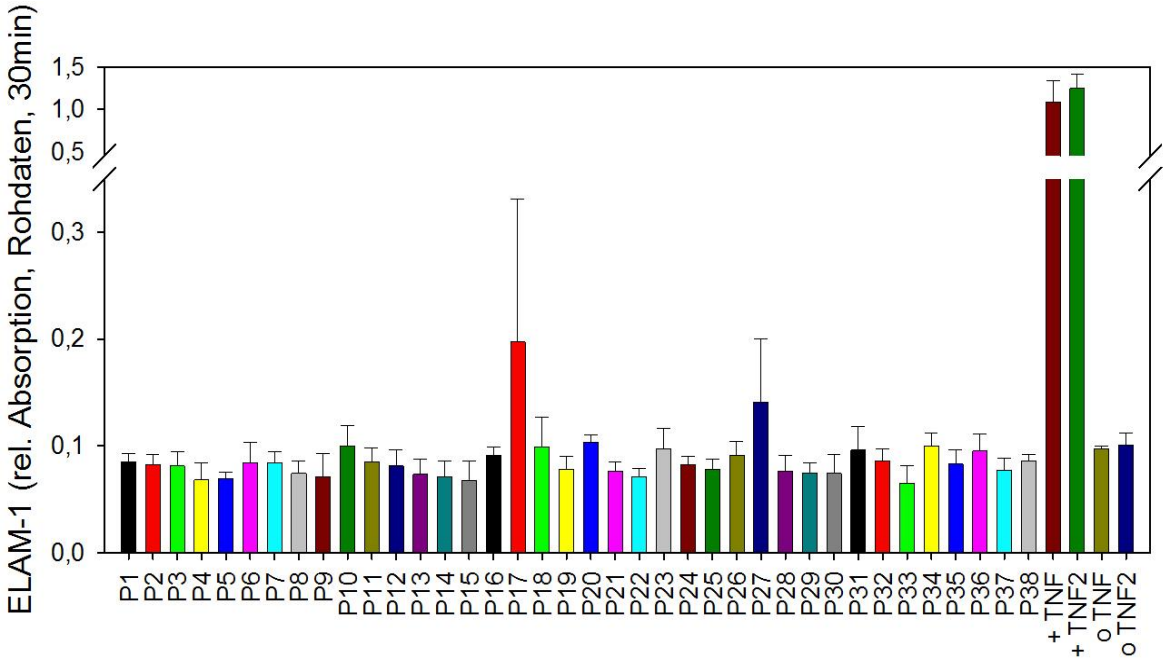

Abbildung 1 Beispiel"simple error bars". Dargestellt ist die relative Absorption von E-Selektin (ELAM) im Zell-ELISA nach Inkubation von Probandenserum (Probanden-Nummern auf der x-Achse) mit HUVEC für 4 Stunden. Als Positivkontrolle dient die Inkubation mit TNF (2 unterschiedliche Ansätze, +TNF, +TNF2); als Negativkontrolle wurden die Zellen mit Medium ohne TNF (oTNF, oTNF2, 2 unterschiedliche Ansätze) behandelt.

Statistische Analysen wurden mit der Statistikfunktion im *SigmaPlot*-Programm durchgeführt:

Chi-Quadrat-Unabhängigkeitstest

Dieser Test wurde verwendet, um die stochastische Abhängigkeit zweier Häufigkeitsverteilungen zu überprüfen. Anhand des Signifikanzniveaus ($p \leq 0,05$)wurde der statistische Zusammenhang bewertet. Der Test wurde hauptsächlich für klinische Charakteristika der Patientengruppen verwendet.

Kruskal-Wallis one-way ANOVA

Unterschiede beim Vergleich der AECA-positiven und AECA-negativen Patienten wurde mit dem Kruskal-Wallis one-way ANOVA Test durchgeführt. P-Werte $\leq 0,05$ wurden als statistisch signifikant bewertet.

3. Ergebnisse

3.1 Nachweis von AECAs bei herztransplantierten Patienten

Patientenkollektiv

Für den Nachweis von AECAs wurden 260 Blutproben von 34 herztransplantierten Patienten vor und im Verlauf des 1. Jahres nach HTX analysiert. Die primäre Indikation der Patienten (mittleres Alter 53 ± 9 Jahre, 88% Männer) für eine HTX war eine dilatative Kardiomyopathie (71%). Nach Transplantation erhielten alle Patienten (bis auf einen, der mit Sirolimus und MMF versorgt wurde) eine Dreifach-Immunsuppression bestehend aus Steroiden mit Calcineurininhibitoren (CNI) in Kombination mit MMF (65%), Azathioprin (AZA, 21%) oder Everolimus (15%). Es wurden keine signifikanten Unterschiede in den Patientencharakteristika (Vergleich: Patienten mit nachgewiesenen AECAs im Serum (AECA+ Patienten) mit denen ohne AECAs (AECA- Patienten); Tabelle 7) beobachtet.

Insgesamt 16 von 34 Patienten (47%) erlitten mindestens eine Abstoßungsreaktion innerhalb eines Jahres nach HTX. 15 dieser Patienten zeigten eine oder mehrere A1-Abstoßungsreaktionen, 9 Patienten sogar schwerwiegendere Abstoßungsreaktionen (A2 bis A3). Bei 12 von 16 Patienten (75%) wurden mehrfach Abstoßungsreaktionen dokumentiert. In allen Fällen konnten die Abstoßungsreaktionen erfolgreich behandelt werden.

Fünf Patienten (15%) starben innerhalb der ersten sechs Monate. Bei 3 Patienten wurde ein Transplantatversagen festgestellt (Einstellung der Immunsuppression, Tag 101 post-HTX, n=1; Herz-Kreislauf-Versagen bei elektromechanischer Entkopplung ohne Nachweis einer Abstoßung an Tag 71 und 140 nach HTX, n=2). Zwei Patienten starben an einer Sepsis an Tag 41 bzw. 195. Nach 5 Jahren waren noch 25 (74%) Patienten am Leben. Die mittlere Überlebenszeit betrug 6,4 ± 3,8 Jahre.

	AECA+ Patienten	AECA- Patienten	p-Wert
Alter (Jahre)	55 (50/58)	53 (48/58)	0,818
Geschlecht (Männlich/weiblich)	10 / 3	20 / 1	0,274
Gewicht (kg)	74 ± 11	73 ± 11	0,794
Ischämie (min)	200 ± 46	203 ± 48	0,864
Zugrunde liegende Erkrankung (n)			
Ischämische Kardiomyopathie (n)	4	4	
Dilatative Kardiomyopathie (n)	9	14	
Andere (n)	0	3	
Herzunterstützungssysteme	2 (1xINCOR, 1X Heartmate)	5 (4xINCOR, 1xEXCOR)	

Tabelle 7 Charakteristika des Patientenkollektivs

Nachweis von AECAs

In der Blutprobe nur eines Probanden wurden AECAs nachgewiesen (3%, Grundfrequenz der Positivproben). Die entsprechende Fluoreszenzfärbung war sehr schwach um den Zellkern lokalisiert (Daten nicht gezeigt).

Entsprechend des Nachweises von AECAs wurden die HTX-Patienten in 3 Gruppen eingeteilt:

Gruppe 1: Bei 8 von 34 HTX-Empfängern (23%) wurden positive AECA-Färbungen sowohl vor HTX, als auch nach HTX gemessen.

Gruppe 2: 5 Patienten (15%), welche keine positiven AECA-Färbungen vor HTX hatten, entwickelten zirkulierende Antikörper im Verlauf nach Transplantation.

Gruppe 3: Die verbleibenden 21 Patienten (62%) zeigten keine AECA-positiven Färbungen.

Im Mittel konnte bei mehr als der Hälfte aller Blutproben von Patienten der Gruppen 1 und 2 AECAs detektiert werden. Bei Gruppe 2 wurden die erste AECA-positiven Proben 2-4 Wochen nach HTX erfasst.

Differenzierung der Patienten mittels AECA

Aufgrund der kleinen Patientenzahl der Gruppe 2 wurde kein statistischer Vergleich der 3 Gruppen unternommen. Auffallend war, dass 67% der Patienten der Gruppe 3 keine Abstoßungsepisoden entwickelten. Bei den verbleibenden 7 Patienten dieser Gruppe zeigte sich bei 6 mindestens eine A1-Abstoßung und bei 3 Patienten A2-Abstoßungen. Damit war die Häufigkeit von Abstoßungsreaktionen in dieser Gruppe am niedrigsten mit 33%. Am häufigsten zeigten sich Abstoßungsreaktionen in Gruppe 1 (75%), die Häufigkeit bei Gruppe 2 lag bei 67%. Die Häufigkeit schwerwiegender Abstoßungsreaktionen der Kategorie A2 bis A3 lag bei Gruppen 1 und 2 bei 67%, bei Gruppe 3 bei 43%. Die Mehrheit der Patienten entwickelte mehr als eine Abstoßungsepisode im Verlauf [bei Gruppe 1 lag der Anteil bei 5 von 6 Patienten (83%), bei Gruppe 2 bei 3 von 3 (100%), bei Gruppe 3 bei 4 von 7 Patienten (57%)].

Weiterführend wurde ein Chi-Quadrat-Test durchgeführt, um die Tauglichkeit von AECA-Positivität als Biomarker für akute Abstoßungsreaktionen zu testen. Es wurden 3 Modalitäten ausgewählt und die Gruppen 1 und 2 (AECA-Positivität) mit der Gruppe 3 (AECA-Negativität) verglichen:

1) A1-Abstoßungsreaktionen (9/13 AECA-Positiv, 6/21 AECA-Negativ; p= 0,049)
2) Schwerwiegende Abstoßungsreaktionen A2 und A3 (6/13 AECA-Positiv, 3/21 AECA-Negativ; p= 0,057)
3) Multiple Abstoßungsreaktionen (8/13 AECA-Positiv, 4/21 AECA-Negativ; p= 0,025)

Außerdem zeigte sich, dass die mittlere Anzahl an A1-Abstoßungen bei AECA-positiven Patienten (2,0 ± 1,9) signifikant höher lag als bei AECA-negativen (0,6 ± 1,1) ($p \leq 0,05$). Fasst man alle dokumentierten Abstoßungen zusammen, war auch hier bei den AECA-positiven Patienten signifikant mehr Abstoßungen nachweisbar (2,9 ± 2,7) verglichen mit AECA-negativen Patienten (0,8 ± 1,1) ($p \leq 0,05$).

Gruppe (Nummer)	1	2	3
AECA+ vor HTX	Ja	Nein	Nein
AECA+ nach HTX	Ja	Ja	Nein
Patienten (n)	8	5	21
AECA+ Proben/Patient (%)	59 ± 37	50 ± 14	0 ± 0
Auftreten von Abstoßungsreaktionen			
Ja (n / %)	6 / 75	3 / 60	7 / 33
Nein (n / %)	2 / 25	2 / 40	14 / 67
Schwerwiegende Abstoßungsreaktion, A2-A3 (n / %)	4 / 50	2 / 40	3 / 14
Multiple Abstoßungsreaktionen (n / %)	5 / 63	3 / 60	4 / 19
Anzahl der akuten Abstoßungsreaktionen pro Patient	3,5 ± 3,1	1,8 ± 1,4	0,7 ± 1,3
Erste aufgetretene Abstoßungsreaktionen nach HTX (Tage)	63 ± 46	20 ± 7	96 ± 93

Tabelle 8 Vergleich AECA und Abstoßungsreaktion.

Vergleicht man die Patientencharakteristika der Patienten mit (Gruppe 1 und 2 zusammen) und ohne AECA-Nachweis (Gruppe 3), so war kein statistischer Unterschied erkennbar. Es zeigte sich lediglich ein Trend für die vermehrte Gabe von MMF in der Gruppe der AECA-negativen Patienten (AECA-positiv, 53%; AECA-negativ, 71%; p=0,067). Nach einem Jahr lag die Mortalität bei 85 % für die AECA-positive Gruppe und bei 86 % für die AECA-negative Gruppe.

In Gruppe 2 starben 2 Patienten bereits früh nach HTX (Tage 71 und 140) an Herz-Kreislauf-Versagen bei elektromechanischer Entkopplung ohne Nachweis einer Abstoßung. Diese Patienten zeigten erstmals nach 19 und 51 Tagen zum ersten Mal eine AECA-Positivität. Beim ersten Patienten wurden drei A1-Abstoßungsepisoden (Tage 20, 73, 96) diagnostiziert. Beim zweiten dagegen keine Abstoßung. In Gruppe 3 starben 3 Patienten im ersten Jahr. Ein Patient starb nach 101 Tagen aufgrund mangelnder Compliance. Bei diesem Patienten wurde lediglich eine A2-Abstoßung am Tag 9 festgestellt. Zwei Patienten wurden septisch und verstarben am Tag 197 (ohne Nachweis einer Abstoßung) bzw. Tag 67 mit einer detektierten A1-Abstoßung am Tag 28.

Die mittlere Überlebensrate lag bei 5,4 ± 3,0 bei der Gruppe 3 und 8,3 ± 4,6 Jahre bei Gruppen 1 und 2 zusammen. Der Beobachtungszeitraum war bei den Patienten der Gruppen 1 und 2 insgesamt 5 Jahre länger (HTX zwischen 1999 und 2009) als bei Gruppe 3 (HTX zwischen 2003 und 2009). Nach 3 Jahren waren 11 von 13 der AECA-positiven Patienten (85%) und 17/21 (81%) der AECA-negativen Patienten noch am Leben (kein signifikanter Unterschied).

In Abbildung 11 sind Beispiele für unterschiedliches Vorhandensein von AECAs. Pat.1 stellt ein Beispiel für AECA-positive Serumproben dar, Pat. 2 und 3 zeigen dagegen negative Serumproben.

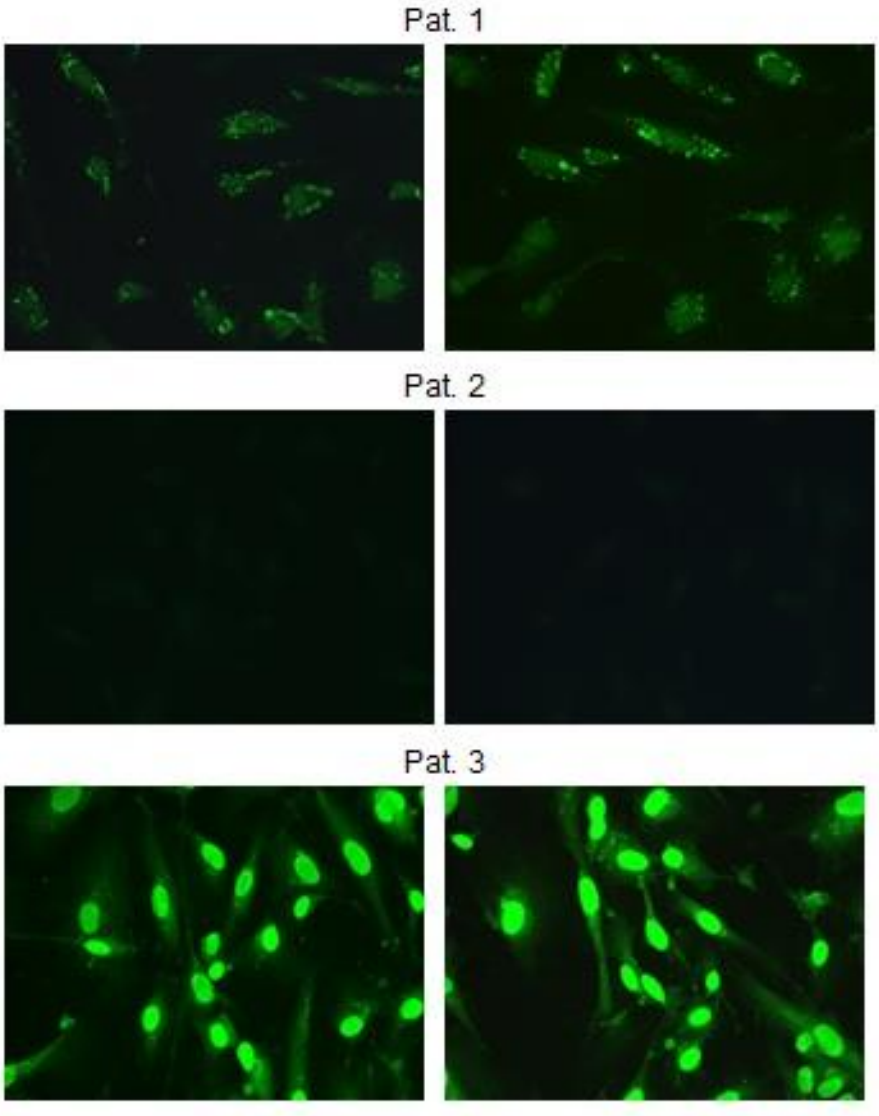

Abbildung 21 AECA-Anfärbungen von HUVEC beimpft mit Patientenseren der Verdünnung 1:10. Bei den oberen beiden Bildern (Pat.1) erkennt man eine Anfärbung des Cytoplasmas mit zusätzlich scheckigen Färbeanteilen (positive AECA-Probe). Die mittlere beiden Bilder (Pat.2) zeigen keinerlei Anfärbung. Die unteren beiden Bilder (Pat.3) zeigen ein starkes Anfärben der Zellkerne, welches als Negativ gewertet wurde.

Art der Abstoßungen	Anzahl der Abstoßungen gesamt	Anzahl der AECA-positiven Seren+Abstoßung	Prozentsatz an Abstoßungen
A0	157	47	30%
A1	30	17	57%
A2	7	0	0%
A3	5	2	40%

Tabelle 9 Anzahl der AECA-positiven Serumproben im Zusammenhang mit klinisch nachgewiesenen Abstoßungsreaktionen.

Tabelle 9 stellt gemeinsames Auftreten von AECA-positiven Serumproben mit klinisch nachgewiesenen Abstoßungsperioden dar. So zeigten sich insgesamt 157 Biopsien ohne Abstoßungsreaktion (A0), zum gleichen Zeitpunkt waren 47 Serumproben AECA-positiv. Eine A1-Abstoßung wurde bei 30 Proben nachgewiesen, hier waren 17 Serumproben AECA-positiv, was 57% entspricht. Eine A2-Abstoßung konnte in 7 Biopsaten festgestellt werden, keine Serumprobe war zu diesem Zeitpunkt AECA-positiv. A3-Abstoßungen waren insgesamt 5-mal vorhanden, bei zweien konnte auch positiv auf AECAs getestet werden.

Insgesamt hatten 11 Patienten einen CMV-positiven Organspender (Tabelle 10), 3 Patienten waren präoperativ CMV-positiv getestet worden. Die Gruppe der AECA-negativen Patienten enthält hierbei 27% CMV-positive Spender und 0% CMV-positive Empfänger. 60% der Patienten, welche nach HTX eine AECA-Positivität entwickelten, hatten einen CMV-positiven Spender, 20% waren selbst positiv auf CMV getestet worden. Die Gruppe der Patienten, welche bereits vor HTX AECA-positive Proben aufwiesen, enthielt 50% CMV-positive Spender und waren zu 25% selbst positiv auf CMV getestet worden.

	CMV-positive Spender [n (%)]	CMV-positive Empfänger [n (%)]	Patienten gesamt [n]
AECA-positive Patienten bereits vor HTX (Gruppe 1)	4 (50)	2 (25)	8
AECA-positive Patienten nach HTX (Gruppe 2)	3 (60)	1 (20)	5
AECA-negative Patienten (Gruppe 3)	4 (27)	0 (0)	15

Tabelle 10 AECA-Korrelation mit CMV-Infektionen. Bei einigen Patienten (6 aus Gruppe 3) lagen keine Daten hinsichtlich CMV-Infektion vor.

3.2 Proinflammatorische Wirkung von Serum auf humane Endothelzellen

Im Folgenden wurden 260 Serumproben von 34 herztransplantierten Patienten auf ihre proinflammatorische Wirkung auf Endothelzellen geprüft. Wie unter Methodik beschrieben, wurden auf jeder 96-well-Mikrotiterplatte jeweils Positiv- bzw. Negativkontrollen mitgeführt. Positivkontrolle entsprachen HUVEC, die mit TNF stimuliert wurden (E-Selektin, 4 Stunden; VCAM-1 und ICAM-1, 24 Stunden). Negativkontrollen entsprachen HUVEC, die mit normalem Kulturmedium inkubiert wurden (gleiche Inkubationszeiten). Die Absorptionswerte der Proben wurden um den Wert der Negativkontrolle korrigiert und relativ zur Positivkontrolle (%TNF) angegeben.

3.2.1. E-Selektin

Die Messungen für die 38 Probandenproben sind in Abb. 12 dargestellt. Nur die Probe von Proband #17 zeigte eine Zunahme der Expression von E-Selektin. Der Absorptionswert entsprach 9 ± 17% der TNF-Kontrolle und lag damit über dem Schwellenwert für E-Selektin (= 3,6 %TNF; Ermittlung der Schwellenwerte siehe Kapitel 2.3.4).

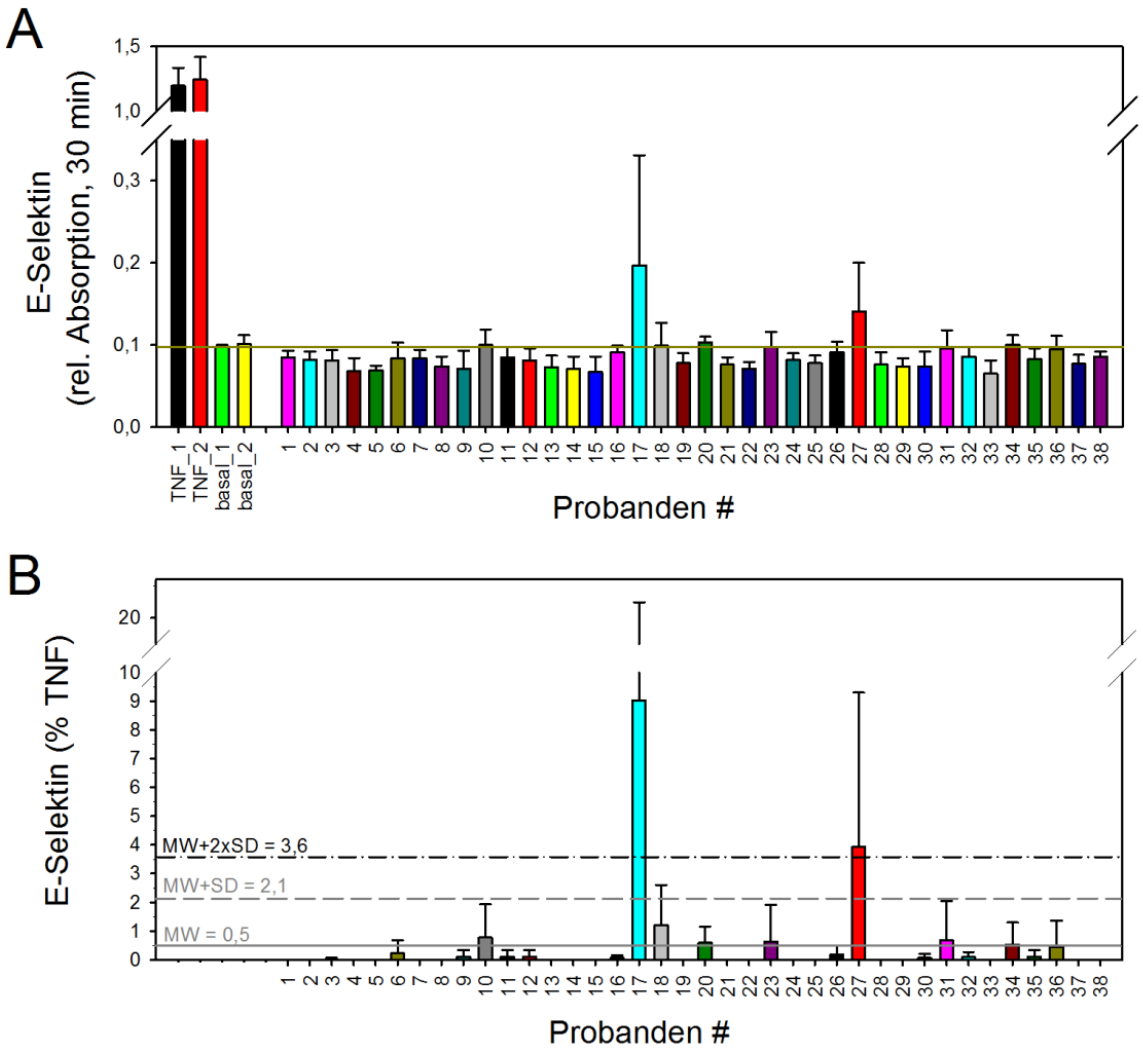

Abbildung 12 Wirkung von Probandenserum auf die Expression von E-Selektin von HUVEC. Serum von 38 Probanden (30%ig) wurde für 4 Stunden mit vitalen HUVEC inkubiert und die Expression von E-Selektin im Zell-ELISA bestimmt. (A) Die Absorption der Negativkontrollen (Doppelansatz, basal_1 und _2) wurde gemittelt (grüne Linie). Die Werte der Proben liegen bis auf 2 Probandenproben unterhalb oder gleich der Negativkontrolle. (B) Nach Normierung auf die Positivkontrolle (TNF-stimulierte HUVEC, TNF_1 und _2, Doppelansatz) wurden der Mittelwert (MW) und die Standardabweichung (SD) aus den 38 Probandenwerten ermittelt. Als Schwellenwert für die Patientenproben wurde 3,6 %TNF (entspricht MW + 2xSD) ermittelt.

Aufgrund begrenzter Probenmenge wurde nur von 19 Patienten (56%) die Expression von E-Selektin untersucht. Die Mehrzahl der Serumproben dieser Patienten hatte keinen Effekt auf die Expression von E-Selektin. D. h. bei 99 von 118 (84%) untersuchten Serumproben (von 19 Patienten) lag der Absorptionswert für E-Selektin im Bereich der Negativkontrolle und war nach Korrektur gleich Null. Lediglich 19 Proben waren überhaupt positiv. Die Absorptionswerte lagen zwischen 0,07 und 3,08 %TNF und damit unter dem Schwellenwert von 3,6 %TNF. Die Verteilung der positiven Proben war uneinheitlich. So wurden bei 10 von 19 Patienten (53%) positive Werte festgestellt. Pro Patient waren zwischen 13 und 80 % der vorhandenen Proben positiv. Die positiven Werte wurden zwischen Tag 19 und 373 nach HTX gemessen, wobei keine eindeutige Zuordnung zu frühen oder späten Zeitpunkten festgestellt wurde.

Für E-Selektin wurde keine Korrelation zu diagnostizierten Abstoßungsreaktionen durchgeführt.

3.2.2. VCAM-1

Die Messungen für die 38 Probandenproben sind in Abb. 15 dargestellt. Die Inkubation der Probandenproben mit HUVEC führte für 6 Proben (# 16, 17, 18, 20, 24, 27) zu einer erhöhten Expression von VCAM-1 verglichen mit der basalen Expression. Die anderen Proben entsprachen der Expression der Negativkontrolle (basal_1 und _2) oder lagen darunter (Abb. 13 A). Nach Normierung auf die Positivkontrolle (%TNF) wurde für VCAM-1 ein Schwellenwert von 4,6%TNF ermittelt (Abb. 13 B). Nach Normierung lag der ICAM-1-Wert für die Proben der Probanden #16, 18 und 27 über dem Schwellenwert.

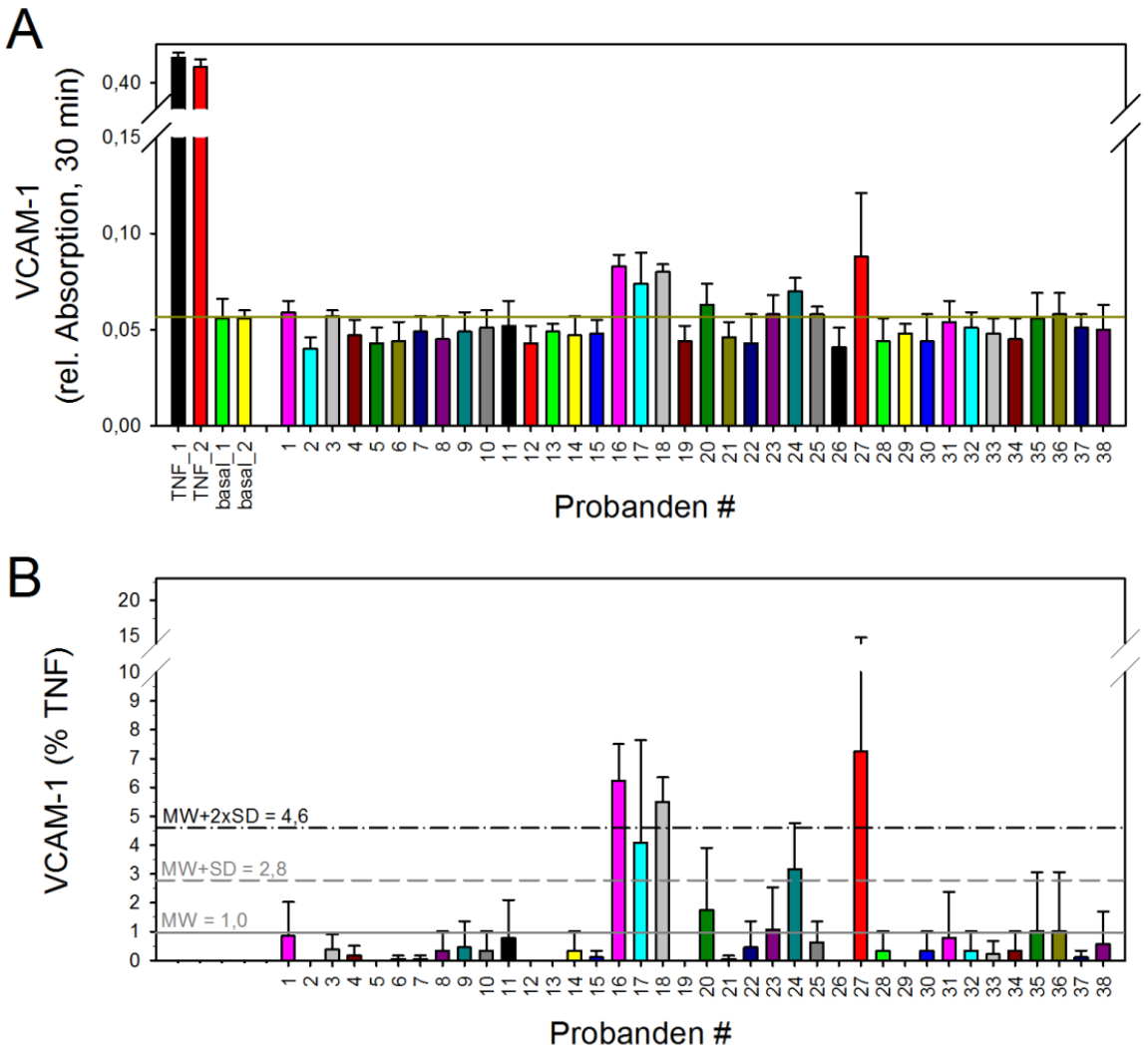

Abbildung 3 Wirkung von Probandenserum auf die Expression von VCAM-1 von HUVEC. Serum von 38 Probanden (30%ig) wurde für 16 Stunden mit vitalen HUVEC inkubiert und die Expression von VCAM-1 im Zell-ELISA bestimmt. (A) Die Absorption der Negativkontrollen (Doppelansatz, basal_1 und _2) wurde gemittelt (grüne Linie). Die Werte der Proben liegen bis auf 6 Probandenproben unterhalb oder gleich der Negativkontrolle. (B) Nach Normierung auf die Positivkontrolle (TNF-stimulierte HUVEC, TNF_1 und _2, Doppelansatz) wurden der Mittelwert (MW) und die Standardabweichung (SD) aus den 38 Probandenwerten ermittelt. Als Schwellenwert für die Patientenproben wurde 4,6 %TNF (entspricht MW + 2xSD) ermittelt.

Die Inkubation von HUVEC mit Patientenserum führte zu nachweisbarer VCAM-1-Expression. 90 der 260 untersuchten Proben (35 %) verursachten keine VCAM-1-Expression. Die verbleibenden 170 Proben (65 %) waren positiv. Die Werte lagen zwischen 0,1 und 11,9 %TNF. Jedoch lagen nur 14 Proben (von 7 Patienten) oberhalb des Schwellenwertes von 4,6 %TNF. Bei diesen 7 Patienten wurde im Verlauf nach HTX vereinzelt eine erhöhte Expression von VCAM-1 nachgewiesen (Abb. 14). Die Verteilung über die Zeit war uneinheitlich. Lediglich bei Patient 5 und 7 war über die Zeit ein Anstieg der aktivierenden Wirkung der Patientenproben erkennbar, wobei nur jeweils die letzten Proben oberhalb des Schwellenwertes lagen. Bei Patient 3 war ein signifikant erhöhter Wert von 11,9 %TNF am Tag 71 post-HTX nachweisbar, der allerdings nicht mit einer Abstoßungsreaktion einherging. Dieser Patient hatte am Tag 23 nach HTX eine A1-Abstoßung und in der Folge keine weitere Episode. Bei keinem dieser Patienten war eine Übereinstimmung zwischen einer Abstoßungsreaktion und einer erhöhten VCAM-1-Expression nachweisbar.

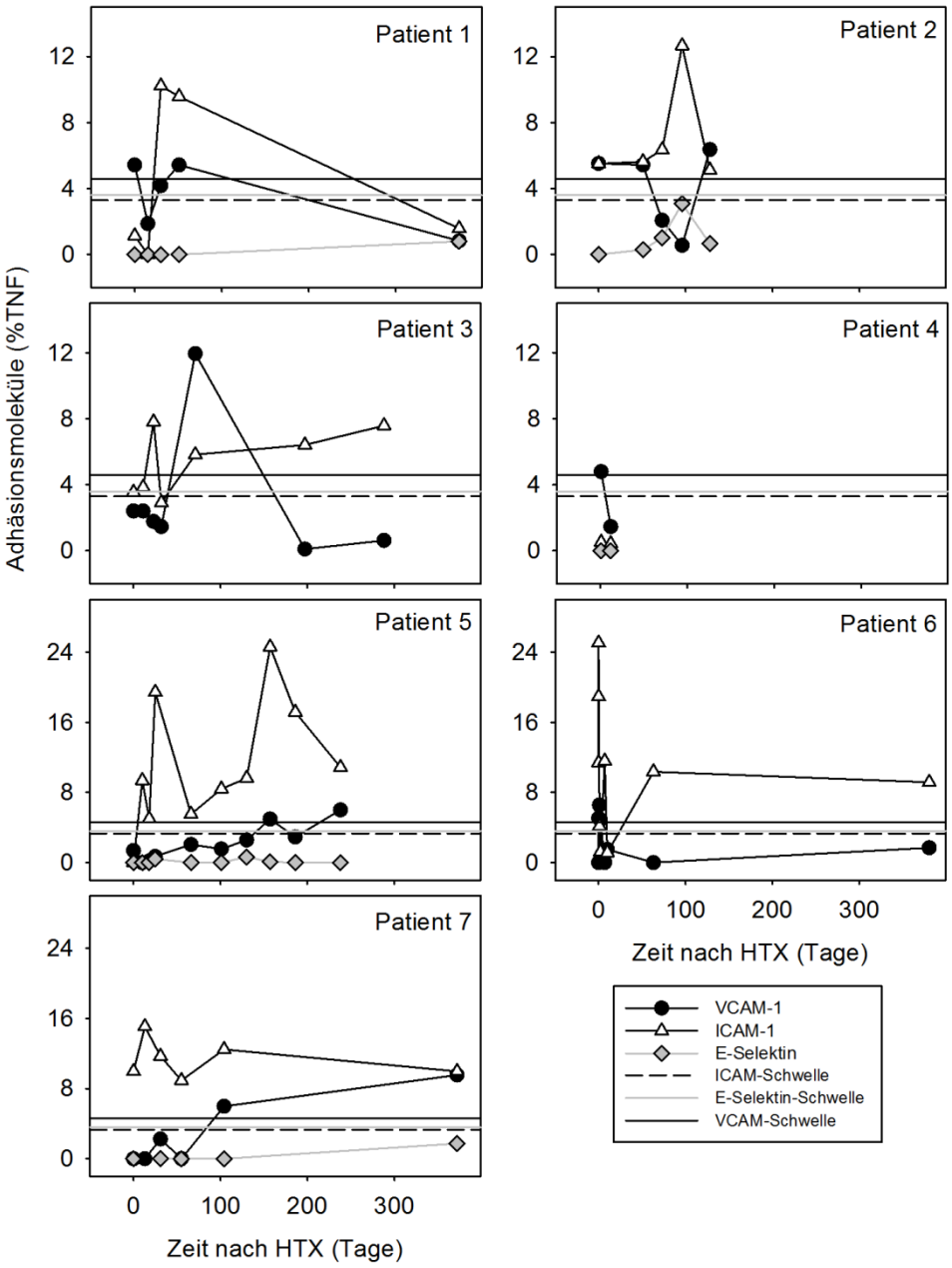

Abbildung 44 Wirkung von Patientenserum auf die Expression von VCAM-1 von HUVEC. Serum von Herztransplantierten (30%ig) wurde mit HUVEC inkubiert und die Expression von VCAM-1 (schwarze Kreise), ICAM-1 (weiße Dreiecke) und E-Selektin (graue Rauten) im Zell-ELISA bestimmt. Dargestellt sind die Patienten, bei denen erhöhte (über dem Schwellenwert von VCAM-1, schwarze durchgezogene Linie) Werte von VCAM-1 im Verlauf des 1. Jahres nach HTX (Herztransplantation) gemessen wurde. Die schwarze gestrichelte Linie zeigt den Schwellenwert von ICAM-1, die graue Linie den Schwellenwert von E-Selektin.

Unter Einbeziehung aller gemessenen VCAM-1-Werte wurde ein Vergleich mit dem Zeitpunkt nach HTX (Abb. 15 A) bzw. mit dem diagnostizierten Abstoßungsgrad (Abb. 15 B) untersucht. Weder in der Frühphase nach HTX, noch nach einem Jahr war eine vermehrte Wirkung auf die VCAM-1-Expression nachweisbar. Das gleiche gilt für die Korrelation mit dem Grad der Abstoßungsreaktion. Sogar die Proben, die zum Zeitpunkt einer bestätigten A2-A3-Abstoßungsreaktion genommen wurden, bewirkten keine Zunahme der Expression von VCAM-1 auf HUVEC.

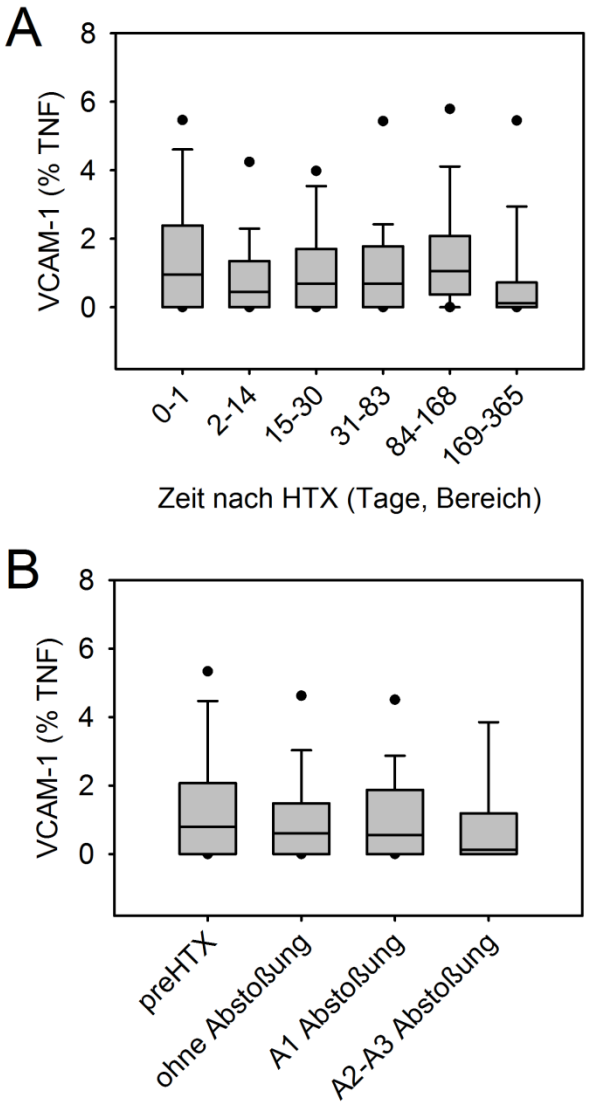

Abbildung 55 Wirkung von Patientenserum auf die Expression von VCAM-1 von HUVEC in Abhängigkeit vom Zeitpunkt der Probennahme nach Herztransplantation (HTX) (A) bzw. in Bezug auf den Grad der Abstoßung (B). Die Boxplots zeigen den Median (mittlere Linie), die 25/75 Perzentilen (Ränder des Boxplots) und die 5/95 Perzentilen (Fehlerbalken). Die Punkte stellen maximale Ausreißer dar.

3.2.3. ICAM-1

Die Ergebnisse für die 38 Probandenproben sind in Abb. 16 dargestellt. Die Inkubation der Probandenproben mit HUVEC führte für 1 Probe (#17) zu einer erhöhten Expression von ICAM-1 verglichen mit der basalen Expression. Jedoch mit einer hohen Standardabweichung bei einer 4fach-Bestimmung. Die anderen Proben entsprachen der Expression der Negativkontrolle (basal_1 und _2) oder lagen darunter (Abb. 16 A). Nach Normierung auf die Positivkontrolle (%TNF) wurde für ICAM-1 ein Schwellenwert von 3,3 %TNF ermittelt (Abb. 16 B). Nach Normierung lag der ICAM-1-Wert für die Probe des Probanden #17 bei 7,9 ± 9,5 %TNF und damit über dem Schwellenwert.

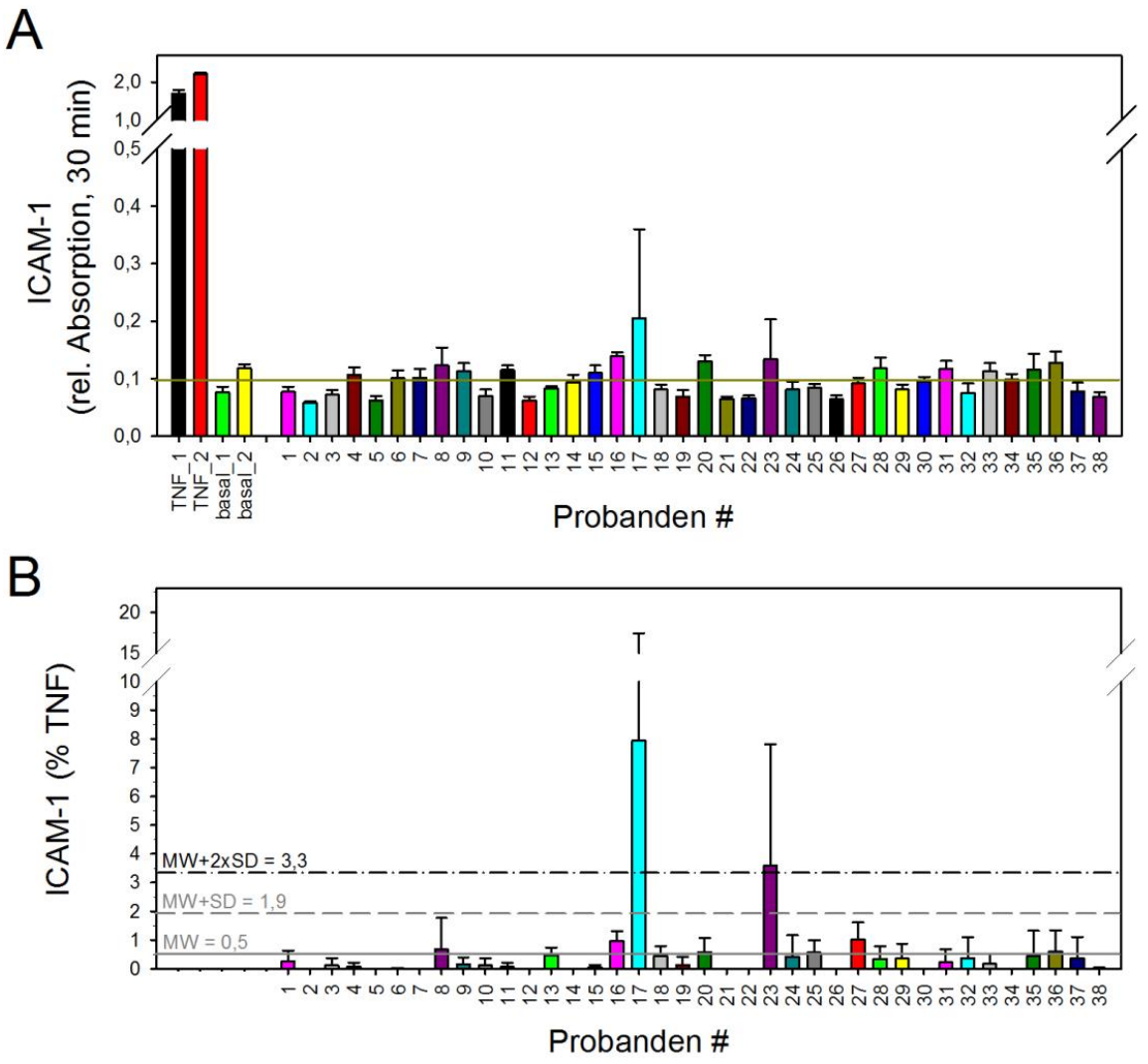

Abbildung 66 Wirkung von Probandenserum auf die Expression von ICAM-1 von HUVEC. Serum von 38 Probanden (30%ig) wurde für 16 Stunden mit vitalen HUVEC inkubiert und die Expression von ICAM-1 im Zell-ELISA bestimmt. (A) Die Absorption der Negativkontrollen (Doppelansatz, basal_1 und _2) wurde gemittelt (grüne Linie). Die Werte der Proben liegen bis auf 1 Probandenprobe unterhalb oder gleich der Negativkontrolle. (B) Nach Normierung auf die Positivkontrolle (TNF-stimulierte HUVEC, TNF_1 und _2, Doppelansatz) wurden der Mittelwert (MW) und die Standardabweichung (SD) aus den 38 Probandenwerten ermittelt. Als Schwellenwert für die Patientenproben wurde 3,3 %TNF (entspricht MW + 2xSD) ermittelt.

Vergleicht man die Expressionsmuster für die 3 Adhäsionsmoleküle, so war auffallend, dass die Probe des Probanden #17 zu einer erhöhten Expression von E-Selektin und ICAM-1 (über dem Schwellenwert) führte. Weitere Übereinstimmungen konnten nicht gezeigt werden.

Die Inkubation von HUVEC mit Patientenserum führte bei 187 von 260 Patientenproben (72 %) zu einer Überschreitung des Schwellenwerts von ICAM-1. Bei insgesamt 3 Patienten wurden keinerlei positive ICAM-Messwerte ermittelt, bei den verbleibenden 31 Patienten lag die mittlere Frequenz für positive Proben bei 76 ± 21 % (Probenanzahl gesamt: Mittel bei 8 ± 4, zwischen 3 und 17 Proben pro Patient). Über die Zeit nach HTX scheint die mittlere Expression von ICAM-1 anzusteigen (Abb. 17A). Nimmt man alle Werte zusammen, so gibt es keinen Zusammenhang zwischen dem Grad der Abstoßung und der Aktivierung der Zellen (Abb. 17B).

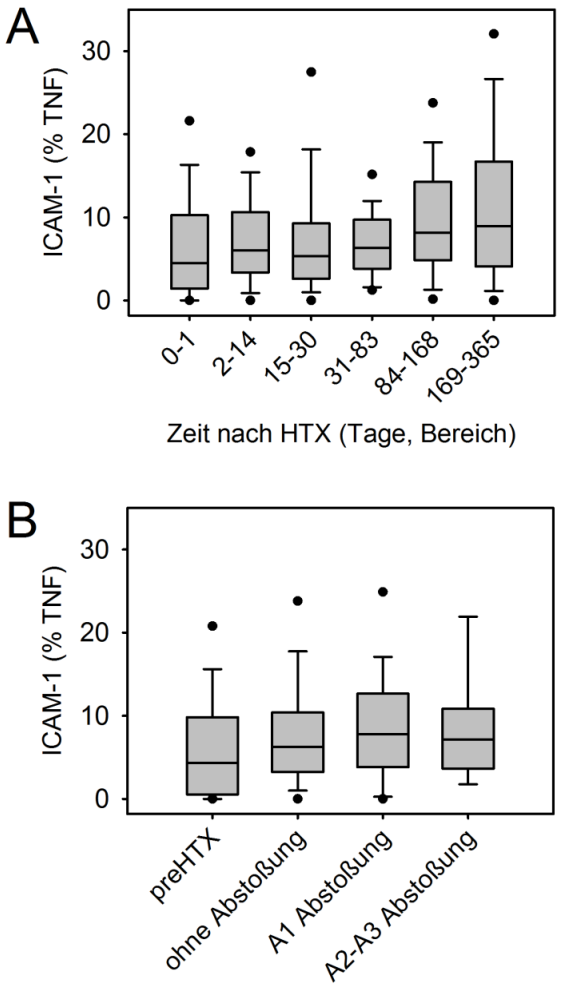

Abbildung 77 Wirkung von Patientenserum auf die Expression von ICAM-1 von HUVEC in Abhängigkeit vom Zeitpunkt der Probennahme nach Herztransplantation (HTX) (A) bzw. in Bezug auf den Grad der Abstoßung (B). Dargestellt sind die Werte von 31 Patienten mit positiven Werten für ICAM-1. Es deutet sich eine Zunahme der Expression von ICAM-1 über die Zeit an (A), während der Grad der Abstoßung offensichtlich keinen Effekt auf die Aktivierung der Zellen hatte (B). Die Boxplots zeigen den Median (mittlere Linie), die 25/75 Perzentilen (Ränder des Boxplots) und die 5/95 Perzentilen (Fehlerbalken). Die Punkte stellen maximale Ausreißer dar.

Vergleicht man den Zeitverlauf nach HTX, so lassen sich 5 Patientengruppen nach Expressionsmuster unterscheiden:

1. Im Verlauf nach HTX wurden bei 3 Patienten keine positiven Proben für ICAM-1 festgestellt (Probenanzahl gesamt: 2 und 5). Einer dieser Patienten verstarb 53 Tage nach HTX, die anderen beiden Patienten überlebten den Beobachtungszeitraum. Bei einem der Patienten waren zunächst zwei A1-Abstoßungen festgestellt worden, im weiteren Verlauf waren jedoch sämtliche Biopsien der überlebenden zwei Patienten A0.

2. Bei 2 Patienten blieb die aktivierende Wirkung der postoperativen Proben im 1. Jahr nach HTX unverändert und lag im Mittel bei 4,4 ± 2,2 %TNF (Bereich zwischen 1,4 und 7,8 %TNF) und lag nur knapp über dem Schwellenwert.

3. Bei 11 Patienten wurde ein Anstieg der aktivierenden Wirkung über die Zeit nach HTX beobachtet (Abb. 18 A). Davon zeigten 3 Patienten zusätzlich noch Spitzenwerte in der frühen Phase (Tag 19, 25, 45) und nach 3-6 Monaten (Tag 147, 157, 101) (Abb. 21). Die Serumproben dieser 11 Patienten hatten keine stimulierende Wirkung für VCAM-1 (Abb. 18 B).

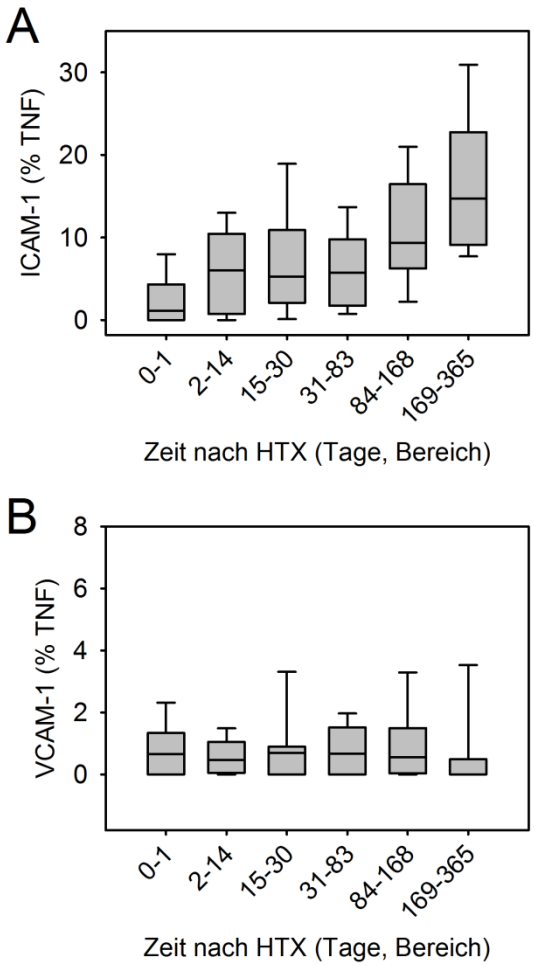

Abbildung 18 Wirkung von Patientenserum auf die Expression von ICAM-1 (A) und VCAM-1 (B) von HUVEC in Abhängigkeit vom Zeitpunkt der Probennahme nach Herztransplantation (HTX). Dargestellt ist der Zeitverlauf nach HTX von 11 Patienten, die einen Anstieg der ICAM-1-Werte über 1 Jahr zeigten. Parallel war keine Wirkung auf die VCAM-1-Expression nachweisbar. Die Boxplots zeigen den Median (mittlere Linie), die 25/75 Perzentilen (Ränder des Boxplots) und die 5/95 Perzentilen (Fehlerbalken).

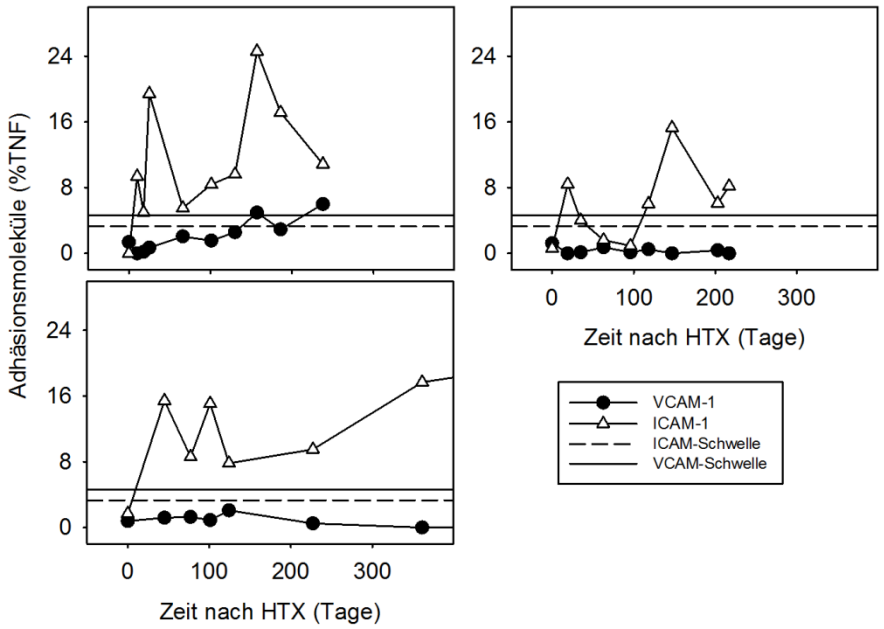

Abbildung 19 Wirkung von Patientenserum auf die Expression von ICAM-1 von HUVEC in Abhängigkeit vom Zeitpunkt der Probennahme nach Herztransplantation (HTX). Dargestellt ist der Zeitverlauf nach HTX von 3 Patienten, die einen Anstieg der ICAM-1-Werte über 1 Jahr zeigten. Zusätzlich waren Spitzenwerte in den ersten 6 Monaten nachweisbar. Die VCAM-1-Expression war unwesentlich.

4. 7 Patienten zeigten bereits in der präoperativen Probe eine aktivierende Wirkung (Abb. 20). Bei 6 von 7 Patienten traten zusätzlich noch Spitzenwerte im Verlauf nach HTX, wobei bei 3 Patienten die Spitzenwerte früh nach HTX beobachtet wurden (Tag 7, 14) und bei 3 Patienten nach >90 Tagen (Tag 94-343). Bei einem Patienten war nur der Ausgangswert hoch, im Anschluss wurde keine weitere positive Probe ermittelt. In Abb. 21 sind die Zeitverläufe der 7 Patienten als Boxplots dargestellt. Der präoperative Wert war signifikant erhöht.

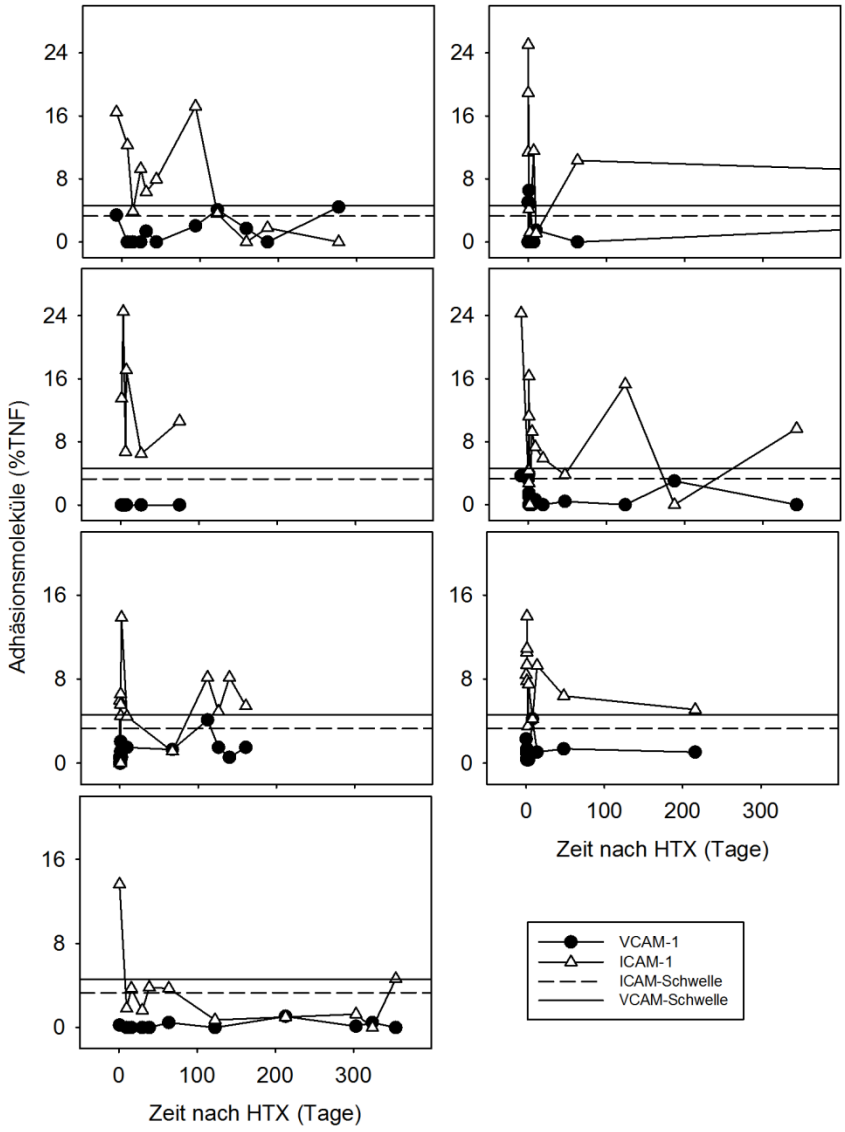

Abbildung 80 Wirkung von Patientenserum auf die Expression von ICAM-1 von HUVEC in Abhängigkeit vom Zeitpunkt der Probennahme nach Herztransplantation (HTX). Dargestellt ist der Zeitverlauf nach HTX von 7 Patienten, die präoperativ eine positive Probe für ICAM-1 aufwiesen. Zusätzlich waren Spitzenwerte in den ersten 6 Monaten nachweisbar. Die VCAM-1-Expression war unwesentlich.

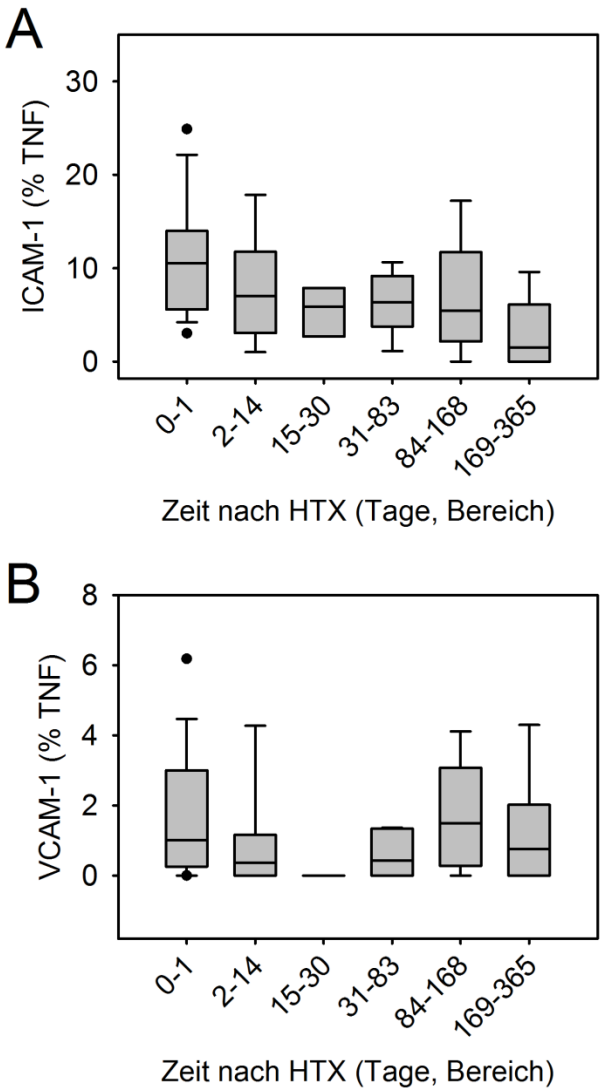

Abbildung 91 Wirkung von Patientenserum auf die Expression von ICAM-1 (A) und VCAM-1 (B) von HUVEC in Abhängigkeit vom Zeitpunkt der Probennahme nach Herztransplantation (HTX). Dargestellt ist der Zeitverlauf nach HTX von 7 Patienten, die präoperativ hohe ICAM-1-Werte zeigten und im Verlauf immer wieder Spitzenwerte für ICAM-1 aufwiesen. Es war keine Wirkung auf die VCAM-1-Expression nachweisbar. Die Boxplots zeigen den Median (mittlere Linie), die 25/75 Perzentilen (Ränder des Boxplots) und die 5/95 Perzentilen (Fehlerbalken).

5. Bei den verbleibenden 11 Patienten traten im Verlauf nach HTX immer wieder Spitzenwerte auf, ohne Tendenz einer Zu- oder Abnahme über die Zeit (Abb. 22). Bei einem Patienten wurde lediglich in der Spätphase nach HTX (Tag 308) ein Spitzenwert gemessen, bei allen übrigen Patienten (n=10) wurden insbesondere in den ersten 3 Monaten Spitzenwerte bestimmt. Abb. 23A zeigt die Zusammenfassung der ICAM-1-Werte dieser Patientengruppe in Abhängigkeit vom Zeitpunkt der Probennahme nach HTX. Weder präoperativ noch im Verlauf nach HTX war ein signifikanter Anstieg nachweisbar. Die Expression von VCAM-1 war in dieser Gruppe nur vereinzelt erhöht (Abb.23B).

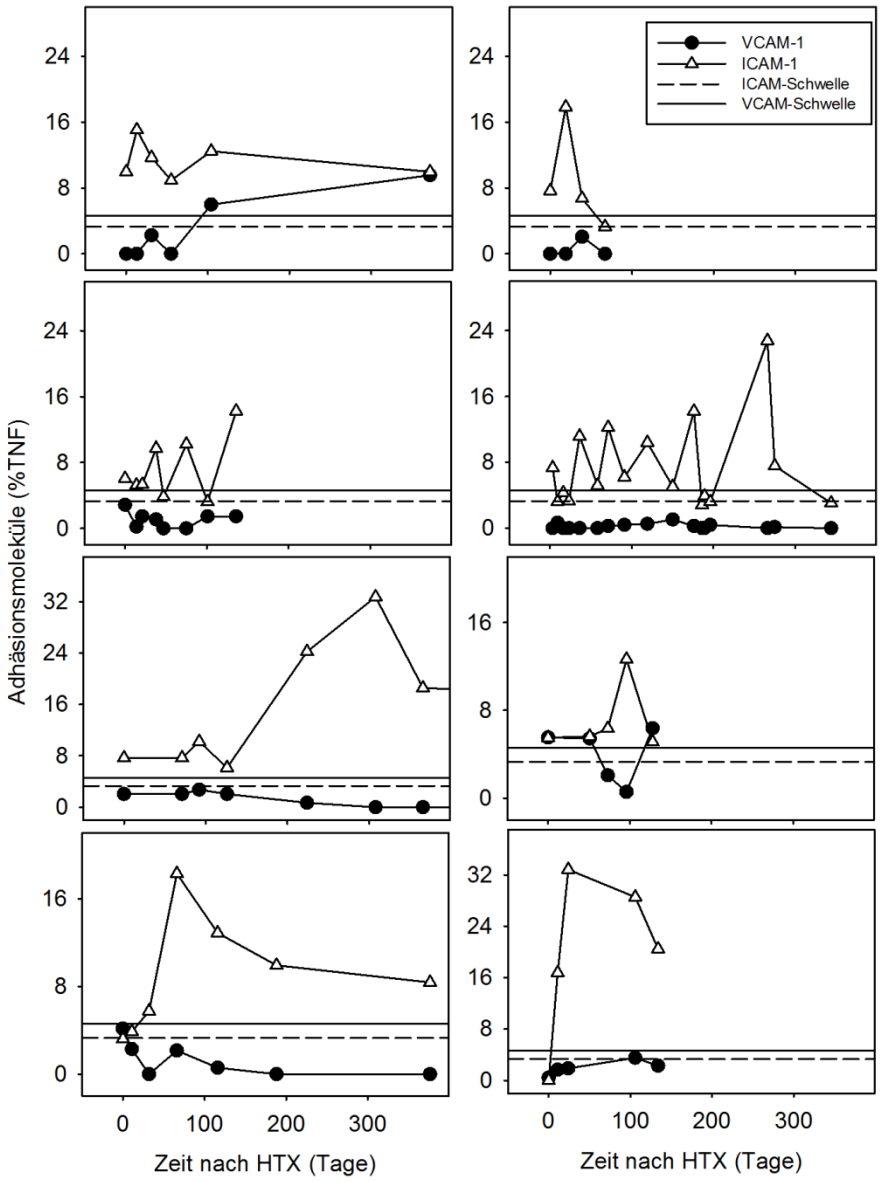

Abbildung 102 Wirkung von Patientenserum auf die Expression von ICAM-1 von HUVEC in Abhängigkeit vom Zeitpunkt der Probennahme nach Herztransplantation (HTX). Dargestellt ist der Zeitverlauf nach HTX von 8/11 Patienten, die postoperativ immer wieder Spitzenwerte für ICAM-1 aufwiesen. Die VCAM-1-Expression war unwesentlich.

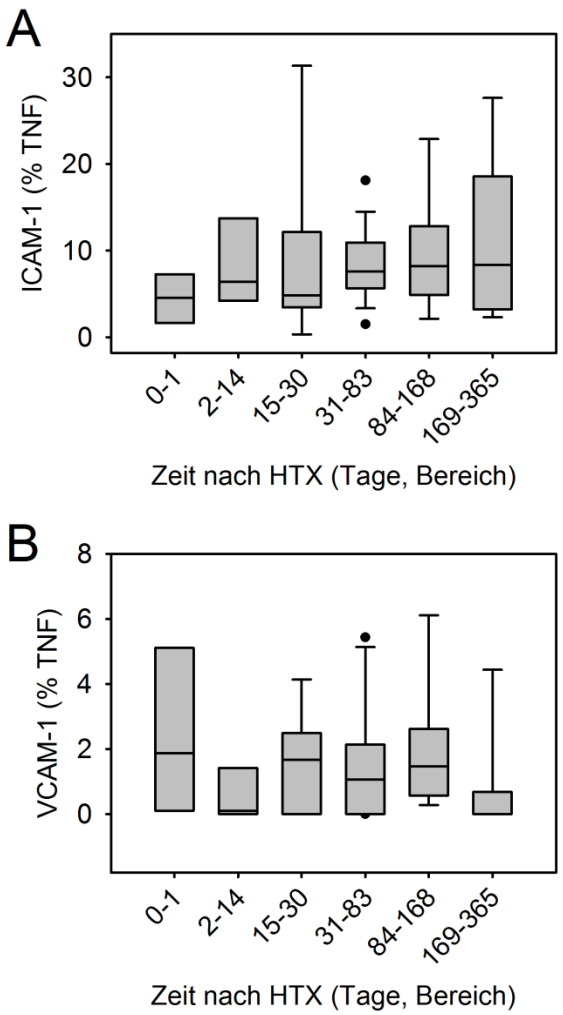

Abbildung 113 Wirkung von Patientenserum auf die Expression von ICAM-1 (A) und VCAM-1 (B) von HUVEC in Abhängigkeit vom Zeitpunkt der Probennahme nach Herztransplantation (HTX). Dargestellt ist der Zeitverlauf nach HTX von 11 Patienten, die im Verlauf immer wieder Spitzenwerte für ICAM-1 aufwiesen, jedoch ohne Zu- oder Abnahme über die Zeit. Es war keine Wirkung auf die VCAM-1-Expression nachweisbar. Die Boxplots zeigen den Median (mittlere Linie), die 25/75 Perzentilen (Ränder des Boxplots) und die 5/95 Perzentilen (Fehlerbalken).

Bei den unterschiedlichen Gruppen der ICAM-1-Expression zeigt sich eine Mortalität der Patienten zwischen 9,1% und 50%. Die Anzahl der Patienten in den verschiedenen Gruppen liegt zwischen zwei Patienten und 11.

ICAM-1-Expression	Mortalität [%]
Keine Expression (Gruppe 1)	33
Stabile Expression (Gruppe 2)	50
Anstieg (Gruppe 3)	9,1
Hohe Ausgangsexpression (Gruppe 4)	14,3
Expressionspitzen (Gruppe 5)	18,2

Tabelle 11: Mortalität nach Expressionsmuster ICAM-1

Die Patienten der Studie haben eine heterogene Immunsuppression erhalten. 31 von 34 erhielten eine Induktionstherapie mit ATG. 2 von 3 Patienten die keine Induktionstherapie erhielten zeigten im Verlauf histologisch gesicherte Abstoßungsreaktionen, ein Patient zeigte keinerlei Abstoßungsreaktionen. Den Beobachtungszeitraum überlebten alle 3 Patienten. Insgesamt zeigten die Patienten 80% positive ICAM-Werte (24/30). 2 von 3 Patienten zeigten oszillierende ICAM-1-Expressionen, der dritte Patient zeigte ansteigende Expressionen. Tabelle 12 stellt die Verteilung der Immunosuppression übersichtlich dar in absoluten Zahlen.

Immunsosuppression	ATG	Tacrolimus	Azathioprin	Mycophenolat-Motefil	Cyclosporin A	Everolimus	Sirolimus
ICAM-Anstieg	10	7	6	4	5	3	1
ICAM-Abstieg	6	4	2	6	3	2	1
ICAM-oszillierende Werte	10	1	0	8	9	4	0
ICAM negativ	3	1	1	2	2	1	0
ICAM stabil	2	2	2	2	0	1	0
Gesamt	31	15	11	22	19	11	2

Tabelle 12 Verteilung der Immunosuppression nach ICAM-Expressionsmuster

3.3 Vergleich der Oberflächenmolekülexpressionen untereinander

Im Vergleich der Expression der Oberflächenmoleküle E-Selektin, VCAM-1 und ICAM-1 untereinander konnte kein Zusammenhang zwischen der Expression von ICAM-1 und den anderen Oberflächenmolekülen VCAM-1 und E-Selektin festgestellt werden. Es lag häufig bei E-Selektin- (63,6%) und VCAM-1-positiven (84,3%) Serumproben auch eine ICAM-1-Positivität vor.

ICAM-1 + E-Selektin positiv	E-Selektin positiv	Anteil ICAM-1 und E-Selektin-positiver Proben
7	11	63,6%
ICAM-1 + VCAM-1 positiv	VCAM-1 positiv	Anteil ICAM-1 und VCAM-1-positiver Proben
11	13	84,6%
VCAM-1 + E-Selektin positiv	E-Selektin positiv	Anteil VCAM-1 und E-Selektin-positiver Proben
0	11	0%

Tabelle 13 Vergleich der Expression von Oberflächenmolekülen untereinander. Die Werte stellen jeweils die Anzahl von Schwellenwertüberschreitungen dar.

3.4 Vergleich der Expression von Oberflächenmolekülen und Antiendothelzellantikörpern

Eine Korrelation zwischen AECA-positiven Serumproben und erhöhter Expression von Oberflächenmolekülen konnte nicht gefunden werden. Es zeigte sich nur in Einzelfällen bei Serumproben mit zeitgleich gesteigerter Expression der Oberflächenmoleküle auch eine AECA-Positivität.

	AECA pos. + Oberflächenmolekül pos.	Oberflächenmolekül pos. insgesamt	Anteil AECA pos. und Oberflächenmolekül pos.
E-Selektin	1	11	9,1%
VCAM-1	2	13	15,4%
ICAM-1	42	196	21,4

Tabelle 14 AECA-positive Serumproben und gesteigerte Expression von Oberflächenmolekülen im Vergleich.

4. Diskussion

Die vorliegende Studie untersuchte verschiedene Methoden, um eine Abstoßungsreaktion nach Herztransplantation mittels serologischer Diagnostik nachzuweisen. Ein Bereich der Studie umfasste den Nachweis von Anti-Endothelzell-Antikörper (AECAs) in Serumproben herztransplantierter Patienten. Ein weiterer Bereich verfolgte die aktivierende Wirkung von Serumbestandteilen auf Endothelzellen (Expression von Adhäsionsmolekülen; E-Selektin, VCAM-1 und ICAM-1).

Mit einem einfachen nicht-invasiven Test konnte gezeigt werden, dass die Existenz von AECAs mit dem Auftreten von Abstoßungsreaktionen einhergeht. Insbesondere wird das Auftreten multipler Abstoßungsreaktionen durch AECAs angezeigt.

Weiterhin konnte eine aktivierende Wirkung von im Serum enthaltenen Faktoren auf humane Endothelzellen nachgewiesen werden (insbesondere die Expression von ICAM-1). Jedoch war keine Korrelation mit dem Auftreten von Abstoßungsreaktionen zu sehen.

4.1 Methodendiskussion

Seit der ersten Isolierung durch Jaffe et al (1973) werden HUVEC standardmäßig für die Erforschung von isolierten Reaktionen am Endothel eingesetzt (Bevilacqua et al., 1989; De Nigris et al., 2015; Jaffe et al., 1973; Jin et al., 2015; Lim To et al., 2015; Luo et al., 2015; Yang et al., 2015; Zhao et al., 2015). Aufgrund der leichten Zugänglichkeit für diese Zellen (leichte Präparation, gute Ausbeuten, hohe Reinheit bei wenig Aufwand) und der nachgewiesenen endothelialen Funktionen und Morphologie (Bevilacqua, 1993; Jaffe et al., 1973) wurden in der vorliegenden Arbeit HUVEC einmal als antigen-präsentierende Zelle benutzt, um AECAs nachzuweisen, und zum anderen wurde die Expression von Adhäsionsmolekülen auf Endothelzellen (Bevilacqua, 1993) genutzt, um die proinflammatorische Wirkung von Patientenseren auf Endothelzellen darzustellen. Diese Methoden wurden bereits für ähnliche Fragestellungen verwendet (Palomo et al., 2009; Połubińska et al., 2013).

Ein Problem, nämlich die begrenzte Kultivierbarkeit der Zellen bei gleichzeitiger Aufrechterhaltung des endothelialen Charakters der Zellen wurde bereits von Jaffe et al (Jaffe et al., 1973) beschrieben und wurde auch in der vorliegenden Arbeit berücksichtigt. Weiterhin war zu bedenken, dass beispielsweise die Fähigkeit zur Expression von Adhäsionsmolekülen bei HUVEC mit zunehmender Passagierung signifikant abnimmt (Klein et al., 1995). Außerdem verändert sich die Reagibilität hinsichtlich der Exposition von TNF-α (Shi et al., 2004). Damit wird eine Vergleichbarkeit der Ergebnisse schwierig. Für die vorliegende Arbeit wurde daher auf eingefrorene Kulturen in niedriger Ausgangspassage zurückgegriffen. Für eine Fragestellung wurden i. d. Regel Sekundärkulturen einer Ausgangskultur verwendet und diese wurden nur bis Passage 4 im Versuch eingesetzt. Darüber hinaus wurde immer die Reagibilität der Zellen überprüft – und zwar durch die Mitführung einer Positiv- und einer Negativkontrolle. Es wurde außerdem darauf geachtet, dass die Vorkulturen ein optimales Wachstum zeigten. Zeigte sich bei der Kultivierung ein unbefriedigendes Wachstum oder eine Kontamination durch Fibroblasten wurde die Zellreihe verworfen. Damit konnten Artefakte ausgeschlossen werden. Nicht berücksichtigt wurde die bekannte Heterogenität der Endothelzellen – verschiedene Arbeitsgruppen benutzen nach Möglichkeit Endothelzellen, deren Herkunft der

Fragestellung nahekommt. So wurde in einer früheren Arbeit z. B. die heterogene Wirkung von Immunsuppressiva auf verschiedene mikro- und makrovaskuläre Endothelzellen untersucht (Lehle et al., 2008).

Der Nachweis von AECAs gestaltete sich anfangs als schwierig, da nicht alle zur Verfügung stehenden HUVEC-Kulturen eine positive Reaktion für AECAs zeigten. Vor dem eigentlichen Versuch mit dem Patientenserum wurden 10 verschiedene HUVEC-Kulturen mit dem Positivserum aus dem Euroimmun-Testkit koinkubiert. Nur 3 Kulturen zeigten in der Immunfluoreszenz schließlich eine Positivfärbung. So wurde eine dieser Kulturen für die Routineuntersuchung eingesetzt. Um dieser Problematik aus dem Weg zu gehen, wurden Nachmessungen sogar mit fixierten HUVEC-Präparaten der Herstellerfirma durchgeführt. Eine weitere Problematik war die Identifizierung AECA-positiver Zellen. Entgegen der Annahme, dass Lupus-Patienten ebenfalls AECAs im Serum haben, zeigte unsere Probe eine Positivfärbung der Kerne – damit war das Kriterium der zytoplasmatischen, kernnahmen Färbung nicht erfüllt. Die verwendete Methodik der indirekten Immunfluoreszenz ermöglichte also eine zusätzliche Aussage, nämlich die korrekte Lokalisierung des Antigens.

Durch die Vorabtestung auf das Vorhandensein eines AECA-Antigens bzw. der Reagibilität der HUVEC auf TNF-α und der Mitführung von Positiv- und Negativkontrollen konnte die verwendete Methodik validiert werden.

4.2 Nachweis von AECA im Patientenserum – Bedeutung für die Transplantation

Die Expression von AECAs wurde im Abgleich mit Positivkontrollen des Kitherstellers und eigens herangezogenen Positivkontrollen beurteilt. Wie bereits unter 4.1 angedeutet, vereint die indirekte Immunfluoreszenzmethode zwei Kriterien, einmal den positiven Nachweis der Fluoreszenzfärbung und andererseits der Darstellung des Antigens im Zytoplasma. Andere Methoden, die ebenfalls zum Nachweis von AECAs im Serum in der Literatur auftauchen, haben den Nachteil, dass nur die Fluoreszenzfärbung detektiert wird. Dies trifft für den AECA-ELISA ebenso zu, wie für die FACS-Analysen (Bonner, 1972; Hornbeck, 2001). Die verwendete indirekte Immunfluoreszenz weist jedoch auch Grenzen auf. So wurden feste Kriterien für die Festlegung der Positivität festgelegt: intensive und kontrastreiche Grünfärbung um den Kern. Zwei Personen nutzten diese Kriterien und werteten sämtliche Präparate blind aus. Zeigten sich hierbei Unstimmigkeiten, so wurden diese Färbungen ein weiteres Mal begutachtet und klassifiziert.

In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass die Anwesenheit von AECAs vor und nach HTX im Zusammenhang mit dem Auftreten von akuten Abstoßungsreaktionen steht. Zum einen war die Häufigkeit von leichten, aber auch von schwerwiegenden Abstoßungsreaktionen bei AECA-positiven Patienten häufiger als bei AECA-negativen Patienten. Zum anderen hängt das Auftreten von AECAs mit einem signifikanten Anstieg der Häufigkeit eines Auftretens von Abstoßungsreaktionen zusammen. Die Relevanz von AECAs als Biomarker für die Identifizierung von Hochrisiko-Patienten wurde nach HTX (Peng et al., 2013; Rose, 2000) und nach Nierentransplantation (Alheim et al., 2013; Sun et al., 2008) bereits in früheren Arbeiten untersucht. Im Gegensatz zu der vorliegenden Studie wurden AECAs in den zitierten Arbeiten hauptsächlich bei Patienten, die eine chronische Abstoßung entwickelten, relevant. In unserer Studie zeigten Patienten mit AECA-Positivität signifikant häufigere Abstoßungsepisoden als Patienten ohne AECAs. Ebenso lag die Frequenz von multiplen

Abstoßungsepisoden bei AECA-positiven Patienten in höheren Bereichen. Dies entspricht den Untersuchungen von Sun und Mitarbeitern (Sun et al., 2011, 2008), die eine Korrelation zwischen AECAs und wiederkehrenden akuten Abstoßungsreaktionen nach Nierentransplantation zeigen konnten. Auch hier entwickelten AECA-positive Patienten signifikant mehr multiple AR im Zeitraum nach Transplantation, als die AECA-freien Patienten (Sun et al., 2011). Gerade die Patienten, die post-Transplantation AECAs entwickelten, präsentierten in dieser Arbeit signifikant mehr frühe AR pro Patient, während das Vorhandensein von AECAs bereits vor Transplantation nicht mit einem erhöhten Risiko für AR oder einer Schädigung/Verlust des Transplantats einherging. In der vorliegenden Arbeit war eine detaillierte Analyse derjenigen Patienten, welche eine AECA-Positivität nach HTX entwickelten, aufgrund der geringen Fallzahl (n=5) nicht möglich. Damit war es auch unmöglich zu zeigen, dass neu entwickelte AECAs donorspezifisch sind oder nicht. Leider existieren bislang nur wenige ähnliche Studien im Bereich der Herztransplantation. Lediglich eine Studie von Alvarez-Márquez und Kollegen (Alvarez-Márquez et al., 2008) berichtete von einer strengen Assoziation zwischen Vorhandensein von AECAs und Abstoßungsreaktionen und AECAs als Prognosefaktor hinsichtlich Abstoßungsreaktionen. In dieser Arbeit war die AECA-Häufigkeit nach HTX gering, stieg jedoch im Verlauf kontinuierlich an. Diese Beobachtung und die Annahme, eine stärkere Immunsuppression in der Anfangsphase nach HTX könne die Häufigkeit von AECAs reduzieren, konnten wir in unserer Studie nicht bestätigen. Ein Grund für die unterschiedlichen Beobachtungen könnten die unterschiedlichen Zeitpunkte der Probennahme sein, die in der Frühphase nach HTX auch nicht für alle Patienten vollständig war. Weiterhin kann nicht ausgeschlossen werden, dass die Patienten einen höheren Bedarf an Transfusionen während der Transplantation hatten, die zu einer Sensibilisierung führen könnte (Rakić et al., 1999).

Eine Hauptaussage unserer Studie, nämlich, dass mit einem relativ einfachen, schnellen und nicht-invasiven Testverfahren Hochrisikopatienten identifiziert werden können, könnte dazu führen, dass in Zukunft eine individualisierte Immunsuppression nach HTX möglich werden könnte. Betrachtet man die Gruppe der AECA-negativen Patienten, so sollte noch angemerkt werden, dass die Mehrzahl dieser Patienten mit MMF behandelt wurde. Aus Tierversuchen weiß man, dass MMF die B-Zell-Proliferation und die Antikörpersynthese hemmt und damit die Entwicklung von Alloantikörpern nach HTX reduzieren kann. Eine ähnliche Beobachtung wurde auch von Rose (2000) beschrieben, wo MMF-behandelte HTX-Patienten signifikant weniger AECA- und anti-HL-Antikörper entwickelten, als die Patienten mit Azathioprin-Therapie. Auch die Bildung von Panel-reactive Antibodies konnte durch die Gabe von MMF unterdrückt werden (Schmid et al., 1998).

Im Rahmen der Nachsorge spielt eine etwaige Infektion mit Cytomegalieviren und der Entstehung von AECAs eine lange bekannte Rolle (Costa et al., 2010; Toyoda et al., 1997). Bereits 1997 wurde in einer klinischen Studie gezeigt, dass vier Wochen nach CMV-DNA-Nachweis die Konzentration von AECAs im Serum anstieg und bis zu zwei Monate erhöht blieb. Eine Beeinflussung der humoralen Immunantwort scheint sehr wahrscheinlich. Vergleicht man in der vorliegenden Arbeit die AECA-Positivität mit dem Vorliegen von CMV-Infektionen, so fällt auf, dass der Anteil von CMV-Infektionen in den Patientengruppen mit AECA-positiven Proben deutlich höher war als in der Gruppe der AECA-negativen Patienten. Hier scheinen weitere Untersuchungen sinnvoll, inwieweit ein Vorliegen einer CMV-Infektion des Spenders oder des Empfängers das Vorhandensein von AECAs beeinflusst.

Abgesehen von einer unterschiedlichen Frequenz im Auftreten von Abstoßungsreaktionen zeigte sich kein Unterschied hinsichtlich der Mortalität nach HTX im Zusammenhang einer Anwesenheit von AECAs. Die Überlebensrate von Patienten mit und ohne AECA war in unserer Studie vergleichbar.

Ähnliche Beobachtungen hinsichtlich Langzeit-Outcome wurden auch von Alvarez-Márquez und Kollegen gemacht (Alvarez-Márquez et al., 2008).

Trotz der Einschränkung, dass wir keine Aussagen zum Antikörpertyp machen können (Alvarez-Márquez et al., 2008) und aufgrund der kleinen Patientenzahl keine Aussage zu den bereits vor HTX vorhandenen AECAs möglich war, erlaubt der beschriebene Test eine Identifizierung von Hochrisikopatienten und damit eine individualisierte Immunsuppression.

4.3 Expression von Adhäsionsmoleküle (E-Selektin, ICAM-1, VCAM-1) durch Patientenserum – Bedeutung für die Transplantation

In der Pathogenese der chronischen Abstoßung spielen akute Abstoßungsreaktionen (Bevilacqua et al., 1987) eine tragende Rolle. Die Bedeutung der Endothelzellaktivierung nach HTX wurde 1993 von Ferran und Mitarbeitern beschrieben. Patienten ohne akute Abstoßung zeigten im Gewebe keine Expression von E-Selektin und VCAM-1, und nur eine konstitutive leichte ICAM-1-Expression. Eine wichtige Aussage war, dass die Expression von E-Selektin dem Nachweis einer AR vorausgeht. Unter in vitro Bedingungen bewirkten nur 16% der untersuchten Patientenproben in der vorliegenden Studie überhaupt eine Induktion von E-Selektin. Die Verteilung im Verlauf nach HTX war uneinheitlich und es gab keine Aussage zur Entwicklung einer AR. Allerdings muss einschränkend angemerkt werden, dass in der vorliegenden Untersuchung nur ein Teil der Proben auf E-Selektin-Expression getestet wurde, was die Aussagekraft deutlich einschränkt. Außerdem muss berücksichtigt werden, dass die E-Selektin-Expression wohl nur sehr kurzlebig ist (Ferran et al., 1993). So müsste das Messraster deutlich straffer ausfallen. Rein praktisch wäre dies im Krankenhaus, also in der Frühphase nach HTX, kein großes Problem, da in diesem Zeitraum häufig Blutproben abgenommen werden (z. B. zur Spiegelbestimmung der Immunsuppressiva), die man durchaus auch für die Bestimmung der Endothelaktivierung nutzen könnte (ohne zusätzliche Proben abzunehmen!).

Die Bedeutung der Expression von VCAM-1 nach HTX wird in vielen Studien diskutiert, ohne eine klare Aussage. In der Arbeit von Ferran war die Expression im Gewebe von Patienten mit AR erhöht. Jedoch war die Patientenzahl, bei der nach HTX eine VCAM-1-Expression in Kapillaren und postkapillären Venolen histologisch nachgewiesen wurde, sehr gering. Darüber hinaus existieren mehrere Tierstudien, welche signifikante VCAM-1 Expressionsanstiege vor und während Abstoßungsepisoden nachweisen konnten (Ferran et al., 1993; Song et al., 2008; Zhao et al., 2015). Auch im Serum zirkulierende Adhäsionsmoleküle wurden bei Patienten mit AR nachgewiesen (Andreassen et al., 1998; Tanio et al., 1994; Wu et al., 2003). Auch hier gibt es keine klare Aussage hinsichtlich Korrelation zu AR. Auch in der vorliegenden Arbeit konnte zwar eine vereinzelte Aktivierung von Endothelzellen über die Expression von VCAM-1 nachgewiesen werden, jedoch war wie beim E-Selektin das Expressionsmuster nach HTX sehr uneinheitlich und es konnte keine Korrelation zur AR der Patienten hergestellt werden.

Schließlich stellt ICAM-1 auch ein kritisches Molekül in der Pathogenese der Transplantatabstoßung dar (Cosimi et al., 1990). Wie bereits oben aufgeführt, wurde eine vermehrte ICAM-1-Expression in Transplantaten wie auch als löslicher Bestandteil im Serum nach Transplantation gefunden. Ebenso konnte in einer sehr frühen Arbeit gezeigt werden, dass anti-ICAM-1-Antikörper im Tiermodell das Transplantatüberleben nach HTX signifikant verlängern (Isobe et al., 1992). Jedoch besteht auch für

dieses Molekül keine eindeutige Aussagekraft für die Vorhersage einer AR. In der vorliegenden Studie wurde die stimulierende Wirkung der im Patientenserum enthaltenen Aktivatoren auf HUVEC untersucht. Dabei stellte sich heraus, dass 72% der Proben zu einer vermehrten Expression von ICAM-1 führten – im Gegensatz zur Expression von E-Selektin und VCAM-1 (siehe oben). Dies spricht dafür, dass der Vermittler für die ICAM-1-Expression deutlich stabiler ist, als für die beiden anderen Adhäsionsmoleküle. Ursächlich für eine ICAM-1-Expression ist die Anwesenheit von Interleukin-1, Tumornekrosefaktor und Interferon γ (Hubbard and Rothlein, 2000b). Diese müssten im Serum der Patienten zu finden sein, wurden jedoch im Rahmen der vorliegenden Studie nicht bestimmt. Daher kann diesbezüglich keine klare Aussage gemacht werden. Über alles wurde zwar eine Zunahme der aktivierenden Wirkung für ICAM-1 nach HTX nachgewiesen, jedoch mit einer hohen Streuung der Daten. Wenn man davon ausgeht, dass es sich hierbei um eine sekundäre inflammatorische Reaktion handelt, könnte man vermuten, dass die einzelnen Patienten nach HTX unterschiedliche Zytokin- und Chemokinmuster freisetzen. Auch ein Unterschied in der Zusammensetzung und Konzentration der einzelnen Moleküle könnte die hohe Variabilität der Daten erklären. Trotz der Einzelanalysen und der Definition von 5 Gruppen, die die ICAM-1-Expression beschreiben, war kein Zusammenhang mit dem Outcome und der Entstehung einer AR nachweisbar. Auffallend war, dass nur ein geringer Prozentsatz an Patienten keine oder nur eine geringe ICAM-1-Expression auslösten (9% bzw. 6%). Diese Patienten zeigten keine klinischen Auffälligkeiten (Mortalität, Anzahl und Grad der AR), was jedoch im Anbetracht der kleinen Fallzahl nur eingeschränkt bewertet werden kann. Bei 32% der Patienten wurde dagegen über die Zeit ein signifikanter Anstieg der ICAM-1-Expression detektiert. Es kann nur darüber spekuliert werden, dass die Patienten im ersten Jahr nach HTX vermehrt inflammatorische Reaktionen erfahren, d. h. im Serum müssen sich steigende Konzentrationen an Zytokinen oder anderer Aktivatoren befinden, die für die Stimulierung der HUVEC verantwortlich sind. Ein Zusammenhang mit gehäuften, oder zeitlich assoziierten Abstoßungsreaktionen konnte nicht aufgezeigt werden. Es ist jedoch nicht ausgeschlossen, dass erhöhte ICAM-1-Werte Phasen einer erhöhten Immunabwehr gegen das Transplantat aufzeigen und so möglicherweise eine -eventuell- drohende Abstoßungsreaktion ankündigen. Eine Studie konnte z.B. erhöhte ICAM-1-Werte im Urinsediment -bei Patienten mit Status nach Nierentransplantation- vor und während einer renalen Abstoßungsreaktion nachweisen (Chatterjee et al., 2012). Eine weitere Gruppe von Patienten (n=7) wies eine erhöhte Expression von ICAM-1 vor der Transplantation auf, welche sich im Verlauf normalisierten. Möglicherweise lag bei diesen Patienten eine erhöhte Inflammation im Rahmen ihrer Grunderkrankung vor (Wilhelmi et al., 2005). Da die inflammatorische Reaktion nach HTX abnahm, könnte man annehmen, dass die Ursache für die Inflammation im kranken Organ zu suchen ist. Durch Austausch mit einem gesunden Organ reduzierte sich auch die aktivierende Wirkung auf HUVEC. Aus der Patientendokumentation waren hierfür jedoch keine Hinweise auffindbar. Es gab beispielsweise keinen Hinweis auf eine vermehrte CMV-Belastung oder andere Infektionen (Hepatitis, HIV, Herpes) des Empfängers. Die Patienten, die im Verlauf nach HTX intermittierend eine ICAM-1-Expression aufwiesen, zeigten ebenfalls keine klinischen Auffälligkeiten.

Schließlich bleibt auch offen, ob die stimulierenden Faktoren im Serum der HTX-Patienten an der Entstehung einer chronischen Abstoßung (transplant-assoziierten Vaskulopathie) (Belperio and Ardehali, 2008) beteiligt sind. Dies wurde in der vorliegenden Studie nicht untersucht.

Ein weiterer Grund, der die unterschiedliche Expression von Adhäsionsmolekülen erklären könnte, ist die heterogene immunsuppressive Therapie der vorliegenden Studie. Welche Rolle die Immunosuppression tatsächlich auf die Expression der hier untersuchten Oberflächenmoleküle hat,

ist nicht abschließend geklärt. Es gibt einerseits Hinweise, die zeigen, dass die Immunosuppression keinen Einfluss hat (Satoh et al., 1995; Weigel et al., 2000). Andererseits kennt man z. B. die antiinflammatorische Wirkung von Steroiden. So hemmt die Vorbehandlung von Endothelzellen mit Dexamethason die Leukozytenaktivierung (Shimoyama et al., 1997). Es ist also durchaus vorstellbar, dass eine hohe Steroiddosis in der frühen Phase nach HTX die Reduzierung bei den Patienten mit primär hoher ICAM-1-Expression erklären könnte. Weiterhin wurde schon 1995 durch Koskinen und Mitarbeiter nachgewiesen, dass bei einer hohen Cyclosporindosis, wie sie häufig in der Frühphase eingesetzt wird, die Expression von endothelialem VCAM-1 und ICAM-1 im Gewebe signifikant reduziert war (Koskinen et al., 1995). Ob dies die Hemmung in der Frühphase erklärt, bleibt offen. Der hohe Anteil an Patienten mit Azathioprin könnte ebenfalls eine Abnahme der stimulierenden Wirkung erklären. So konnte die Gruppe um Marinkovic anti-inflammatorische Effekte von Azathioprine an humanen Endothelzellen zeigen (Marinkovic et al., 2013). Allerdings ist auch eine Hemmung der TNF-induzierten Expression von ICAM-1 und VCAM-1 bei humanen aortalen Endothelzellen durch Mykophenolsäure beschrieben (Olejarz et al., 2014). Die oben beschriebenen ICAM-1-Gruppen zeigten keine eindeutige Zuordnung für bestimmte immunsuppressive Therapien. Auch eine Induktion mit dem Immunglobulin ATG könnte zu einer Reduktion der inflammatorischen Reaktion von Endothelzellen beitragen (Werner et al., 2014). Durch die Bindung von ATG an aktivierte Endothelzellen (Kanzler et al., 2013) kann die Bindung von Lymphozyten und Neutrophilen gehemmt werden und damit der Ischämie-Reperfusionsschaden reduziert werden. In der vorliegenden Studie erhielten fast alle Patienten (31/34) eine Induktionstherapie mit ATG. Die hemmende Wirkung von ATG war jedoch nicht eindeutig nachweisbar. Es kann nicht ausgeschlossen werden, dass der Einfluss auf den Ischämie-Reperfusions-Schaden nicht detektiert wurde, da die ersten Proben erst innerhalb der ersten 14 Tage nach HTX genommen wurden.

Da es sich bei herztransplantierten Patienten um ein sehr heterogenes Patientengut mit teilweise vielen Systemerkrankungen(z.B. Diabetes mellitus, Niereninsuffizienz) und unterschiedlichen Therapien handelt, liegt es nahe, dass die Expressionsmuster der endothelialen Adhäsionsmoleküle durch weitere pathophysiologischen Mechanismen (z.B. perioperative Ischämiezeit, Komorbidität) und durch unterschiedliche Pharmakotherapie moduliert werden. So konnte beispielsweise 2011 gezeigt werden, dass durch eine Therapie mit Metformin die Expression von ICAM-1 auf Endothelzellen signifikant reduziert wird (Fidan et al., 2011). Eine ähnliche Wirkungsweise konnte auch für Spironolacton nachgewiesen werden (Caprio et al., 2008).

Neben Zytokinen und Chemokinen können auch Autoantikörper, wie z. B. AECAs, die Expression von Adhäsionsmolekülen (u. a. E-Selektin, VCAM-1, ICAM-1, P-Selektin) bei Endothelzellen hochregulieren (Praprotnik et al., 2000). Durch eine vermehrte Anbindung von monozytären Zellen konnte die inflammatorische Wirkung der AECAs in vitro gezeigt werden (Praprotnik et al., 2001a). In der vorliegenden Studie konnte keine Verbindung zwischen dem Auftreten von AECAs und einer aktivierenden Wirkung durch Serumbestandteile nachgewiesen werden. Zwar zeigten sich vereinzelte Expressionen von Adhäsionsmolekülen in Anwesenheit von AECAs, jedoch trat dies nicht gehäuft auf. Ein Grund für die fehlende Korrelation könnte die Heterogenität der AECAs sein. So ist beschrieben, dass z. B. AECAs, die aus Proben von Patienten mit thrombotisch-thrombozytopenischer Purpura isoliert wurden, speziell nur mikrovaskuläre Endothelzellen aktivieren (Praprotnik et al., 2001b). In der vorliegenden Studie wurden die AECAs zwar mit einem in vitro Test identifiziert, der Antigene von HUVEC verwendet, jedoch schließt das nicht aus, dass HUVEC die „falschen“ Zellen für den Nachweis der aktivierenden Wirkung von AECAs auf Endothelzellen sind. Schließlich findet die

Abstoßungsreaktion nach HTX auch auf endothelialer Ebene in den kleinen Gefäßen am Herzen statt (Lu et al., 2011). Optimal wäre die Verwendung von mikrovaskulären Endothelzellen aus den Arteriolen des Herzens – noch besser wäre die Verwendung der patienteneigenen Zellen, bzw. präparierte Endothelzellen des Spenderorgans. Dabei tritt jedoch ein ethisches Problem auf. Es ist nahezu unmöglich, die Einverständniserklärung von Angehörigen von potentiellen Organspendern zu bekommen. Eine Möglichkeit, Zellmaterial vom Spender zu bekommen, wird z. B. für den Nachweis von AECAs bei Nierentransplantierten eingesetzt. Der durchflusszytometrische Crossmatch-Kit XM-ONE erlaubt z. B. die Detektion von HLA-Antigenen plus solcher Antigene, die gegen Tie-2-positive endotheliale Vorläuferzellen (AECAs) gerichtet sind (Xavier et al., 2011). Dabei werden aus Spenderblut die Vorläuferzellen mittels paramagnetischer Partikel, woran ein spezifischer Antikörper gegen Tie-2 gebunden ist, isoliert und mit dem Empfängerblut inkubiert. In der Durchflusszytometrie werden dann die entsprechenden IgG-Antigene detektiert. Bei den Nierentransplantierten wurde nachgewiesen, dass AECA-positive Patienten ein erhöhtes Risiko zeigten, in der Frühphase nach Transplantation eine AR zu entwickeln. Diese Untersuchungen gibt es auch für Herztransplantierte (Sumitran-Holgersson, 2008), jedoch gibt es bislang keine Korrelation zur aktivierenden Wirkung der AECAs auf Endothelzellen. Die Analytik ist sehr kostspielig und wird für die Herztransplantierten nur für wissenschaftliche Zwecke eingesetzt.

Das primäre Ziel der vorliegenden Studie war die Suche nach einem Biomarker, der eine Abstoßungsreaktion vorhersagen könnte. Letztlich wäre es für den Patienten wünschenswert, wenn die Standardprozedur der Endomyokardbiopsie durch eine einfache Blutabnahme ersetzt werden könnte. Durch die deutlich weniger invasive Diagnostik der Blutentnahme könnten mögliche Komplikations- und Infektionsrisiken der Biopsie, z. B. Blutungen, Perforation mit Perikardtamponade, embolische Ereignisse, Rhythmusstörungen, vermieden werden. Auch die psychische Belastung für den Patienten könnte reduziert werden (Anderson and Marshall, 1984). Zusätzliche Vorteile ergeben sich durch eine ortsunabhängige Entnahme der Blutproben, welche den Patienten eine eventuelle lange Anreise an ein herzchirurgisches Zentrum erspart. Herzchirurgisches Personal könnte zusätzlich entlastet werden, da für eine Blutentnahme kein speziell geschultes ärztliches Personal benötigt wird. Dies würde auch die Kosten deutlich senken. Es ließe sich so auch ein engmaschigeres Screening nach Abstoßungsreaktionen ermöglichen, welches wiederum ein schnelleres pharmakologisches Gegensteuern ermöglichen würde.

In der vorliegenden Studie konnte letztlich kein entsprechender Biomarker identifiziert werden, der eine eindeutige Prognose für die Entstehung einer AR ermöglicht. Einzig der Nachweis von AECAs erlaubte eine Korrelation mit dem Auftreten von AR und von multiplen Ereignissen von AR. Eine Spezifizierung der Antikörper (z. B. XM-ONE-Testung) bei einer größeren Patientenzahl könnte die Suche nach einem spezifischen Biomarker nach HTX erleichtern.

5. Zusammenfassung und Ausblick

In der vorliegenden Studie konnte kein Zusammenhang zwischen klinisch verifizierter Abstoßungsreaktion und erhöhter Aktivierung von Endothelzellen gezeigt werden. Der Einsatz der in unserer Studie untersuchten Adhäsionsmoleküle als Biomarker für Abstoßungsreaktion bleibt daher fraglich.

Dagegen war eine Korrelation zwischen AECAs und dem Auftreten von AR signifikant. Dies erlaubt die Identifizierung von Hochrisikopatienten und ermöglicht die Umsetzung einer individualisierten Immunsuppression. Weitere Untersuchungen erscheinen sinnvoll, die AECA-Häufigkeiten, -Nachweismuster und zeitliche Zusammenhänge mit Abstoßungsreaktionen genauer zu untersuchen. Dies könnte in Zukunft dabei helfen die Wahrscheinlichkeit einer Abstoßungsreaktion abschätzen zu können. So könnten Myokardbiopsien gezielter zum Nachweis einer Abstoßungsreaktion angewendet werden.

Insgesamt könnte die Abstoßungsdiagnostik mittels Biomarker eine Möglichkeit darstellen, ein einfacheres und schonenderes postoperatives Management nach Herztransplantation zu erreichen und somit die Myokardbiopsie sinnvoll zu ergänzen oder in der Zukunft zu ersetzen.

5. Anhang

Brutschrank CO_2-Auto-Zero	Heraeus Holdings GmbH (Hanau, Deutschland)
CASY® Cell Counter and Analyser System, Model TTC	Schärfe Systems GmbH (Reutlingen, Deutschland)
E-max Precision Microplate Reader	Molecular Devices Corporation (Sunnyvale, USA)
Kamera 25.4 2MP Slider	Diagnostic Instruments (Sterling Heights, USA)
Labsystems Finnpipette® 1500 µl	Molecular Devices Corporation (Sunnyvale, California, USA)
Mikroskop Fluovert FU	Leitz GmbH (Wetzlar, Deutschland)
Mikroskop Leica DMRBE	Leica Microsystems (Mannheim, Deutschland)
Pipetboy acu	Integra Biosciences GmbH (Fernwald, Deutschland)
Rüttler JKA Vibrax-VXR	Janka-und-Kunkel AG (Köln, Deutschland)
Sterilbank Hera safe Heraeus®	Heraeus Holdings GmbH (Hanau, Deutschland)
Sterilbank Laminair Heraeus®	Heraeus Holdings GmbH (Hanau, Deutschland)
Ultrasonic Flowcomputer novaflow	Novalung® GmbH (Heilbronn, Deutschland)
Victor^{3TM} 1420 Multilabel Counter	PerkinElmer (Waltham, USA)
Zentrifuge Megafuge 1.0 R Heraeus Systems Sepatech	Heraeus Holdings GmbH (Hanau, Deutschland)
Zentrifuge Multifuge 1 L-R Heraeus Systems Sepatech	Heraeus Holdings GmbH (Hanau, Deutschland)

Tabelle 15 Verwendete Geräte

Eppendorf Multipette Plus	Eppendorf Deutschland GmbH (Wesseling-Berzdorf, Deutschland)
Gilson Pipetten (20, 100, 200, 1000 µl)	Gilson (Villiers Le Bel, Frankreich)
Kryobox	Air Liquide (Paris, Frankreich)
Zählkammer Neubauer improved	VWR International GmbH (Darmstadt, Deutschland)

Tabelle 16 Sonstige Hilfsmittel.

96-well-Platte, steril und unsteril	Nunc (Roskilde, Dänemark)
Kryoröhrchen 2ml	Carl Roth GmbH&Co.KG (Karlsruhe, Deutschland)
Objektträger, Ground Edges Frosted	VWR International GmbH (Darmstadt, Deutschland)
S Monovette® 5,5 und 7,5ml	Sarstedt (Nürnbrecht,Deutschland)
Spritzen steril, 2ml und 20ml	BD Discadit™ (Franklin Lakes, USA)
Sterilfilter 0,20µm und 0,45µm, Minisart®	Sartorius Stedim biotech (Göttingen, Deutschland)
T 25 Kulturflaschen	Nunc (Roskilde, Dänemark)

Tabelle 17 Verbrauchsmaterialien.

Nicht einzeln gelistet wurden Pipettenspitzen, Eppendorf Reaktionsgefäße, sterile und unsterile Falcon Röhrchen (15 ml, 50 ml).

Anti-human CD106 F:P8.7	Cymbus Biotechnology (Hampshire, UK)
Biotynilierter Anti-Maus Ak:IgG (H+L)	Vector (Burlingame, USA)
CD54, ICAM-1, 370mg/l	Dako Cytomation (Glostrup, Dänemark)
Konjugat Alkaline Phosphatase Streptavidin	Vector (Burlingame, USA)
Purified anti-CD62E 1.0mg/ml	Ancell Corporation (Bayport, USA)

Tabelle 18 Antikörper.

Aceton	Merck (Darmstadt, Deutschland)
Acetonmethanol	Herstellung siehe Anhang
Amphotericin B, Endkonzentration 250µg/ml	BioWhittaker, Lonza (Walkersville, USA)
Diethanolamin Hydrochlorid	Sigma-Aldrich life sciences (St Louis, USA)
Diethanolamin-Lösung	Herstellung siehe Anhang
Endothelial Cell Growth Medium	PromoCell (Heidelberg, Deutschland)
Fetales Kälber Serum (FKS)	PAA Laboratories GmbH (Pasching, Österreich)
Fluoromount-G	Southern Biotech (Birmingham, USA)
Gelatine, Endkonzentration 0,25% in HEPES	Merck (Darmstadt, Deutschland)
Gentamycin, Endkonzentration 50µg/ml	Sigma-Aldrich life sciences (St Louis, USA)
HEPES 4-(2-Hydroxethyl)-1-piperazinmethansulfonsäure-Puffer (1M)	Biochrom AG (Berlin, Deutschland)
Humanserum AB	PAA Laboratories GmbH (Pasching, Österreich)
Medium 199 with Earle's salts without L-Glutamine	PAA Laboratories GmbH (Pasching, Österreich)
Methanol	Merck (Darmstadt, Deutschland)
Nabelschnurtransportlösung	Herstellung siehe Anhang
Paraformaldehyd, Endkonzentration 40mg/l	Merck (Darmstadt, Deutschland)
Paranitrophenylphosphat	Sigma-Aldrich life sciences (St Louis, USA)
PBS-Puffer nach Dulbecco	Herstellung siehe Anhang
Supplement Mix C-39215für Endothelial Cell Growth Medium	PromoCell (Heidelberg, Deutschland)
TNF-α, human recombinant (aus E.coli, lyophilisiert, proteinträgerfrei), Endkonzentration 10ng/ml	PeproTech Inc. (Rocky Hill, USA)
Trypsin (1:250) 10fach, 2,5% Trypsin, verwendet als 1fach-Trypsin	PAA Laboratories GmbH (Pasching, Österreich)

Tabelle 19 Zellkulturmedien und –lösungen. Herstellung Acetonmethanol: Mischen von Aceton und Methanol im Verhältnis 1:1 und anschließende Aufbewahrung bei -20°C.

Inhaltsstoffe	Menge
Diethanolamin	1,051g
Aqua bidest	100ml

Tabelle 20 Herstellung Diethanolamin.

Anschließend Einstellen des pH-Wertesauf 10,3 mit KOH (1M) und luftdichte Lagerung im Dunkeln bei Raumtemperatur.

Inhaltsstoffe	Konzentration [g/L]
$CaCl_2 2H_20$	0,133
KCl	0,20
KH_2PO_4	0,20
$MgCl_2 2H_2O$	0,10
NaCl	8,00
Na_2HPO_4	1,15

Tabelle 21 PBS-Puffer nach Dulbecco mit folgender Zusammensetzung bei einem pH von 7,3-7,4.

Inhaltsstoffe	Menge
Bidestilliertes Wasser	800 ml
NAHCO3	2,1 g
HEPES	5,95 g
KH-Stammlösung, 250x	100 ml
Glucose-Stammlösung, 250x	2 ml
CaCl2, 1M	1,2 ml
Penicillin-Streptomycin-Lösung	20 ml

Tabelle 22 Zusammensetzung der Nabelschnur-Transportlösung.

Inhaltsstoffe	Menge
NaCl, 30mM	175mg
$NaH_2PO_4xH_2O$, 1mM	13,8mg
$KHCO_3$, 30mM	300mg
TES, 100mM	2,293g
Glucose, 5mM	99mg
Aqua bidest	80ml
KOH, 1M	4ml
MgSO4 0,78mM	19,2mg

Tabelle 23 Zusammensetzung des CPtes-Puffers.

Einstellung des pH-Wertes auf 7,7 mittels KOH (1M), hinzugeben von Aqua bidest bis zur Gesamtmenge 100ml, sterilfiltrieren, lagern bei 4°C

6. Tabellenverzeichnis

TABELLE 1 EINTEILUNG DER ZELLULÄREN ABSTOßUNGSREAKTION AUS DEM JAHRE 1990. 3
TABELLE 2 ÜBERARBEITETE EINTEILUNG DER ZELLULÄREN ABSTOßUNGSREAKTION. DAS R HINTER DER GRADEINTEILUNG STEHT FÜR „REVISED“. 3
TABELLE 3 PATIENTENCHARAKTERISTIKA 9
TABELLE 4 BEISPIELHAFTE BELEGUNG EINER 96-WELL-PLATTE, DIE POSITIVKONTROLLE MIT TNF-A: 8-FACH-BESTIMMUNG, DIE NEGATIVKONTROLLE MIT BASALMEDIUM VON PROMOCELL: 8-FACH-BESTIMMUNG, PATIENTENSEREN: 4-FACH-BESTIMMUNG. AUS GRÜNDEN DER PRAKTIZIERBARKEIT WURDEN MAX. SECHS 96-WELL-PLATTEN GLEICHZEITIG VERARBEITET. 19
TABELLE 5 MITTLERE ICAM-1-EXPRESSION IN ABHÄNGIGKEIT DER KOINKUBATIONSDAUER (RELATIVE ABSORPTION BEI 450 NM). 20
TABELLE 6 SCHWELLENWERTE 21
TABELLE 7 CHARAKTERISTIKA DES PATIENTENKOLLEKTIVS 24
TABELLE 8 VERGLEICH AECA UND ABSTOßUNGSREAKTION. 26
TABELLE 9 ANZAHL DER AECA-POSITIVEN SERUMPROBEN IM ZUSAMMENHANG MIT KLINISCH NACHGEWIESENEN ABSTOßUNGSREAKTIONEN. 28
TABELLE 10 AECA-KORRELATION MIT CMV-INFEKTIONEN. BEI EINIGEN PATIENTEN (6 AUS GRUPPE 3) LAGEN KEINE DATEN HINSICHTLICH CMV-INFEKTION VOR. 28
TABELLE 11: MORTALITÄT NACH EXPRESSIONSMUSTER ICAM-1 42
TABELLE 12 VERTEILUNG DER IMMUNOSUPPRESSION NACH ICAM-EXPRESSIONSMUSTER 42
TABELLE 13 VERGLEICH DER EXPRESSION VON OBERFLÄCHENMOLEKÜLEN UNTEREINANDER. DIE WERTE STELLEN JEWEILS DIE ANZAHL VON SCHWELLENWERTÜBERSCHREITUNGEN DAR. 43
TABELLE 14 AECA-POSITIVE SERUMPROBEN UND GESTEIGERTE EXPRESSION VON OBERFLÄCHENMOLEKÜLEN IM VERGLEICH. 43
TABELLE 15 VERWENDETE GERÄTE 52
TABELLE 16 SONSTIGE HILFSMITTEL. 52
TABELLE 17 VERBRAUCHSMATERIALIEN. 52
TABELLE 18 ANTIKÖRPER. 53

7. Abbildungsverzeichnis

ABBILDUNG 10 BEISPIEL"SIMPLE ERROR BARS". DARGESTELLT IST DIE RELATIVE ABSORPTION VON E-SELEKTIN IM ZELL-ELISA NACH INKUBATION VON PROBANDENSERUM (PROBANDEN-NUMMERN AUF DER X-ACHSE) MIT HUVEC FÜR 4 STUNDEN. ALS POSITIVKONTROLLE DIENT DIE INKUBATION MIT TNF (2 UNTERSCHIEDLICHE ANSÄTZE, +TNF, +TNF2); ALS NEGATIVKONTROLLE WURDEN DIE ZELLEN MIT MEDIUM OHNE TNF (OTNF, OTNF2, 2 UNTERSCHIEDLICHE ANSÄTZE) BEHANDELT. 22
ABBILDUNG 11 AECA-ANFÄRBUNGEN VON HUVEC BEIMPFT MIT PATIENTENSEREN DER VERDÜNNUNG 1:10. BEI DEN OBEREN BEIDEN BILDERN (PAT.1) ERKENNT MAN EINE ANFÄRBUNG DES CYTOPLASMAS MIT ZUSÄTZLICH SCHECKIGEN FÄRBEANTEILEN (POSITIVE AECA-PROBE). DIE MITTLERE BEIDEN BILDER (PAT.2) ZEIGEN KEINERLEI ANFÄRBUNG. DIE UNTEREN BEIDEN BILDER (PAT.3) ZEIGEN EIN STARKES ANFÄRBEN DER ZELLKERNE, WELCHES ALS NEGATIV GEWERTET WURDE. 27
ABBILDUNG 13 WIRKUNG VON PROBANDENSERUM AUF DIE EXPRESSION VON VCAM-1 VON HUVEC. SERUM VON 38 PROBANDEN (30%IG) WURDE FÜR 16 STUNDEN MIT VITALEN HUVEC INKUBIERT UND DIE EXPRESSION VON VCAM-1 IM ZELL-ELISA BESTIMMT. (A) DIE ABSORPTION DER NEGATIVKONTROLLEN (DOPPELANSATZ, BASAL_1 UND _2) WURDE GEMITTELT (GRÜNE LINIE). DIE WERTE DER PROBEN LIEGEN BIS AUF 6 PROBANDENPROBEN UNTERHALB ODER GLEICH DER NEGATIVKONTROLLE. (B) NACH NORMIERUNG AUF DIE POSITIVKONTROLLE (TNF-STIMULIERTE HUVEC, TNF_1 UND _2, DOPPELANSATZ) WURDEN DER MITTELWERT (MW) UND DIE STANDARDABWEICHUNG (SD) AUS DEN 38 PROBANDENWERTEN ERMITTELT. ALS SCHWELLENWERT FÜR DIE PATIENTENPROBEN WURDE 4,6 %TNF (ENTSPRICHT MW + 2XSD) ERMITTELT. 31
ABBILDUNG 14 WIRKUNG VON PATIENTENSERUM AUF DIE EXPRESSION VON VCAM-1 VON HUVEC. SERUM VON HERZTRANSPLANTIERTEN (30%IG) WURDE MIT HUVEC INKUBIERT UND DIE EXPRESSION VON VCAM-1 (SCHWARZE KREISE), ICAM-1 (WEIßE DREIECKE) UND E-SELEKTIN (GRAUE RAUTEN) IM ZELL-ELISA BESTIMMT. DARGESTELLT SIND DIE PATIENTEN, BEI DENEN ERHÖHTE (ÜBER DEM SCHWELLENWERT VON VCAM-1, SCHWARZE DURCHGEZOGENE LINIE) WERTE VON VCAM-1 IM VERLAUF DES 1. JAHRES NACH HTX (HERZTRANSPLANTATION) GEMESSEN WURDE. DIE SCHWARZE GESTRICHELTE LINIE ZEIGT DEN SCHWELLENWERT VON ICAM-1, DIE GRAUE LINIE DEN SCHWELLENWERT VON E-SELEKTIN. 32
ABBILDUNG 15 WIRKUNG VON PATIENTENSERUM AUF DIE EXPRESSION VON VCAM-1 VON HUVEC IN ABHÄNGIGKEIT VOM ZEITPUNKT DER PROBENNAHME NACH HERZTRANSPLANTATION (HTX) (A) BZW. IN BEZUG AUF DEN GRAD DER ABSTOßUNG (B). DIE BOXPLOTS ZEIGEN DEN MEDIAN (MITTLERE LINIE), DIE 25/75 PERZENTILEN (RÄNDER DES BOXPLOTS) UND DIE 5/95 PERZENTILEN (FEHLERBALKEN). DIE PUNKTE STELLEN MAXIMALE AUSREIßER DAR. 33
ABBILDUNG 16 WIRKUNG VON PROBANDENSERUM AUF DIE EXPRESSION VON ICAM-1 VON HUVEC. SERUM VON 38 PROBANDEN (30%IG) WURDE FÜR 16 STUNDEN MIT VITALEN HUVEC INKUBIERT UND DIE EXPRESSION VON ICAM-1 IM ZELL-ELISA BESTIMMT. (A) DIE ABSORPTION DER NEGATIVKONTROLLEN (DOPPELANSATZ, BASAL_1 UND _2) WURDE GEMITTELT (GRÜNE LINIE). DIE WERTE DER PROBEN LIEGEN BIS AUF 1 PROBANDENPROBE UNTERHALB ODER GLEICH DER NEGATIVKONTROLLE. (B) NACH NORMIERUNG AUF DIE POSITIVKONTROLLE (TNF-STIMULIERTE HUVEC, TNF_1 UND _2, DOPPELANSATZ) WURDEN DER MITTELWERT (MW) UND DIE STANDARDABWEICHUNG (SD) AUS DEN 38 PROBANDENWERTEN ERMITTELT. ALS SCHWELLENWERT FÜR DIE PATIENTENPROBEN WURDE 3,3 %TNF (ENTSPRICHT MW + 2XSD) ERMITTELT. 34
ABBILDUNG 17 WIRKUNG VON PATIENTENSERUM AUF DIE EXPRESSION VON ICAM-1 VON HUVEC IN ABHÄNGIGKEIT VOM ZEITPUNKT DER PROBENNAHME NACH HERZTRANSPLANTATION (HTX) (A) BZW. IN BEZUG AUF DEN GRAD DER ABSTOßUNG (B). DARGESTELLT SIND DIE WERTE VON 31 PATIENTEN MIT POSITIVEN WERTEN FÜR ICAM-1. ES DEUTET SICH EINE ZUNAHME DER EXPRESSION VON ICAM-1 ÜBER DIE ZEIT AN (A), WÄHREND DER GRAD DER ABSTOßUNG OFFENSICHTLICH KEINEN EFFEKT AUF DIE

AKTIVIERUNG DER ZELLEN HATTE (B). DIE BOXPLOTS ZEIGEN DEN MEDIAN (MITTLERE LINIE), DIE 25/75 PERZENTILEN (RÄNDER DES BOXPLOTS) UND DIE 5/95 PERZENTILEN (FEHLERBALKEN). DIE PUNKTE STELLEN MAXIMALE AUSREIßER DAR..... 35
ABBILDUNG 20 WIRKUNG VON PATIENTENSERUM AUF DIE EXPRESSION VON ICAM-1 VON HUVEC IN ABHÄNGIGKEIT VOM ZEITPUNKT DER PROBENNAHME NACH HERZTRANSPLANTATION (HTX). DARGESTELLT IST DER ZEITVERLAUF NACH HTX VON 7 PATIENTEN, DIE PRÄOPERATIV EINE POSITIVE PROBE FÜR ICAM-1 AUFWIESEN. ZUSÄTZLICH WAREN SPITZENWERTE IN DEN ERSTEN 6 MONATEN NACHWEISBAR. DIE VCAM-1-EXPRESSION WAR UNWESENTLICH. 38
ABBILDUNG 21 WIRKUNG VON PATIENTENSERUM AUF DIE EXPRESSION VON ICAM-1 (A) UND VCAM-1 (B) VON HUVEC IN ABHÄNGIGKEIT VOM ZEITPUNKT DER PROBENNAHME NACH HERZTRANSPLANTATION (HTX). DARGESTELLT IST DER ZEITVERLAUF NACH HTX VON 7 PATIENTEN, DIE PRÄOPERATIV HOHE ICAM-1-WERTE ZEIGTEN UND IM VERLAUF IMMER WIEDER SPITZENWERTE FÜR ICAM-1 AUFWIESEN. ES WAR KEINE WIRKUNG AUF DIE VCAM-1-EXPRESSION NACHWEISBAR. DIE BOXPLOTS ZEIGEN DEN MEDIAN (MITTLERE LINIE), DIE 25/75 PERZENTILEN (RÄNDER DES BOXPLOTS) UND DIE 5/95 PERZENTILEN (FEHLERBALKEN)..... 39
ABBILDUNG 22 WIRKUNG VON PATIENTENSERUM AUF DIE EXPRESSION VON ICAM-1 VON HUVEC IN ABHÄNGIGKEIT VOM ZEITPUNKT DER PROBENNAHME NACH HERZTRANSPLANTATION (HTX). DARGESTELLT IST DER ZEITVERLAUF NACH HTX VON 8/11 PATIENTEN, DIE POSTOPERATIV IMMER WIEDER SPITZENWERTE FÜR ICAM-1 AUFWIESEN. DIE VCAM-1-EXPRESSION WAR UNWESENTLICH. 40
ABBILDUNG 23 WIRKUNG VON PATIENTENSERUM AUF DIE EXPRESSION VON ICAM-1 (A) UND VCAM-1 (B) VON HUVEC IN ABHÄNGIGKEIT VOM ZEITPUNKT DER PROBENNAHME NACH HERZTRANSPLANTATION (HTX). DARGESTELLT IST DER ZEITVERLAUF NACH HTX VON 11 PATIENTEN, DIE IM VERLAUF IMMER WIEDER SPITZENWERTE FÜR ICAM-1 AUFWIESEN, JEDOCH OHNE ZU- ODER ABNAHME ÜBER DIE ZEIT. ES WAR KEINE WIRKUNG AUF DIE VCAM-1-EXPRESSION NACHWEISBAR. DIE BOXPLOTS ZEIGEN DEN MEDIAN (MITTLERE LINIE), DIE 25/75 PERZENTILEN (RÄNDER DES BOXPLOTS) UND DIE 5/95 PERZENTILEN (FEHLERBALKEN)..... 41

8. Literaturverzeichnis

Alheim, M., AlMahri, A., Nilsson, J., Tydén, G., Holgersson, J., 2013. The outcome of the endothelial precursor cell crossmatch test in lymphocyte crossmatch positive and negative patients evaluated for living donor kidney transplantation. Hum. Immunol. 74, 1437–1444. doi:10.1016/j.humimm.2013.06.005

Allen, M.D., McDonald, T.O., Himes, V.E., Fishbein, D.P., Aziz, S., Reichenbach, D.D., 1993. E-selectin expression in human cardiac grafts with cellular rejection. Circulation 88, II243–247.

Alvarez-Márquez, A., Aguilera, I., Blanco, R.M., Pascual, D., Encarnación-Carrizosa, M., Alvarez-López, M.R., Wichmann, I., Núñez-Roldán, A., 2008. Positive association of anticytoskeletal endothelial cell antibodies and cardiac allograft rejection. Hum. Immunol. 69, 143–148. doi:10.1016/j.humimm.2008.01.015

Anderson, J.L., Marshall, H.W., 1984. The femoral venous approach to endomyocardial biopsy: comparison with internal jugular and transarterial approaches. Am. J. Cardiol. 53, 833–837.

Andreassen, A.K., Nordøy, I., Simonsen, S., Ueland, T., Müller, F., Frøland, S.S., Gullestad, L., Aukrust, P., 1998. Levels of circulating adhesion molecules in congestive heart failure and after heart transplantation. Am. J. Cardiol. 81, 604–608.

Belperio, J.A., Ardehali, A., 2008. Chemokines and transplant vasculopathy. Circ. Res. 103, 454–466. doi:10.1161/CIRCRESAHA.108.182865

Bevilacqua, M., Stengelin, S., Gimbrone, M., Seed, B., 1989. Endothelial leukocyte adhesion molecule 1: an inducible receptor for neutrophils related to complement regulatory proteins and lectins. Science 243, 1160–1165. doi:10.1126/science.2466335

Bevilacqua, M.P., 1993. Endothelial-leukocyte adhesion molecules. Annu. Rev. Immunol. 11, 767–804. doi:10.1146/annurev.iy.11.040193.004003

Bevilacqua, M.P., Pober, J.S., Mendrick, D.L., Cotran, R.S., Gimbrone, M.A., Jr, 1987. Identification of an inducible endothelial-leukocyte adhesion molecule. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 84, 9238–9242.

Billingham, M.E., Cary, N.R., Hammond, M.E., Kemnitz, J., Marboe, C., McCallister, H.A., Snovar, D.C., Winters, G.L., Zerbe, A., 1990. A working formulation for the standardization of nomenclature in the diagnosis of heart and lung rejection: Heart Rejection Study Group. The International Society for Heart Transplantation. J Heart Transplant 9, 587–593.

Bonner, W.A., 1972. Fluorescence Activated Cell Sorting. Review of Scientific Instruments 43, 404. doi:10.1063/1.1685647

Breimer, M.E., Rydberg, L., Jackson, A.M., Lucas, D.P., Zachary, A.A., Melancon, J.K., Von Visger, J., Pelletier, R., Saidman, S.L., Williams, W.W., Holgersson, J., Tydén, G., Klintmalm, G.K., Coultrup, S., Sumitran-Holgersson, S., Grufman, P., 2009. Multicenter evaluation of a novel endothelial cell crossmatch test in kidney transplantation. Transplantation 87, 549–556. doi:10.1097/TP.0b013e3181949d4e

Caprio, M., Newfell, B.G., la Sala, A., Baur, W., Fabbri, A., Rosano, G., Mendelsohn, M.E., Jaffe, I.Z., 2008. Functional mineralocorticoid receptors in human vascular endothelial cells regulate intercellular adhesion molecule-1 expression and promote leukocyte adhesion. Circ. Res. 102, 1359–1367. doi:10.1161/CIRCRESAHA.108.174235

Carvalho, D., Savage, C.O., Isenberg, D., Pearson, J.D., 1999. IgG anti-endothelial cell autoantibodies from patients with systemic lupus erythematosus or systemic vasculitis stimulate the release of two endothelial cell-derived mediators, which enhance adhesion molecule expression and leukocyte adhesion in an autocrine manner. Arthritis Rheum. 42, 631–640. doi:10.1002/1529-0131(199904)42:4<631::AID-ANR5>3.0.CO;2-X

Chatterjee, P., Mathur, S.R., Dinda, A.K., Guleria, S., Mahajan, S., Iyer, V.K., Arora, V.K., 2012. Analysis of urine sediment for cytology and antigen expression in acute renal allograft rejection: an alternative to renal biopsy. Am. J. Clin. Pathol. 137, 816–824. doi:10.1309/AJCPQFZ0GELH5ZPN

Colombo, D., Ammirati, E., 2011. Cyclosporine in transplantation - a history of converging timelines. J. Biol. Regul. Homeost. Agents 25, 493–504.

Cosimi, A.B., Conti, D., Delmonico, F.L., Preffer, F.I., Wee, S.L., Rothlein, R., Faanes, R., Colvin, R.B., 1990. In vivo effects of monoclonal antibody to ICAM-1 (CD54) in nonhuman primates with renal allografts. J. Immunol. 144, 4604–4612.

Costa, C., Touscoz, G.A., Bergallo, M., Terlizzi, M.E., Astegiano, S., Sidoti, F., Sinesi, F., Segoloni, G.P., Cavallo, R., 2010. Non-organ-specific and anti-endothelial antibodies in relation to CMV infection and acute rejection in renal transplant recipients. Clin Transplant 24, 488–492. doi:10.1111/j.1399-0012.2009.01092.x

Cravedi, P., Heeger, P.S., 2012. Immunologic monitoring in transplantation revisited. Curr Opin Organ Transplant 17, 26–32. doi:10.1097/MOT.0b013e32834ee402

De Nigris, V., Pujadas, G., La Sala, L., Testa, R., Genovese, S., Ceriello, A., 2015. Short-term high glucose exposure impairs insulin signaling in endothelial cells. Cardiovasc Diabetol 14, 114. doi:10.1186/s12933-015-0278-0

Denton, M.D., Davis, S.F., Baum, M.A., Melter, M., Reinders, M.E., Exeni, A., Samsonov, D.V., Fang, J., Ganz, P., Briscoe, D.M., 2000. The role of the graft endothelium in transplant rejection: evidence that endothelial activation may serve as a clinical marker for the development of chronic rejection. Pediatr Transplant 4, 252–260.

Deutsche Stiftung Organtransplantation [WWW Document], n.d. URL http://www.dso.de/organspende-und-transplantation/transplantation/herztransplantation.html (accessed 2.5.15).

Dietrich, H., Hu, Y., Zou, Y., Dirnhofer, S., Kleindienst, R., Wick, G., Xu, Q., 2000. Mouse model of transplant arteriosclerosis: role of intercellular adhesion molecule-1. Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol. 20, 343–352.

Elices, M.J., Osborn, L., Takada, Y., Crouse, C., Luhowskyj, S., Hemler, M.E., Lobb, R.R., 1990. VCAM-1 on activated endothelium interacts with the leukocyte integrin VLA-4 at a site distinct from the VLA-4/Fibronectin binding site. Cell 60, 577–584. doi:10.1016/0092-8674(90)90661-W

Eurotransplant 2015 [WWW Document], n.d. URL https://www.eurotransplant.org/cms/mediaobject.php?file=wl_donation_transplants_Germany1.pdf (accessed 2.5.15).

Faulk, W.P., Rose, M., Meroni, P.L., Del Papa, N., Torry, R.J., Labarrere, C.A., Busing, K., Crisp, S.J., Dunn, M.J., Nelson, D.R., 1999. Antibodies to endothelial cells identify myocardial damage and predict development of coronary artery disease in patients with transplanted hearts. Hum. Immunol. 60, 826–832.

Ferran, C., Peuchmaur, M., Desruennes, M., Ghoussoub, J.J., Cabrol, A., Brousse, N., Cabrol, C., Bach, J.F., Chatenoud, L., 1993. Implications of de novo ELAM-1 and VCAM-1 expression in human cardiac allograft rejection. Transplantation 55, 605–609.

Ferry, B.L., Welsh, K.I., Dunn, M.J., Law, D., Proctor, J., Chapel, H., Yacoub, M.H., Rose, M.L., 1997. Anti-cell surface endothelial antibodies in sera from cardiac and kidney transplant recipients: association with chronic rejection. Transplant Immunology 5, 17–24. doi:10.1016/S0966-3274(97)80021-4

Fidan, E., Onder Ersoz, H., Yilmaz, M., Yilmaz, H., Kocak, M., Karahan, C., Erem, C., 2011. The effects of rosiglitazone and metformin on inflammation and endothelial dysfunction in patients with type 2 diabetes mellitus. Acta Diabetol 48, 297–302. doi:10.1007/s00592-011-0276-y

Ghasemzadeh, M., Hosseini, E., 2015. Intravascular leukocyte migration through platelet thrombi: directing leukocytes to sites of vascular injury. Thromb. Haemost. 113, 1224–1235. doi:10.1160/TH14-08-0662

Glotz, D., Lucchiari, N., Pegaz-Fiornet, B., Suberbielle-Boissel, C., 2006. Endothelial cells as targets of allograft rejection. Transplantation 82, S19–21. doi:10.1097/01.tp.0000231348.55262.5a

Haas, M., 2014. An updated Banff schema for diagnosis of antibody-mediated rejection in renal allografts. Curr Opin Organ Transplant 19, 315–322. doi:10.1097/MOT.0000000000000072

Holzknecht, Z.E., Kuypers, K.L., Plummer, T.B., Williams, J., Bustos, M., Gores, G.J., Brunn, G.J., Platt, J.L., 2002. Apoptosis and cellular activation in the pathogenesis of acute vascular rejection. Circ. Res. 91, 1135–1141.

Hornbeck, P., 2001. Enzyme-Linked Immunosorbent Assays, in: Coligan, J.E., Bierer, B.E., Margulies, D.H., Shevach, E.M., Strober, W. (Eds.), Current Protocols in Immunology. John Wiley & Sons, Inc., Hoboken, NJ, USA.

Hubbard, A.K., Rothlein, R., 2000a. Intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) expression and cell signaling cascades. Free Radical Biology and Medicine 28, 1379–1386. doi:10.1016/S0891-5849(00)00223-9

Hubbard, A.K., Rothlein, R., 2000b. Intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) expression and cell signaling cascades. Free Radical Biology and Medicine 28, 1379–1386. doi:10.1016/S0891-5849(00)00223-9

Ismail, A.M., Badawi, R.M., El-Agroudy, A.E., Mansour, M.A., 2009. Pretransplant detection of anti-endothelial cell antibodies could predict renal allograft outcome. Exp Clin Transplant 7, 104–109.

Isobe, M., Yagita, H., Okumura, K., Ihara, A., 1992. Specific acceptance of cardiac allograft after treatment with antibodies to ICAM-1 and LFA-1. Science 255, 1125–1127.

Jackson, A.M., Lucas, D.P., Melancon, J.K., Desai, N.M., 2011. Clinical relevance and IgG subclass determination of non-HLA antibodies identified using endothelial cell precursors isolated from donor blood. Transplantation 92, 54–60. doi:10.1097/TP.0b013e31821b60e9

Jaffe, E.A., Nachman, R.L., Becker, C.G., Minick, C.R., 1973. Culture of human endothelial cells derived from umbilical veins. Identification by morphologic and immunologic criteria. J. Clin. Invest. 52, 2745–2756. doi:10.1172/JCI107470

Jansen, M.A.A., Otten, H.G., de Weger, R.A., Huibers, M.M.H., 2015. Immunological and Fibrotic Mechanisms in Cardiac Allograft Vasculopathy. Transplantation. doi:10.1097/TP.0000000000000848

Jin, C., Wang, S., Zhao, Y., Jin, S., Li, H., 2015. [Inhibitory effect of von Willebrand factor-cleaving protease on angiogenesis]. Zhonghua Xue Ye Xue Za Zhi 36, 602–606. doi:10.3760/cma.j.issn.0253-2727.2015.07.016

Kanzler, I., Seitz-Merwald, I., Schleger, S., Kaczmarek, I., Kur, F., Beiras-Fernandez, A., 2013. In Vitro Effects of ATG-Fresenius on Immune Cell Adhesion. Transplantation Proceedings 45, 1846–1849. doi:10.1016/j.transproceed.2013.01.079

Klein, C.L., Bittinger, F., Köhler, H., Wagner, M., Otto, M., Hermanns, I., Kirkpatrick, C.J., 1995. Comparative studies on vascular endothelium in vitro. 3. Effects of cytokines on the expression of E-selectin, ICAM-1 and VCAM-1 by cultured human endothelial cells obtained from different passages. Pathobiology 63, 83–92.

Klingel, K., Kandolf, R., 2004. Endomyokardbiopsie. Monatsschrift Kinderheilkunde 152, 611–619. doi:10.1007/s00112-004-0948-6

Koskinen, P.K., Lemström, K.B., Häyry, P.J., 1995. How cyclosporine modifies histological and molecular events in the vascular wall during chronic rejection of rat cardiac allografts. Am. J. Pathol. 146, 972–980.

Labarrere, C.A., Nelson, D.R., Faulk, W.P., 1997. Endothelial activation and development of coronary artery disease in transplanted human hearts. JAMA 278, 1169–1175.

Langer, H.F., Chavakis, T., 2009. Leukocyte - endothelial interactions in inflammation. Journal of Cellular and Molecular Medicine 13, 1211–1220. doi:10.1111/j.1582-4934.2009.00811.x

Lawson, C., Holder, A.L., Stanford, R.E., Smith, J., Rose, M.L., 2005. Anti-intercellular adhesion molecule-1 antibodies in sera of heart transplant recipients: a role in endothelial cell activation. Transplantation 80, 264–271.

Lee, K.H., Cho, H.-J., Kim, H.S., Lee, W.-J., Lee, S., Bang, D., 2002. Activation of extracellular signal regulated kinase 1/2 in human dermal microvascular endothelial cells stimulated by anti-endothelial cell antibodies in sera of patients with Behçet's disease. J. Dermatol. Sci. 30, 63–72.

Lehle, K., Schreml, S., Kunz-Schughart, L.A., Rupprecht, L., Birnbaum, D.E., Schmid, C., Preuner, J.G., 2008. mTOR inhibitors and calcineurin inhibitors do not affect adhesion molecule expression of human macro- and microvascular endothelial cells. J. Vasc. Res. 45, 333–342. doi:10.1159/000119199

Lim To, W.K., Kumar, P., Marshall, J.M., 2015. Hypoxia is an effective stimulus for vesicular release of ATP from human umbilical vein endothelial cells. Placenta 36, 759–766. doi:10.1016/j.placenta.2015.04.005

Lu, W., Palatnik, K., Fishbein, G.A., Lai, C., Levi, D.S., Perens, G., Alejos, J., Kobashigawa, J., Fishbein, M.C., 2011. Diverse morphologic manifestations of cardiac allograft vasculopathy: a pathologic study of 64 allograft hearts. J. Heart Lung Transplant. 30, 1044–1050. doi:10.1016/j.healun.2011.04.008

Lundqvist, E.N., Back, O., Nilsson, T.K., Rantapaadahlqvist, S., 1992. Prevalence of anti-endothelial cell antibodies in patients with autoimmune diseases. Clinical Rheumatology 11, 248–253. doi:10.1007/BF02207967

Luo, J.-C., Peng, Y.-L., Chen, T.-S., Huo, T.-I., Hou, M.-C., Huang, H.-C., Lin, H.-C., Lee, F.-Y., 2015. Clopidogrel inhibits angiogenesis of gastric ulcer healing via downregulation of vascular endothelial growth factor receptor 2. Journal of the Formosan Medical Association. doi:10.1016/j.jfma.2015.07.022

Marinkovic, G., Hibender, S., Hoogenboezem, M., van Broekhoven, A., Girigorie, A.F., Bleeker, N., Hamers, A.A.J., Stap, J., van Buul, J.D., de Vries, C.J.M., de Waard, V., 2013. Immunosuppressive drug azathioprine reduces aneurysm progression through inhibition of Rac1 and c-Jun-terminal-N-kinase in endothelial cells. Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol. 33, 2380–2388. doi:10.1161/ATVBAHA.113.301394

Mehra, N.K., Siddiqui, J., Baranwal, A., Goswami, S., Kaur, G., 2013. Clinical relevance of antibody development in renal transplantation. Ann. N. Y. Acad. Sci. 1283, 30–42. doi:10.1111/nyas.12034

Müller, A., Csernok, E., 2002. Was gibt es Neues bei systemischen Vaskulitiden? Zeitschrift für Rheumatologie 61, 610–612. doi:10.1007/s00393-002-0441-3

Olejarz, W., Bryk, D., Zapolska-Downar, D., Małecki, M., Stachurska, A., Sitkiewicz, D., 2014. Mycophenolic acid attenuates the tumour necrosis factor-α-mediated proinflammatory response in endothelial cells by blocking the MAPK/NF-κB and ROS pathways. Eur. J. Clin. Invest. 44, 54–64. doi:10.1111/eci.12191

Osborn, L., Hession, C., Tizard, R., Vassallo, C., Luhowskyj, S., Chi-Rosso, G., Lobb, R., 1989. Direct expression cloning of vascular cell adhesion molecule 1, a cytokine-induced endothelial protein that binds to lymphocytes. Cell 59, 1203–1211. doi:10.1016/0092-8674(89)90775-7

Palomo, M., Diaz-Ricart, M., Carbo, C., Rovira, M., Fernandez-Aviles, F., Escolar, G., Eissner, G., Holler, E., Carreras, E., 2009. The release of soluble factors contributing to endothelial activation and damage after hematopoietic stem cell transplantation is not limited to the allogeneic setting and involves several pathogenic mechanisms. Biol. Blood Marrow Transplant. 15, 537–546. doi:10.1016/j.bbmt.2009.01.013

Peng, D.M., Law, Y.M., Kemna, M.S., Warner, P., Nelson, K., Boucek, R.J., 2013. Donor-specific antibodies: can they predict C4d deposition in pediatric heart recipients? Pediatr Transplant 17, 429–435. doi:10.1111/petr.12075

Pober, J.S., 1999. Immunobiology of human vascular endothelium. Immunol. Res. 19, 225–232. doi:10.1007/BF02786490

Pohlman, T.H., Harlan, J.M., 2000. Adaptive Responses of the Endothelium to Stress. Journal of Surgical Research 89, 85–119. doi:10.1006/jsre.1999.5801

Połubińska, A., Staniszewski, R., Baum, E., Sumińska-Jasińska, K., Bręborowicz, A., 2013. Sulodexide modifies intravascular homeostasis what affects function of the endothelium. Adv Med Sci 58, 304–310. doi:10.2478/ams-2013-0016

Praprotnik, S., Blank, M., Levy, Y., Tavor, S., Boffa, M.C., Weksler, B., Eldor, A., Shoenfeld, Y., 2001a. Anti-endothelial cell antibodies from patients with thrombotic thrombocytopenic purpura specifically activate small vessel endothelial cells. Int. Immunol. 13, 203–210.

Praprotnik, S., Blank, M., Meroni, P.L., Rozman, B., Eldor, A., Shoenfeld, Y., 2001b. Classification of anti-endothelial cell antibodies into antibodies against microvascular and macrovascular endothelial cells: the pathogenic and diagnostic implications. Arthritis Rheum. 44, 1484–1494. doi:10.1002/1529-0131(200107)44:7<1484::AID-ART269>3.0.CO;2-Q

Praprotnik, S., Rozman, B., Blank, M., Shoenfeld, Y., 2000. Pathogenic role of anti-endothelial cell antibodies in systemic vasculitis. Wien. Klin. Wochenschr. 112, 660–664.

Rakić, S., Belić, B., Erceg, S., Jovanović, R., Kulić, Z., Stefanović, N., Belić, A., Uzurov, V., Spasojević, J., 1999. [Complications in the use of blood transfusions--alloimmunization in polytransfused patients]. Med. Pregl. 52, 375–378.

Robak, E., Kierstan, M.K., Kulczycka, L., Sysa-Jedrzejowska, A., 2007. [The role of endothelial cells in the pathogenesis of systemic lupus erythematosus]. Postepy Hig Med Dosw (Online) 61, 413–419.

Rose, M.L., 2000. Role of antibodies in transplant-associated cardiac allograft vasculopathy. Z Kardiol 89 Suppl 9, IX/11–15.

Salom, R.N., Maguire, J.A., Hancock, W.W., 1998. Endothelial activation and cytokine expression in human acute cardiac allograft rejection. Pathology 30, 24–29.

Satoh, S., Thomson, A.W., Nakamura, K., Warty, V., Todo, S., 1995. Circulating ICAM-1, E-selectin, IL-2 receptor, and HLA class I in human small bowel, liver, and small bowel-plus-liver transplant recipients. Transplantation 60, 558–562.

Schmid, C., Garritsen, H.S., Kelsch, R., Cassens, U., Baba, H.A., Sibrowski, W., Scheld, H.H., 1998. Suppression of panel-reactive antibodies by treatment with mycophenolate mofetil. Thorac Cardiovasc Surg 46, 161–162. doi:10.1055/s-2007-1010217

Schmid, C., Hirt, S., Scheld, H.H., n.d. Leitfaden Herztransplantation, 3. Auflage, 2009. ed. Steinkopff Verlag.

Shi, Q., Aida, K., Vandeberg, J.L., Wang, X.L., 2004. Passage-dependent changes in baboon endothelial cells--relevance to in vitro aging. DNA Cell Biol. 23, 502–509. doi:10.1089/1044549041562294

Shimoyama, M., Shimmura, S., Tsubota, K., Oguchi, Y., 1997. Suppression of nuclear factor kappa B and CD18-mediated leukocyte adhesion to the corneal endothelium by dexamethasone. Invest. Ophthalmol. Vis. Sci. 38, 2427–2431.

Smith, J.D., Yacoub, M.H., Rose, M.L., 1998. Endothelial cell activation by sera containing HLA antibodies is mediated by interleukin-1. Transplantation 66, 1229–1237.

Song, G., Zhao, X., Xu, J., Song, H., 2008. Increased expression of intercellular adhesion molecule-1 and vascular cell adhesion molecule-1 in rat cardiac allografts. Transplant. Proc. 40, 2720–2723. doi:10.1016/j.transproceed.2008.07.110

Stewart, S., Winters, G.L., Fishbein, M.C., Tazelaar, H.D., Kobashigawa, J., Abrams, J., Andersen, C.B., Angelini, A., Berry, G.J., Burke, M.M., Demetris, A.J., Hammond, E., Itescu, S., Marboe, C.C., McManus, B., Reed, E.F., Reinsmoen, N.L., Rodriguez, E.R., Rose, A.G., Rose, M., Suciu-Focia, N., Zeevi, A., Billingham, M.E., 2005. Revision of the 1990 working formulation for the standardization of nomenclature in the diagnosis of heart rejection. J. Heart Lung Transplant. 24, 1710–1720. doi:10.1016/j.healun.2005.03.019

Sumitran-Holgersson, S., 2008. Beyond ABO and human histocompatibility antigen: other histocompatibility antigens with a role in transplantation. Curr Opin Organ Transplant 13, 425–429. doi:10.1097/MOT.0b013e328307ebd7

Sun, Q., Cheng, Z., Cheng, D., Chen, J., Ji, S., Wen, J., Zheng, C., Liu, Z., 2011. De novo development of circulating anti-endothelial cell antibodies rather than pre-existing antibodies is associated with post-transplant allograft rejection. Kidney Int. 79, 655–662. doi:10.1038/ki.2010.437

Sun, Q., Liu, Z., Chen, J., Chen, H., Wen, J., Cheng, D., Li, L., 2008. Circulating anti-endothelial cell antibodies are associated with poor outcome in renal allograft recipients with acute rejection. Clin J Am Soc Nephrol 3, 1479–1486. doi:10.2215/CJN.04451007

Tanio, J.W., Basu, C.B., Albelda, S.M., Eisen, H.J., 1994. Differential expression of the cell adhesion molecules ICAM-1, VCAM-1, and E-selectin in normal and posttransplantation myocardium. Cell adhesion molecule expression in human cardiac allografts. Circulation 89, 1760–1768.

Thiene, G., Bruneval, P., Veinot, J., Leone, O., 2013. Diagnostic use of the endomyocardial biopsy: a consensus statement. Virchows Archiv 463, 1–5. doi:10.1007/s00428-013-1430-4

Toyoda, M., Galfayan, K., Galera, O.A., Petrosian, A., Czer, L.S., Jordan, S.C., 1997. Cytomegalovirus infection induces anti-endothelial cell antibodies in cardiac and renal allograft recipients. Transpl. Immunol. 5, 104–111.

Triolo, G., Triolo, G., Accardo-Palumbo, A., Carbone, M.C., Ferrante, A., Casiglia, D., Giardina, E., 1998. IgG anti-endothelial cell antibodies (AECA) in type I diabetes mellitus; induction of adhesion molecule expression in cultured endothelial cells. Clin. Exp. Immunol. 111, 491–496.

Vassalli, G., 2013. Dendritic cell-based approaches for therapeutic immune regulation in solid-organ transplantation. J Transplant 2013, 761429. doi:10.1155/2013/761429

Vestweber, D., 2007. Molecular mechanisms that control leukocyte extravasation through endothelial cell contacts. Ernst Schering Found Symp Proc 151–167.

Weigel, G., Grimm, M., Griesmacher, A., Seebacher, G., Sichrovsky, T., Wolner, E., Laufer, G., Müller, M.M., 2000. Adhesion molecule behavior during rejection and infection episodes after heart transplantation. Clin. Chem. Lab. Med. 38, 403–408. doi:10.1515/CCLM.2000.058

Weis, M., Pehlivanli, S., von Scheidt, W., 2000. Heart allograft endothelial cell dysfunction. Cause, course, and consequences. Z Kardiol 89 Suppl 9, IX/58–62.

Weis, M., von Scheidt, W., 1997. Cardiac allograft vasculopathy: a review. Circulation 96, 2069–2077.

Werner, I., Bogert, N.V., Stock, U.A., Moritz, A., Beiras-Fernandez, A., 2014. Dose/time-dependent modulation of the endothelial function through induction agents: non-depleting versus depleting agents. Transplant. Proc. 46, 2953–2956. doi:10.1016/j.transproceed.2014.06.055

Wilhelmi, M.H., Leyh, R.G., Wilhelmi, M., Haverich, A., 2005. Upregulation of endothelial adhesion molecules in hearts with congestive and ischemic cardiomyopathy: immunohistochemical evaluation of inflammatory endothelial cell activation. Eur J Cardiothorac Surg 27, 122–127. doi:10.1016/j.ejcts.2004.09.027

Wu, Y.-W., Lee, C.-M., Lee, Y.-T., Wang, S.-S., Huang, P.-J., 2003. Value of circulating adhesion molecules in assessing cardiac allograft vasculopathy. J. Heart Lung Transplant. 22, 1284–1287.

Xavier, P., Aires, P., Sampaio, S., Mendes, C., Monteiro, M., Alves, H., Oliveira, G., 2011. XM-ONE detection of endothelium cell antibodies identifies a subgroup of HLA-antibody negative patients undergoing acute rejection. Transplant. Proc. 43, 91–94. doi:10.1016/j.transproceed.2010.12.040

Yamamoto, T., Takahashi, Y., Kuno, S., Geshi, Y., Sasamori, Y., Mori, H., 1997. Effects of anti-endothelial cell antibody in pre-eclampsia on endothelin-1 release from cultured endothelial cells. Immunol. Cell Biol. 75, 340–344. doi:10.1038/icb.1997.52

Yamazaki, S., Isobe, M., Suzuki, J., Tojo, S., Horie, S., Okubo, Y., Sekiguchi, M., 1998. Role of selectin-dependent adhesion in cardiac allograft rejection. J. Heart Lung Transplant. 17, 1007–1016.

Yang, Q., Wu, W., Li, Q., Chen, C., Zhou, R., Qiu, Y., Luo, M., Tan, Z., Li, S., Chen, G., Zhou, W., Liu, Jiaxin, Yang, C., Liu, Jin, Li, T., 2015. High-Dose Polymerized Hemoglobin Fails to Alleviate Cardiac Ischemia/Reperfusion Injury due to Induction of Oxidative Damage in Coronary Artery. Oxid Med Cell Longev 2015, 125106. doi:10.1155/2015/125106

Zhao, C., Su, Y., Zhang, J., Feng, Q., Qu, L., Wang, L., Liu, C., Jiang, B., Meng, L., Shou, C., 2015. Fibrinogen-derived fibrinostatin inhibits tumor growth through anti-angiogenesis. Cancer Sci. doi:10.1111/cas.12797

9. Danksagungen

Zunächst möchte ich Prof. Schmid für die Möglichkeit der Durchführung der experimentellen Arbeiten danken.

Ganz herzlich danken möchte ich Frau Prof. Dr. Karla Lehle für die Überlassung dieser Arbeit, die viele Geduld, für die tatkräftige Unterstützung, viele Denkanstöße und letztendlich für die positive Erfahrung des wissenschaftlichen Arbeitens.

Weiterhin möchte ich Christina Leykauf, Katrin Bielenberg und Sara Bergmann meinen Dank aussprechen. Sie waren mir eine sehr große Hilfe bei der täglichen Laborarbeit und waren immer bereit, mir bei kleinen und großen Problemen im Laboralltag zu helfen. Mein spezieller Dank gilt Karin Hollnberger, die mir bei der Auswertung der AECA-Präparate hilfreich zur Seite stand.

Meinen Eltern, welche mir eine medizinische Berufsausbildung ermöglichten und mir immer zur Seite standen, möchte ich genauso danken wie meiner geliebten Barbara, die mich im täglichen Leben begleitet.