

IFB-Tx - Transplantationsimmunologie

■ Leiter: Prof. Dr. Christine Falk

Tel.: 0511/532-9745 • E-Mail: falk.christine@mh-hannover.de • www.ifb-tx.de

Forschungsprofil

Das Institut für Transplantationsimmunologie im IFB-Tx setzt sich aus der Forschungsgruppe Immunregulation und der Core Facility Diagnostic Centre zusammen, deren Mitarbeiter mit den entsprechenden Aufgaben in den Bereichen der immunologischen Forschung und des Immunmonitorings bei Transplantationspatienten betraut sind. Der Schwerpunkt der Core Facility liegt auf der Entwicklung neuer Strategien für das Immunmonitoring nach Organ- und Stammzelltransplantation, wobei sowohl die zellulären Komponenten des Immunsystems, T-, B-Lymphozyten, natürliche Killerzellen (NK-Zellen) und Monozyten, als auch die löslichen Mediatoren wie Zytokine, Chemokine und Wachstumsfaktoren in die Untersuchungen einbezogen werden. Dabei kommen vorwiegend Methoden wie die Mehrfarben-Durchflusszytometrie, die Luminex-basierte Multiplex-Technologie, die ELISpot-Technologie sowie klassische biochemische und molekularbiologische Techniken zum Einsatz. Je nach der von den klinischen Kollegen im Transplantationskontext formulierten Fragestellung wird ein darauf zugeschnittenes Immunmonitoring entworfen und ggf. neue Technologien dafür etabliert. Folgende zentrale Fragen stehen im Mittelpunkt der augenblicklichen Aktivitäten der Core Facility, die in enger Zusammenarbeit mit den klinischen Kollegen im IFB-Tx bearbeitet werden:

1. Welchen Einfluss haben verschiedene immunsuppressive Medikamente auf das T- und NK-Zellrepertoire und deren Funktion im Blut und im Biopsiegewebe von Patienten nach Organtransplantation am Beispiel der Nierentransplantation?
2. Welche zellulären Komponenten bzw. lösliche Faktoren im Blut eignen sich für das Monitoring der Effektivität der Immunsuppression nach pädiatrischer Lebertransplantation?
3. Welche Immunzellen und lösliche Mediatoren lassen sich in Perfusionslösungen nach Organtransplantation nachweisen und welche Rückschlüsse können daraus über den Zustand des Organs bzw. der Inflammation gezogen werden?

Einige Ergebnisse wurden zu diesem Themenkomplex bereits publiziert und werden in den Forschungsprojekten kurz dargestellt. Das vorrangige Ziel dieser Untersuchungen ist die Definition prädiktiver Marker im peripheren Blut, in Biopsiegewebe, etc., die eine individualisierte Einstellung der Immunsuppression erlauben und auf der Basis der feinjustierten Immunsuppression als Frühwarnsystem für Abstoßungskrisen fungieren können. Für die Auswahl der Marker mit dem größten klinisch relevanten Potenzial werden dabei neue statistische Programme mit principal component und unsupervised Cluster-Analysen, die für derartige Multiparameteranalysen geeignet sind, zum Einsatz kommen.

In der Forschungsgruppe Immunregulation stehen NK-Zellen im Fokus der Untersuchungen, die dabei auch die Entwicklung neuer Immunmonitoringstrategien unterfüttern. NK-Zellen exprimieren eine Vielfalt an Rezeptoren für HLA- und non-HLA-Liganden, mit Hilfe derer sie zwischen „selbst“ und „fremd“, also infiziert, entartet oder allogenen, erkennen können. Sie werden dabei durch eine Balance zwischen aktivierenden und inhibitorischen Signalen reguliert, wobei diese komplizierte Regulation auf der Ebene der Signalverschaltung in einer NK-Zelle gesteuert wird. Die Signaltransduktion in NK-Zellen unterscheidet sich an einigen Schnittstellen von der Signalverschaltung in T-Zellen, wodurch sich die unterschiedlichen Befunde aus den Untersuchungen an nierentransplantierten Patienten möglicherweise erklären

lassen. Dieser Aspekt wird ergänzt durch die Fragestellung, wie sich gewebsständige von peripheren NK-Zellen bzgl. ihres Phänotyps und ihrer Funktion unterscheiden. Die Erkenntnisse aus dem direkten Vergleich zwischen T-Zellen und NK-Zellen im Kontext der Immunsuppression nach Organtransplantation sollen dazu dienen, herauszufinden inwieweit NK-Zellen zukünftig als „Sensoren“ der Immunsuppression bzw. einer Abstoßungsreaktion eingesetzt und damit für die Optimierung des Immunmonitorings verwendet werden können.

Forschungsprojekte

Einfluss der Immunsuppression auf Natürliche Killerzellen und auf das Zytokinmilieu bei Patienten nach Organtransplantation

Natürliche Killerzellen als Teil des Angeborenen Immunsystems im Konzert der Immunreaktion

Im Konzert des Immunsystems nehmen Natürliche Killerzellen (NK-Zellen) eine zentrale Position in der Regulation einer Immunantwort ein, da sie als Teil des angeborenen Immunsystems an vorderster Front der Immunabwehr stehen und direkt mit „Fremd“-Antigenen jeglicher Art, also Pathogenen, Tumor- oder auch allopathogenen Zellen interagieren können. Für diese Interaktionen steht NK-Zellen eine Fülle von mehr als 20 Oberflächenrezeptoren zur Verfügung, die eine Erkennung von infizierten, maligne transformierten oder allopathogenen Zellen auf unterschiedlichen Ebenen ermöglichen. Diese Rezeptoren werden auch als Marker für die Unterscheidung der verschiedenen NK-Zellsubpopulationen verwendet, wobei sich die Untersuchungen bislang vorwiegend auf NK-Zellen aus dem peripheren Blut konzentrierten. Die Hauptfunktionen natürlicher Killerzellen bestehen einerseits in ihrer zytotoxischen Aktivität, mit der sie fremde Zellen über die Freisetzung von Zytotoxinen wie Granzym A, B oder Perforin abtöten können, und andererseits in der Freisetzung von Zytokinen und Chemokinen, ausgelöst durch Rezeptor-vermittelte Signale, mit deren Hilfe sie eine Immunreaktion in Richtung Th1-, Th2 oder Th17-Immunantwort dirigieren können (Abb. 1). Diese Regulation erfolgt in einer koordinierten Aktion mit dendritischen Zellen und determiniert sowohl die spätere spezifische T-Zellreaktion als auch die antikörper-produzierende B-Zellreaktion. Als Folge einer fulminanten Immunreaktion kann häufig eine Gewebereaktion beobachtet werden, die beispielsweise an einer Endothelaktivierung oder der Chemokinproduktion parenchymatischer Zellen abzulesen ist. Es kann also im Zuge einer immunologischen Entzündung eine Gewebentzündungsreaktion ausgelöst werden, die sich anhand der von nicht-Immunzellen freigesetzten Entzündungsmediatoren, wie Zytokinen, Chemokinen und Wachstumsfaktoren, von der reinen Immunreaktion unterscheiden lässt. Dieses Zusammenspiel der immunologischen und der gewebespezifischen Entzündungsparameter determiniert unserer Hypothese nach sowohl das klinische Erscheinungsbild einer Entzündungsreaktion, als auch deren Nachhaltigkeit in puncto Gewebedestruktion. Daraus ergibt sich die Möglichkeit einer therapeutischen Relevanz, denn demnach ließe sich eine reine immunologische Reaktion mit Steroiden alleine unterdrücken, wohingegen sich eine parallel ablaufende Gewebereaktion als steroidrefraktär darstellen würde. Diese Hypothese wurde anhand einer Untersuchung an Patienten mit schwerer chronischer Graft-versus-Host-Reaktion (GVHD) nach Stammzelltransplantation bestätigt, in der die Ratio angiogenetischer Faktoren wie VEGF und Angiopoietin-2 bereits vor Stammzelltransplantation die Sensitivität bzw. Resistenz gegenüber einer Steroidtherapie determiniert.

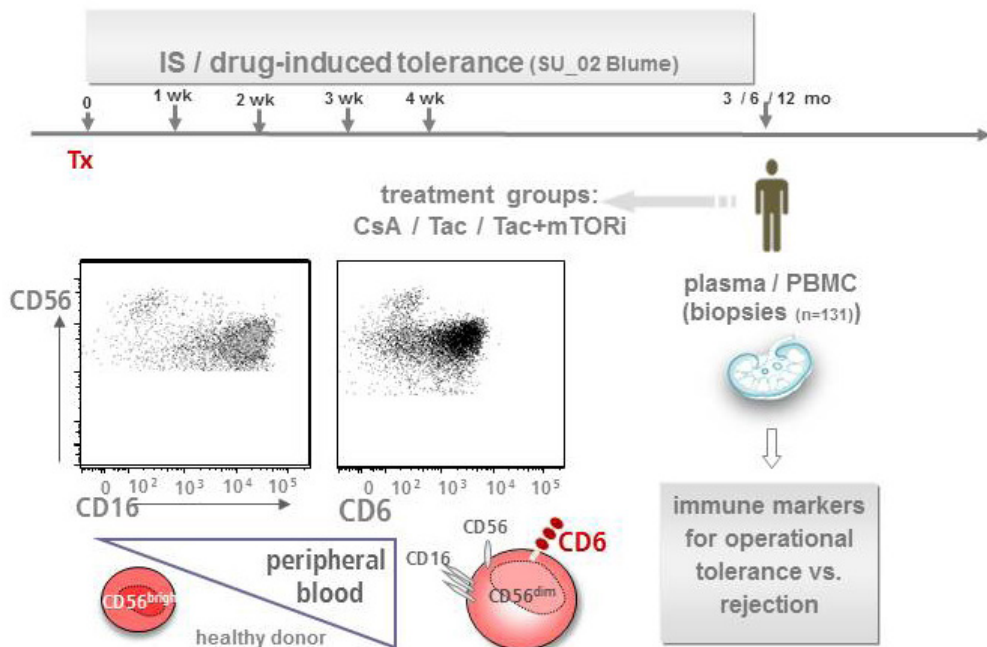


Abb. 2: Übersicht über die Untersuchungen zum Einfluss der Immunsuppression auf NK-Zellen bei Patienten nach Nierentransplantation.

Aus dem peripheren Blut der Nierentransplantationspatienten, die im Zuge des Protokollbiopsieprogramms zwischen 3 Monaten und 12 Jahren nach Transplantation untersucht wurden, konnte mittels Mehrfarben-Durchflusszytometrie sowohl die Lymphozytenzahl („TruCount“-Analysen), sowie das NK-Zellrepertoire bzgl. der Hauptpopulationen der CD56dimCD16+CD6+ und CD56brightCD16-CD6- NK-Zellen bestimmt werden. Dabei ließ sich kein Zusammenhang zwischen der NK-Zellzahl/µl Vollblut und der Zeit nach Transplantation herstellen. Dagegen war ein Einfluss von donor-spezifischen Antikörpern (DSA) auf die Frequenz der CD56dim NK-Zellen im Blut erkennbar, da diese Fraktion signifikant vermindert war (Daten nicht gezeigt). Darüber hinaus konnten signifikante Unterschiede in der Verteilung verschiedener NK-Zellsubpopulationen zwischen nierentransplantierten Patienten und gesunden Blutspendern festgestellt werden, wobei sich zugleich ein starker Einfluss der Immunsuppression aufzeigen ließ. Auffallend ist zunächst, dass bei den nierentransplantierten Patienten im Vergleich zu gesunden Spendern eine signifikante Verminderung der CD16, und der der CD6 Expression auf CD56dim NK-Zellen zu beobachten ist (Abb. 3). Dabei unterscheiden sich die CsA- und die Tac-behandelten Patienten nochmals signifikant voneinander, wobei der Verlust der CD16 und CD6-Expression in der Tac-Gruppe am stärksten ist. Dies wird in der Analyse der CD56dimCD16+CD6+ NK Zellpopulation besonders deutlich, da dieses NK-Subset in der Tac-Gruppe signifikant erniedrigt ist. Dieser Befund ist insofern überraschend, als CsA und Tac einen sehr ähnlichen Wirkmechanismus besitzen, der bisher weitgehend in T-Zellen erforscht wurde. Beide Inhibitoren binden an den Calcineurin/FKBP12-Komplex und verhindern damit die Dephosphorylierung und Translokation des NFAT-Transkriptionsfaktors, dessen transkriptionelle Aktivierung der IL-2, IFN- γ und IL12-Promotoren dadurch unterbunden wird. Diese Inhibition wirkt sich offensichtlich auch auf die NK-Zellaktivierung aus, da der Aktivierungsmarker CD69 auf den NK-Zellen der Tac-behandelten Patienten signifikant erniedrigt war im Gegensatz zu NK-Zellen der CsA-Patientengruppe. Interessanterweise waren nicht alle NK-Rezeptoren von dieser Modulation betroffen, denn die Immunsuppression zeigte keine Auswirkung auf die Expression des aktivierenden Rezeptors DNAM-1 (CD226) (Daten nicht gezeigt). Im Gegensatz zu diesen aktivierenden Rezeptoren ließ sich eine erhöhte Expression des inhibi-

torischen CD94/NKG2A-Komplexes auf NK-Zellen der Tac-Patienten im Vergleich zu CsA-Patienten nachweisen. Die molekulare Grundlage für diese Verminderung des CD16, CD6 und CD69-Rezeptoren und der Erhöhung des CD94/NKG2A-Komplexes auf NK-Zellen durch Tacrolimus wird derzeit eingehend untersucht. In vitro-Experimente an peripheren NK-Zellen gesunder Spender zeigten bereits den Einfluss der Calcineurin-Inhibitoren auf die Expression der o.g. Marker nach 24 bzw. 48 h, was darauf hindeutet, dass von einer direkten Modulation der Expression durch diese Immunsuppressive ausgegangen werden kann (Daten nicht gezeigt).

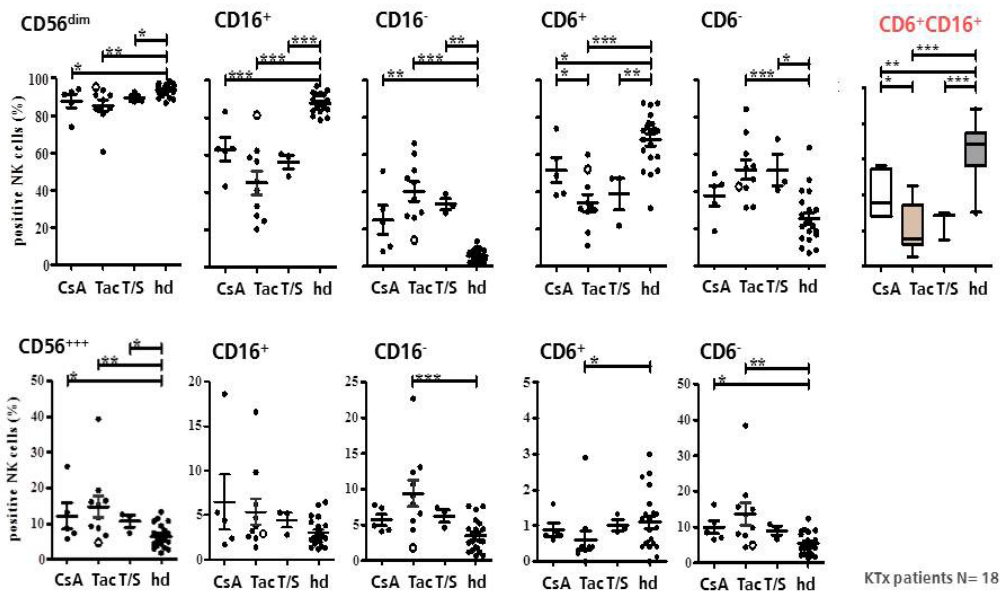


Abb. 3: Einfluss der Immunsuppression auf die Expression von CD16 und CD16 auf CD56dim, bzw. CD56+++ NK Zellen im peripheren Blut von Patienten nach Nierentransplantation. Die nierentransplantierten Patienten wurden in die Cyclosporin A (CsA), die Tacrolimus (Tac) und die niedrig-Dosis-Tac + mTOR Inhibitor (T/S) Gruppen eingeteilt. Die Expressionsdichte der Marker CD16 und CD6 wurde mittels Durchflusszytometrie bestimmt, wobei die NK-Zellen in CD56dim und die CD56+++ Subpopulation unterteilt wurden. Der Einfluss der Immunsuppressionsform auf den NK-Zellphänotyp war für einige Konstellationen signifikant (Mann-Whitney-U-Test).

Diese ersten Befunde des differentiellen Einflusses verschiedener Immunsuppressiva auf die Expression dieser NK-Zellrezeptoren wird derzeit auf weitere NK-Marker ausgedehnt, wobei die inhibitorischen Rezeptoren der „killer-immunoglobuline-like“ Rezeptorfamilie (KIR), NKG2D, CD161 (NKR1-A) sowie Aktivierungsmarker wie HLA-DR und Nkp44 im Vordergrund stehen. Neben diesen Befunden auf NK-Zellseite wurden bereits erste Ergebnisse von bestimmten T-Zell- und B-Zell-Populationen erhoben, die aktuell in Korrelation zu der immunsuppressiven Therapie ausgewertet werden. Aus diesen Arbeiten erwarten wir weitere neue Erkenntnisse über die Wirkung der verschiedenen Immunsuppressiva auf NK-Zellen, um eine Strategie zu entwickeln, inwieweit sich diese molekularen Veränderungen in der NK-Zellexpression dazu einsetzen lassen, zukünftig die Immunsuppression besser und vor allem individuell einstellen zu können.

Dieses Projekt wurde im SFB738 „Optimization of conventional and innovative transplants“ Projekt B8 und im IFB-Tx (BMBF, Förderkennzeichen 01EO0802) gefördert und basierte auf der Kooperation mit der Abt. für Nieren- und Hochruckerkrankungen und der Abt. für Abdominal- und Transplantationschirurgie.

Immunmonitoring der Immunsuppression bei Kindern nach Lebertransplantation

In der pädiatrischen Organtransplantation, speziell der pädiatrischen Lebertransplantation, stellt sich in besonderem Maße die Frage, anhand welcher, aus dem Blut gut quantifizierbarer, Parameter die Effektivität der initialen Immunsuppression nach Transplantation gemessen werden kann. Dabei steht zwar zunächst die Frage nach der Wirkung der verschiedenen Immunsuppressiva auf Lymphozytensubpopulationen und das Zytokin-/Chemokinmilieu im Blutplasma im Vordergrund, verknüpft ist aber gleichzeitig die Intention, eine sich anbahnende Abstoßungsreaktion früher erkennen und damit rechtzeitig supprimieren zu können, idealerweise bevor sie sich klinisch manifestiert. Ein schematischer Überblick über die Fragestellung der individuellen Einstellung auf dem schmalen Grat zwischen Über- und Unterimmunsuppression ist in Abb. 4 dargestellt.

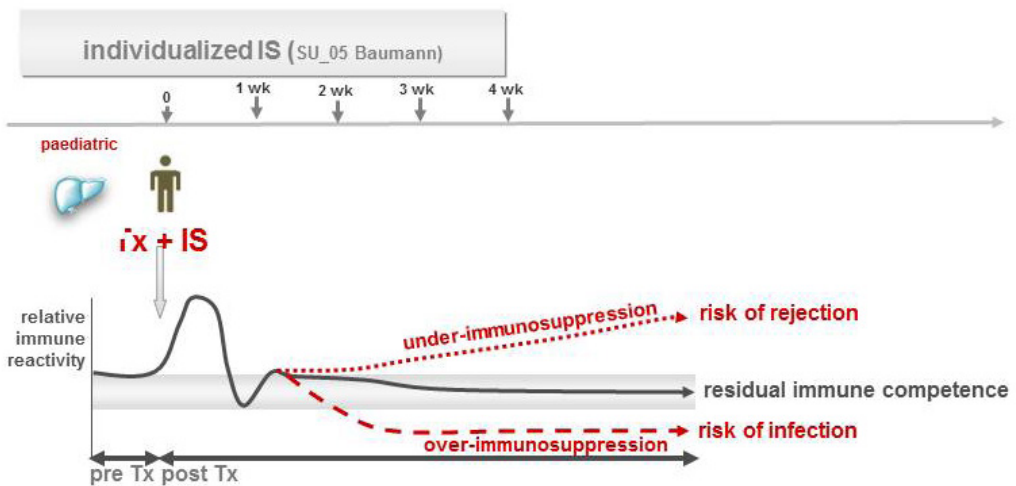


Abb. 4: Schematische Darstellung der Verlaufsformen der Immunsuppression nach pädiatrischer Organtransplantation. Das Ziel einer individualisierten Immunsuppression ist die Unterdrückung einer allogenen Abstoßungsreaktion bei gleichzeitiger Erhaltung der Protektion vor viralen und bakteriellen Infektionen. Eine Unterimmunsuppression ist daher mit einem erhöhten Rejektionsrisiko, bzw. eine Überimmunsuppression mit einem erhöhten Infektionsrisiko verbunden.

In enger Zusammenarbeit mit der Abteilung für pädiatrische Nephrologie, Gastroenterologie und Stoffwechselerkrankungen (Prof. Dr. U. Baumann) und der Abt. für Abdominal- und Transplantationschirurgie (PD Dr. F. Lehner) wurde bei 11 Kindern vor und in den ersten 6-8 Wochen nach Lebertransplantation im peripheren Blut die Verteilung der Lymphozytenpopulationen und deren Zellzahlen sowie der Verlauf der Zytokin- und Chemokinpiegel verfolgt. Dabei konnten drei Hauptmuster der Immunreaktion auf Lebertransplantation und Immunsuppression durch den Abgleich mit den klinischen Verläufen definiert werden: 1. Geringe Änderungen der Lymphozytenverteilung und des Zytokinmilieus im Blut, die sich auch klinisch inapparent erweisen. 2. Initiale Immunreaktion auf das Transplantat, die durch die Immunsuppression kontrolliert wird. 3. Initiale Immunreaktion, die sich in einer Kettenreaktion zu einer Abstoßungskrise weiterentwickelt. Anhand von zwei Beispielen in Abb. 5, einer Abstoßungskrise mit Wechsel des Immunsuppressivums und einer limitierten Immunreaktion unter Immunsuppression lassen sich diese Szenarien durch die Unterschiede im Verhalten der Lymphozytenpopulationen und Zytokine bzw. Chemokine deutlich unterscheiden.

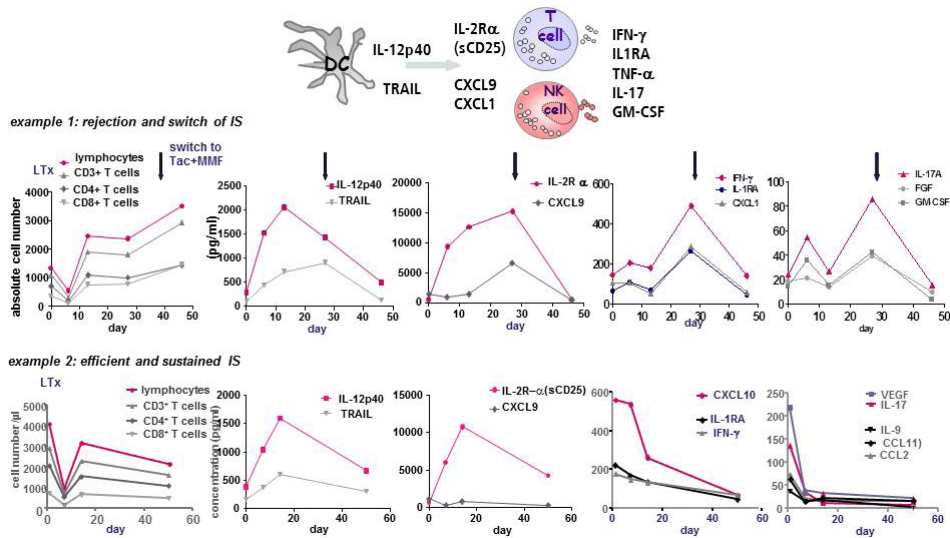


Abb. 5: Exemplarische Darstellung von zwei Reaktionsmustern nach pädiatrischer Lebertransplantation. Im Blut der Patienten wurde im Verlauf der ersten Wochen nach Transplantation sowohl die Zellzahl der einzelnen Lymphozytenpopulationen (pro μ l Vollblut), als auch die Konzentrationen der Zytokine und Chemokine bestimmt. Die unterschiedlichen Verläufe korrelieren dabei mit den klinischen Befunden einer durch Leberbiopsie bestätigten Abstoßung (obere Reihe) bzw. einem klinisch unauffälligem Verlauf.

Im Fall der Abstoßungskrise läuft die Immunreaktion über Zytokine der angeborenen Immunantwort wie IL-12p40, CXCL9 an, gefolgt von einer starken Antwort des adaptiven Immunsystems, nämlich der T- und NK-Zellaktivierung, die sich an den deutlich ansteigenden IFN- γ , sCD25, IL-17-Spiegeln sowie dem Anstieg der Lymphozyten im Blut ablesen lässt. Die im Zuge der biopsiebestätigten Rejektion ausgelöste Immunreaktion konnte durch den Wechsel des Immunsuppressivums wieder unterdrückt werden, was sich anhand der gesunkenen Zytokin- und Chemokin-Spiegel darstellen ließ. Im Gegensatz dazu konnte im zweiten Fall die initiale Aktivierung von IL-12 und sCD25 durch die effektive Immunsuppression keine Aktivierung des adaptiven Immunsystems induzieren, was an den stark abfallenden Zytokin- und Chemokin-Spiegeln bereits kurz nach Transplantation erkennbar ist. In diesem Falle ist von einer effektiven und nachhaltigen Immunsuppression auszugehen, da auch nach 6 Wochen noch niedrige Zytokinspiegel nachzuweisen sind. Aus diesen ersten Befunden lässt sich die Hypothese aufstellen, dass das engmaschige Immunmonitoring von Lymphozytensubpopulationen und Zytokinen, Chemokinen etc. im Blut der Patienten nach pädiatrischer Lebertransplantation dazu geeignet ist, die individuelle Reaktion des Empfängers auf Transplantation und Immunsuppression zu messen und bzgl. der Entwicklung in Richtung unauffälliger Reaktion vs. Abstoßungskrise zu interpretieren. Aus den Untersuchungen der nächsten Monate mit einer größeren Patientenzahl erwarten wir, dass sich das Profil der drei Reaktionstypen präziser definieren lässt und damit zukünftig ein „Frühwarnsystem“ für Komplikationen durch Über- bzw. Unterimmunsuppression erstellt werden kann.

Dieses Projekt wurde im IFB-Tx (BMBF, Förderkennzeichen 01EO0802) gefördert und basierte auf der Kooperation mit der Abteilung für pädiatrische Nephrologie, Gastroenterologie und Stoffwechselerkrankungen und der Abteilung für Abdominal- und Transplantationschirurgie.

■ Projektleitung: Christine Falk (Prof. Dr.); Kooperationspartner: Haller, Hermann (Prof. Dr.), Blume, Cornelia (PD Dr.), Abteilung für Nieren- und Hochdruckerkrankungen; Baumann, Ullrich (Prof. Dr.), Scherpunktprofessor Pädiatrische Gastroenterologie und Hepatologie, Lehner, Frank (PD Dr.), Abteilung für Abdominal-, Viszeral- und Transplantationschirurgie; Förderung: IFB-Tx BMBF, DFG SFB738

Weitere Forschungsprojekte

The role of the activating receptors CD6 and DNAM-1 for human NK cell function in solid organ transplantation

■ Projektleitung: Falk, Christine, (Prof. Dr. rer. nat.); Kooperationspartner: Sonderforschungsbereich SFB738; Förderung: DFG SFB738 Optimization of Conventional and Innovative Transplants, Projekt B8

The role of natural killer cells for the transition from hepatitis to hepatocellular carcinoma

■ Projektleitung: Falk, Christine, (Prof. Dr. rer. nat.); Kooperationspartner: Transregio Sonderforschungsbereich TRR77; Förderung: Transregio-Sonderforschungsbereich TRR77 "Liver Cancer - From Molecular Pathogenesis to Targeted Therapies" Projekt A3

"Vaccination in the Immunocompromized host"

■ Projektleitung: Falk, Christine, (Prof. Dr. rer. nat.), Hammerschmidt, Wolfgang (Prof. Dr.), HZMGU, München; Kooperationspartner: DZIF Partner; Förderung: Deutsches Zentrum für Infektionsforschung (DZIF) BMBF

Originalpublikationen

Blume C, Felix A, Shushakova N, Gueler F, Falk CS, Haller H, Schrader J. Autoimmunity in CD73/Ecto-5'-nucleotidase deficient mice induces renal injury. *PLoS One*; 2012;7(5):e37100

Dietrich S, Falk CS, Benner A, Karamustafa S, Hahn E, Andrusis M, Hegebart U, Ho AD, Dreger P, Luft T. Endothelial Vulnerability and Endothelial Damage Are Associated with Risk of Graft-versus-Host Disease and Response to Steroid Treatment. *Biol Blood Marrow Transplant*; 2013;19(1):22-27

Schlecker E, Stojanovic A, Eisen C, Quack C, Falk CS, Umansky V, Cerwenka A. Tumor-Infiltrating Monocytic Myeloid-Derived Suppressor Cells Mediate CCR5-Dependent Recruitment of Regulatory T Cells Favoring Tumor Growth. *J Immunol*; 2012;189(12):5602-5611

Schmidt A, Oberle N, Weiss EM, Vobis D, Frischbutter S, Baumgrass R, Falk CS, Haag M, Brügger B, Lin H, Mayr GW, Reichardt P, Gunzer M, Suri-Payer E, Krammer PH. Human regulatory T cells rapidly suppress T cell receptor-induced Ca(2+), NF-kappaB, and NFAT signaling in conventional T cells. *Sci Signal*; 2011;4(204):ra90

Sevko A, Kremer V, Falk C, Umansky L, Shurin MR, Shurin GV, Umansky V. Application of paclitaxel in low non-cytotoxic doses supports vaccination with melanoma antigens in normal mice. *J Immunotoxicol*; 2012;9(3):275-281

Sevko A, Sade-Feldman M, Kanterman J, Michels T, Falk CS, Umansky L, Ramacher M, Kato M, Schadendorf D, Baniyash M, Umansky V. Cyclophosphamide Promotes Chronic Inflammation-Dependent Immunosuppression and Prevents Antitumor Response in Melanoma. *J Invest Dermatol*; 2012;DOI: 10.1038/jid.2012.444

Ukena SN, Velaga S, Goudeva L, Ivanyi P, Olek S, Falk CS, Gansler A, Franzke A. Human Regulatory T Cells of G-CSF Mobilized Allogeneic Stem Cell Donors Qualify for Clinical Application. *PLoS One*; 2012;7(12):e51644

Wachstein J, Tischer S, Figueiredo C, Limbourg A, Falk C, Immenschuh S, Blasczyk R, Eiz-Vesper B. HSP70 Enhances Immunosuppressive Function of CD4(+)CD25(+)FoxP3(+) T Regulatory Cells and Cytotoxicity in CD4(+)CD25(-) T Cells. *PLoS One*; 2012;7(12):e51747

Abstracts

2012 wurden 11 Abstracts publiziert.

Weitere Tätigkeiten in der Forschung

Falk, Christine (Prof. Dr.): Beirat der Dt. Gesellschaft für Immunologie (DGfI); 8. Spring School for Immunology, Organisationskomitee; International Melanoma Working Group (IMWG/AIM) Mitglied.