

Aus der Klinik für Allgemeine Chirurgie und Thoraxchirurgie
(komm. Direktor: Prof. Dr. Dr. D. Bröring)
im Universitätsklinikum Schleswig-Holstein, Campus Kiel
an der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

**ZUR BEDEUTUNG REGULATORISCHER T-ZELLEN
BEI DER INDUKTION OPERATIONALER TOLERANZ
(„WOFIE“-WINDOW OF OPPORTUNITY FOR IMMUNOLOGICAL
ENGAGEMENT):
ERGEBNISSE EINER RANDOMISIERTEN PROSPEKTIVEN STUDIE
NACH HUMANER LEICHENNIERENTRANSPLANTATION**

Inauguraldissertation
zur
Erlangung der Doktorwürde
der Medizinischen Fakultät
der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

vorgelegt von
FRANK HÄNDSCHE
aus Frankfurt (Oder)

Kiel 2010

Berichterstatter:

Priv. –Doz. Dr. B. Dreßke

Berichterstatter:

Prof. Dr. D. Kabelitz

Tag der mündlichen Prüfung:

02. Juni 2010

Zum Druck genehmigt, Kiel, den

02. Juni 2010

gez.:

Prof. Dr. Dr. D. Bröring

Inhaltsverzeichnis	Seite
1. Einleitung	1
1.1 Transplantattoleranz und die Rolle regulatorischer CD4 ⁺ CD25 ⁺ T-Lymphozyten	2
1.2 WOFIE (window of opportunity for immunologic engagement) oder “operationale Toleranz”	4
2. Fragestellung	7
3. Material und Methoden	8
3.1 Aufbau der Studie, Selektion und Überwachung der Patienten	8
3.1.1 Studiendesign	8
3.1.2 Ein- und Ausschlusskriterien	8
3.1.3 Immunsuppressives Protokoll	8
3.2 Durchflußzytometrische Untersuchungen und Isolation der Lymphozyten	9
3.2.1 Isolation der Lymphozyten aus Patienten-Vollblut	9
3.2.2 Antikörpermarkierung der Lymphozyten	10
3.3 PCR (Polymerase chain reaction) und Real-Time-PCR	

zur Ermittlung der Foxp3-Expression CD4 ⁺ CD25 ⁺ T-Lymphozyten	12
3.3.1 Isolation der CD4 ⁺ CD25 ⁺ T-Lymphozyten mittels Dynabeads® CD4 und Dynabeads® CD25	12
3.3.2 Extraktion der RNA aus den isolierten CD4 ⁺ CD25 ⁺ Zellen mittels optimierter Guanidinisothiocyanat/Phenol Methode	12
3.3.3 Synthese der cDNA	13
3.3.4 Analyse der erhaltenen cDNA durch PCR und Agarosegel-Elektrophorese	14
3.3.5 Durchführung der Real-Time-PCR mit SYBR® Grün	15
3.4. Statistik	16
4. Ergebnisse	17
4.1 Klinische Verlaufparameter	17
4.1.1 Demographische Daten	17
4.1.2 Patienten- und Transplantatüberleben, steroidfreie Dauermedikation und Inzidenz akuter primärer Abstoßungsreaktionen	17
4. 2 Durchflußzytometrische Analyse lymphozytärer Subpopulationen im peripheren Blut	19
4.2.1 CD19 ⁺ B-Lymphozyten	19

4.2.2	CD3 ⁺ 16 ⁺ 56 ⁺ natürliche Killerzellen (NK-Zellen)	20
4.2.3	CD3 ⁺ T-Lymphozyten (pan-T-Zellen)	21
4.2.4	CD3 ⁺ CD8 ⁺ T-Lymphozyten (Suppressor- und zytotoxische T-Zellen)	22
4.2.5	CD3 ⁺ CD4 ⁺ T-Lymphozyten (T-Helferzellen)	23
4.2.6	CD4 ⁺ CD25 ⁺ T-Lymphozyten (regulatorische T-Zellen, T _{regs})	24
4.3	Analyse der FoxP3 Expression isolierter CD4 ⁺ CD25 ⁺ T-Lymphozyten (semiquantitative PCR mit anschließender realtime-PCR)	26
5.	Diskussion	29
6.	Zusammenfassung	37
7.	Literaturverzeichnis	39
8.	Anhang	62
9.	Danksagung	65
10.	Lebenslauf	66

1. EINLEITUNG

Die Nierentransplantation hat sich in den letzten 40 Jahren zu einem etablierten Therapieverfahren bei der kurativen Behandlung der terminalen Niereninsuffizienz entwickelt. Seit der ersten erfolgreichen Transplantation 1954 in Boston von Murray et al. (Murray et al., 1955) zwischen eineiigen Zwillingen wurden weltweit über 500.000 Nierentransplantationen in mehr als 500 Zentren durchgeführt. Durch die stete Entwicklung immunsuppressiver Substanzen konnte die Rate akuter Transplantatabstoßungen seit Beginn der Nierentransplantation deutlich gesenkt werden. Betrug die Inzidenz primärer akuter Transplantatabstoßungen in den 70-iger Jahren noch 50%, so erfahren heutzutage nur noch 25% aller nierentransplantierten Patienten eine akute Transplantatabstossung (Goral und Helderman, 1997; Hariharan et al., 2000). Die zur Zeit verfügbaren Immunsuppressiva greifen aufgrund ihres Wirkungsmechanismus in verschiedene Schritte der alloreaktiven Immunantwort des Empfängers ein. Glukokortikoide (Prednison, Prednisolon und Methylprednisolon) werden zur Dauerimmunsuppression und zur Therapie akuter Transplantatrejektionen eingesetzt. Sie besitzen durch Hemmung der Phospholipase A2 einen antiinflammatorischen Effekt und inhibieren zudem die Bildung von IL-1 und anderen Zytokinen sowie die Expression von Adhäsionsmolekülen auf dendritischen Zellen und Makrophagen (Lu et al., 1993, Kitajima et al., 1996). Calcineurininhibitoren (Cyclosporin A und Tacrolimus) bilden zusammen mit Glukokortikoiden die Basisimmunsuppression nach solider Organtransplantation. Nach Bindung an Immunophiline blockieren sie die Phosphataseaktivität von Calcineurin, welches für die Translokation des nuklearen Faktors (NFAT) aktivierter T-Lymphozyten benötigt wird. Durch die Hemmung von NFAT, welcher für die Induktion von IL-2 und anderen Zytokinen erforderlich ist, werden T-Zell-Wachstum und –Differenzierung inhibiert (Suthanthiran et al., 1996; Rao, 1994). Inhibitoren der Guanodinucleotid-de-novo-Synthese wie das Mycophenolat-mofetil (Allison und Eugui, 1996), welche einen antiproliferativen Effekt auf vornehmlich T- und B-Lymphozyten besitzen, haben Azathioprin weitestgehend in der immunsuppressiven Dauertherapie ersetzt (Sollinger, 1995). Sie zeigen keine Nephrotoxizität und werden zur Dosisreduktion des Calcineurininhibitors oder bei eingeschränkter Nierenfunktion statt dieser eingesetzt (Pallardo et al., 2007). Sirolimus (Rapamycin) und sein Derivat Everolimus gehören zu

den mTOR-Kinase-Inhibitoren und führen zu einer Hemmung der intrazellulären IL-2 Signaltransduktion und somit zu einer Hemmung T-Lymphozytenaktivierung (Kahan, 1997). Aufgrund ihres antiproliferativen Effektes und ihrer fehlenden Nephrotoxizität finden sie ihren Einsatz vornehmlich nach Malignomerkrankungen oder bei Auftreten einer calcineurininhibitorbedingten Niereninsuffizienz. Monoklonale Antikörper gegen pan-T-Zellen (OKT3) oder IL-2-Rezeptorantagonisten, wie die in der vorliegenden Studie verwendeten anti-CD25-Antikörper Daclizumab und Basiliximab, finden ihren Einsatz in der Therapie steroidresistenter Abstoßungen (OKT3) oder in der Induktionstherapie (OKT3, CD25-Antikörper) (Chatenoud, 1995; Patlolla et al., 2006). Obwohl die Inzidenz akuter Transplantatabstoßungen kontinuierlich gesenkt werden konnte, blieb in den vergangenen Jahren eine signifikante Verbesserung des Langzeittransplantat- und Patientenüberlebens aus (Hariharan et al., 2000). Ursächlich sind vornehmlich Nebenwirkungen der immunsuppressiven Medikation, denen der transplantierte Patient dosisabhängig ausgesetzt ist. Neben Infektionen und Malignomen (Silkensen, 2000) führen insbesondere die kardiovaskulären Nebenwirkungen zu einer erhöhten Spätmorbidity und -letalität (Boots et al., 2004) und sind für mehr als 50% aller Todesfälle bei Patienten mit funktionsfähigem Nierentransplantat verantwortlich (Kasiske et al., 2000). Eine verminderte Glukosetoleranz (Jindal et al., 1997), Hyperlipidämie und Bluthochdruck sind neben Osteoporose und Katarakt bekannte Nebenwirkungen, die bei regelmäßiger Steroideinnahme auftreten (Cittero, 2001). Calcineurininhibitoren zeigen ein zu den Kortikosteroiden synergistisches kardiovaskuläres Nebenwirkungsprofil, wobei Tacrolimus im Vergleich zu Cyclosporin A mit einer geringeren Inzidenz von Bluthochdruck und Hyperlipidämie assoziiert zu sein scheint (Shapiro, 2000; Mc Cune et al., 1998), jedoch eine stärkere diabetogene Wirkung aufweist (Pirsch et al., 1997). Desweiteren findet sich hier eine deutliche Neuro- und Nephrotoxizität. In 60-70% aller Protokollbiopsien nach Nierentransplantation können bereits nach 2 Jahren histologische Zeichen einer chronischen Transplantatnephropathie nachgewiesen werden (Solez et al., 1998).

1.1 Transplantattoleranz und die Rolle regulatorischer CD4⁺CD25⁺ T-Lymphozyten

Seit Beginn der Forschung auf dem Gebiet der Transplantationsmedizin durch Billingham, Brent und Medawar in den frühen 50-ziger Jahren besteht daher das Ziel

spenderspezifische Toleranz zu induzieren, um auf eine immunsuppressive Therapie mit ihren Nebenwirkungen verzichten zu können (Billingham, Brent und Medawar, 1953). Bei der experimentellen Induktion von Toleranz werden zentrale und periphere Mechanismen unterschieden. Bei der zentralen Toleranz wird nach Eradikation des Empfängerimmunsystems und einer darauf folgenden Transplantation von Spenderstammzellen ein Chimärismus erzeugt. Spender- und Empfänger-Lymphozyten existieren im selben Organismus und zweizeitig transplantierte Organe des Knochenmarksspenders werden nicht mehr als fremd erkannt (Nikolic und Sykes, 1997). Da die Induktion zentraler Toleranz ein hochtoxisches Protokoll, bestehend aus Bestrahlung und Hochdosis-Chemotherapie, umfasst, ist es jedoch für die klinische Anwendung des schwer kranken Patientengutes kaum geeignet. Die Induktion peripherer Toleranz umfasst die Mechanismen Deletion und Apoptose, Anergie sowie die Regulation oder Suppression von T-Lymphozyten (Lechler et al., 2003). Erfolgt der Kontakt mit einem bestimmten Antigen ohne entsprechenden Co-Stimulus, zum Beispiel bei Blockade kostimulatorischer Signale wie CD28 oder CD154, kommt es zu einer inkompletten T-Zellaktivierung, der Anergie und Apoptose folgen (Knoop et al., 1995). Eine chronische Alloantigenstimulation kann, wie nach experimenteller Lebertransplantation gezeigt, zu einer Deletion alloreaktiver T-Lymphozyten führen (Delves und Roitt, 2000, Janeway und Medzhitov, 2000). Die Vermittlung der T-Zellapoptose erfolgt primär durch Rezeptoren der TNF-Familie vermittelt, welche an Zellsignalproteine wie TRADD, FADD, FLICE und Caspase 3 binden. Es konnte gezeigt werden, dass periphere Deletion durch Apoptose eine Rolle bei der Induktion von Langzeitorganakzeptanz spielt (Kamada 1985; Calne et al., 1969). Neuere meist experimentelle Arbeiten konnten eindeutig zeigen, dass regulatorischen $CD4^+CD25^+$ T-Zellen (T_{regs}) eine entscheidende Rolle bei der Induktion von Toleranz zukommt (Gregori et al., 2001; Waldmann und Cobbold, 2001). Sakaguchi beschrieb 1995 erstmals $CD4^+$ Zellen, welche zusätzlich die α -Kette des IL-2 Rezeptors (CD25) exprimieren und eine wesentliche Rolle bei der Kontrolle von Autoimmunerkrankungen spielen (Sakaguchi et al., 1995). Spätere Arbeiten von Sakaguchi und Wood wiesen zudem nach, daß Tregs die Abstossung allogenen transplantierten Organe unterdrücken (Wood und Sakaguchi, 2003; Nishimura et al., 2004). Der Gruppe von Graca gelang es, die Persistenz regulatorischer T-Zellen in tolerierten murinen Herztransplantaten nachzuweisen (Graca et al., 2002). Diese Zellpopulation entwickelt sich im Thymus und stellt im nicht transplantierten Empfänger ca. 4% aller $CD4^+$ T-Zellen dar (Itoh, 1999).

Neben CD25 werden weitere Oberflächenmarker wie CD45RB, CTLA-4, GITR (Abk. engl.: glucocorticoid-induced TNF receptor family-related receptor), CD122, CD103, CD134 (OX40) (Wood und Sakaguchi, 2003) sowie Foxp3 (forkhead/winged helix transkription factor) (Hori et al., 2003) exprimiert. Foxp3 kodiert einen Transkriptionsfaktor und stellt somit ein Schlüsselgen für die Entwicklung und Funktion regulatorischer T-Zellen dar (Fontenot et al., 2003). So sind T_{regs} von Patienten mit Foxp3-Mutationen insuffizient, wodurch das Auftreten von Autoimmunerkrankungen begünstigt wird (Benett et al., 2001).

1.2 WOFIE (window of opportunity for immunologic engagement) oder “operationale Toleranz”

Trotz zunehmender Kenntnisse auf dem Gebiet der Transplantationsimmunologie und erfolgreicher Induktion spenderspezifischer Toleranz im Tiermodell (Calne, 1969; Kamada et al., 1981; Jones et al., 1990), ist es bislang nicht gelungen, diese Protokolle in die Klinik zu übertragen. Transplantattoleranz im klinischen Alltag bleibt nach wie vor ein seltenes, nicht vorhersehbares und vor allem nicht induzierbares Ereignis. Mit seiner WOFIE-Hypothese (WOFIE: „window of opportunity for immunological engagement“) stellte R. Calne erstmals ein klinisch anwendbares Konzept vor, welches eine deutliche Reduktion der Immunsuppression und der damit assoziierten Nebenwirkungen ermöglicht (Calne et al., 1994). Ausgehend von Beobachtungen nach spontaner Toleranz bei allogenen lebertransplantierten Schweinen, wo bereits initial nach Transplantation eine Anhäufung mononukleärer Zellen im Transplantat ohne histologische Anzeichen einer Transplantatabstoßung detektiert wurde (Calne et al., 1969), postulierte Calne, dass für die Induktion von Toleranz eine aktive Auseinandersetzung immunologischer Effektorzellen von Spender und Empfänger notwendig sei. Da die im klinischen Alltag übliche hochdosierte und unspezifische immunsuppressive Medikation diese immunologischen Prozesse verhindert, forderte Calne eine zeitlich limitierte Unterbrechung der Immunsuppression in der initialen Phase, ein sogenanntes „immunsuppressives Fenster“, um die für die Induktion von Toleranz notwendigen Interaktionen zwischen Spender und Empfänger zu bahnen (Calne, 1994). Eine 48-stündige Unterbrechung einer insgesamt 7-tägigen Immunsuppression mit dem Calcineurininhibitor Cyclosporin A führte im Schweinemodell zu einem Langzeitüberleben allogenen transplantierte Nieren von mehr als 100 Tagen (Calne et al., 1994). Dabei beschränkte sich die Transplantatakzeptanz auf

das Nierentransplantat, während zweizeitig transplantierte Vollhaut des gleichen Spenders abgestossen wurde. Auch in der gemischten Lymphozytenkultur fand sich eine zwar supprimierte, jedoch noch deutliche Alloreaktivität spenderspezifischer T-Lymphozyten, so dass es sich bei dem beobachteten Effekt nicht um eine klassische spenderspezifische Toleranz handelte. Dieser Zustand des Empfängerimmunsystems, in welchem das Transplantat mit niedrig dosierter Dauerimmunsuppression ohne erhöhte Abstoßungsgefahr akzeptiert wird, wurde von R. Calne als „operationale“ oder „Beinah“-Toleranz bezeichnet (Calne, 2004). Die Anwendung des WOFIE-Protokolls im Modell der heterotopen Herztransplantation in der Ratte zeigte unter Verwendung des Calcineurininhibitors Tacrolimus im Vergleich zu kontinuierlich immunsupprimierten Tieren ebenfalls eine signifikante Verlängerung des Transplantatüberlebens und konnte die von R. Calne aufgestellte Hypothese stützen (Dresske et al., 2004). Im Jahr 1999 wurde das WOFIE-Protokoll erstmals klinisch bei 31 Empfängern eines Leichennierentransplantates eingesetzt (Calne et al., 1999). Nach Induktion mit dem anti-CD52 Campath 1H und einem 2-maligen Steroidbolus wurde die immunsuppressive Therapie nach Transplantation für insgesamt 48 Stunden unterbrochen und anschließend als Monotherapie mit Cyclosporin A fortgeführt. Insgesamt fanden sich 6 steroidsensible Abstoßungsepisoden, 3 Patienten benötigten nach wiederholter Transplantatabstoßung eine Erweiterung ihrer Immunsuppression durch Azathioprin und Steroide. Bei 27 von 31 Patienten konnte die immunsuppressive Langzeittherapie jedoch bei stabilen Retentionsparametern steroidfrei mit Cyclosporin A in niedriger Dosierung durchgeführt werden. Trotz der ermutigenden Daten blieben in dieser ersten klinischen Anwendung des WOFIE-Protokolls viele für die klinische Etablierung essentielle Fragen offen. Eine Kontrollgruppe fehlte, klinische sowie laborchemische Verlaufsparemeter waren spärlich und auf immunologische Untersuchungen wurde verzichtet. Zudem war der hier angewandte monoklonale anti-CD52 Antikörper für die Nierentransplantation nicht zugelassen, und es war ungeklärt, ob der WOFIE-Effekt auch unter Anwendung etablierter Immunsuppressiva auftreten würde. Die der vorliegenden Arbeit zugrunde liegende klinische Kieler Studie an nierentransplantierten Patienten zeigte erstmals prospektiv unter kontrollierten Bedingungen und Anwendung etablierter Immunsuppressiva, dass Patienten nach 72-stündiger Unterbrechung der Immunsuppression im Vergleich mit kontinuierlich immunsupprimierten Patienten deutlich weniger Transplantatabstossungen erleiden, eine bessere Transplantatfunktion aufweisen und einer steroidfreien niedrigdosierten dualen Dauerimmunsuppression

zugeführt werden können (Dresske et al., 2003). Die immunologischen Vorgänge, welche an der Induktion operationaler Toleranz beteiligt sind, sind jedoch weiterhin ungeklärt, und die Frage nach der optimalen Immunsuppression für die Induktion von operationaler Toleranz kann nicht beantwortet werden. Zielsetzung der vorliegenden Arbeit war die Untersuchung immunologischer Effektorzellen der in die Studie randomisierten Patienten bis 2 Jahre nach Transplantation, um die für den WOFIE-Effekt bedeutsamen immunologischen Prozesse weiter zu klären. Dabei sollte insbesondere die für die Induktion von Transplantattoleranz essentielle Population regulatorischer CD4⁺CD25⁺ T-Zellen genauer analysiert werden.

2. FRAGESTELLUNG

Die für den in einer prospektiven, randomisierten und kontrollierten Studie nach allogener humaner Leichennierentransplantation beobachteten tolerogenen klinischen Effekt des WOFIE-Protokolls ursächlichen immunologischen Vorgänge wurden anhand folgender Fragestellungen untersucht:

1. Welchen Einfluss hat die initiale 72-stündige Unterbrechung der Immunsuppression auf die Frequenz und Verteilung lymphozytärer Subpopulationen im peripheren Blut innerhalb der ersten 2 Jahre nach Transplantation?
2. Inwieweit beeinflusst das immunsuppressive Protokoll (WOFIE versus kontinuierliche Immunsuppression) die Population peripherer regulatorischer $CD4^+CD25^+$ T-Zellen zu verschiedenen Zeitpunkten nach Transplantation?
3. Welche Auswirkung hat dabei die Applikation des anti-CD25 Antikörpers Daclizumab auf die Entwicklung und Präsenz regulatorischer $CD4^+CD25^+$ T-Zellen?
4. Findet sich eine Korrelation der Foxp3-Expression als spezifischer Marker regulatorischer T-Zellen zu dem beobachteten klinischen tolerogenen Effekt des WOFIE-Protokolls 2 Jahre nach allogener Leichennierentransplantation?

3. MATERIAL UND METHODEN

3.1 Aufbau der Studie, Selektion und Überwachung der Patienten

3.1.1 Studiendesign

In der vorliegenden offenen prospektiv randomisierten Studie wurden insgesamt 40 Patienten untersucht, welche ohne Verblindung im Verhältnis 1:1 in 2 Studienarme (Kontroll- und WOFIE-Arm) randomisiert wurden. Alle Probanden erhielten von Mai 2000 bis März 2003 ein Leichennierentransplantat in der Klinik für Allgemeine Chirurgie und Thoraxchirurgie des UK-SH, Campus Kiel und wurden für insgesamt 24 Monate beobachtet. Die Studie erfolgte mit Genehmigung der Ethikkommission des UK-SH, Campus Kiel (AZ: A158-99). Primäres Studienziel war es, den Einfluß eines initialen immunsuppressiven Fensters von 72 Stunden (WOFIE-Gruppe) auf Sicherheit und Effektivität eines frühen Steroidentzuges zu prüfen. Sekundäre Studienziele beinhalteten die Ermittlung akuter primärer Abstossungen, der Transplantatfunktion, medikamentöser Nebenwirkungen und, wie in der vorliegenden Arbeit dargestellt, die regelmäßige Untersuchung immunologischer Effektorzellen, insbesondere regulatorischer CD4⁺CD25⁺ T-Zellen, im peripheren Blut.

3.1.2 Ein- und Ausschlußkriterien

Patienten mit malignen Grunderkrankungen, aktiven Infektionen, Schwangerschaft und schweren psychischen Erkrankungen wurden von der Studie ausgeschlossen. Darüber hinaus mussten sich weibliche Probanden mit einer kontrazeptiven Medikation für 12 Monate einverstanden erklären. Ebenso führten pannel-reaktive Antikörper $\geq 80\%$ oder bekannte Allergien gegenüber der Studienmedikation zum Ausschluss. Die in die Studie rekrutierten Patienten waren terminal niereninsuffizient, zwischen 18 und 75 Jahren alt, und erhielten ein Erst- oder Zweitleichennierentransplantat. Alle Studienteilnehmer hatten vor Aufnahme in die Studie schriftlich ihr Einverständnis gegeben.

3.1.3 Immunsuppressives Protokoll

Beide Studiengruppen erhielten 2 Stunden vor Transplantation eine Induktionstherapie bestehend aus 250 mg Prednisolon (Decortin H[®], Merck, Darmstadt), 2 g Mycophenolat Mofetil (MMF, Cellcept[®], Hoffmann-La Roche AG, Grenzach-Wyhlen) und dem IL-2

Rezeptorantikörper Daclizumab (Zenapax[®], Hoffmann-La Roche AG, Grenzach-Wyhlen; Dosierung 1 mg/kg Körpergewicht). Intraoperativ wurde vor Organreperfusion nochmals 250 mg Prednisolon gegeben. Während in der Kontroll-Gruppe die immunsuppressive Medikation nach 6 Stunden postoperativ fortgeführt wurde, wurde diese in der WOFIE-Gruppe für 72 Stunden pausiert. Die Dauerimmunsuppression während der ersten 8 Wochen nach Transplantation umfasste in beiden Studienarmen Tacrolimus (Prograf[®], Astellas, München) mit einem Talspiegel von 10-12 ng/ml in der ersten Woche nach Transplantation und von 5-10 ng/ml ab dem 8. Tag nach Transplantation, MMF (1-2g/Tag), Daclizumab (1 mg/kg Körpergewicht 2, 4, 6 and 8 Wochen nach Transplantation), sowie Prednisolon in einer Erhaltungsdosis von 10 mg/Tag nach initialer Dosisreduktion. Eine schrittweise Reduktion des Prednisolon (um 2.5 mg Prednisolon alle 1 bis 2 Wochen) erfolgte in beiden Gruppen über einen Zeitraum von 4-8 Wochen ab der 8. Woche nach Transplantation. Nach Entzug der Steroide wurde die Immunsuppression in beiden Studiengruppen als Dualtherapie mit MMF (1-2g/Tag) und Tacrolimus (Talspiegel 5-10 ng/ml) fortgesetzt. Transplantatabstoßungen wurden bioptisch gesichert und im Institut für Pathologie des Universitätsklinikums Schleswig-Holstein Campus Kiel nach der Banff-Klassifikation (Racusen et al., 1999) klassifiziert. Patienten, welche eine akute Transplantatabstoßung erfuhren, erhielten eine intravenöse Steroidtherapie (maximale kumulative Dosis von 3 g) über 3 Tage. Steroidresistente Abstoßungen wurden mit einer Antikörpertherapie (ATG, OKT 3) behandelt und aus der Studie ausgeschlossen.

3.2. Durchflußzytometrische Untersuchungen und Isolation der Lymphozyten

3.2.1. Isolation der Lymphozyten aus Patienten-Vollblut

Im Rahmen der festgelegten Untersuchungszeitpunkte wurde den Patienten zusätzlich an den Tagen 0, 7 sowie nach 1, 2, 3, 6, 12 und 24 Monaten nach Transplantation 10 ml Vollblut im Lithiumheparinat-Röhrchen (Vacutainer[®], Becton Dickinson, Basel, Schweiz) entnommen und im Verhältnis 2:1 mit PBS in 50 ml Flakons verdünnt. Anschließend wurden 7 ml von diesem Gemisch in Zentrifugenröhrchen auf 3 ml Biocoll-Trennlösung (Dichte 1,077 g/ml, isoton, Biochrom[™] AG) pipettiert und bei 2400 U/min für 20 min zentrifugiert. Der Lymphozytenring, welcher sich an der Grenzschicht zwischen Biocoll und Patientenprobe bildet, konnte im Anschluss abpipettiert und in neue 10 ml Zentrifugenröhrchen gegeben werden. Es erfolgte eine erneute Zentrifugation der isolierten Lymphozyten mit 1800 U/min. Der Überstand wurde entfernt und das entstandene Zellpellet mit 10 ml PBS („phosphate buffered

saline“(PBS), PAA Laboratories, Pasching) Lösung resuspendiert. Dieser Waschvorgang wurde 2x wiederholt. Im Anschluss an die letzte Waschung wurden jeweils 10 μl entnommen und in Safe-Lock[®] Eppendorfgefäße (Eppendorf AG, Hamburg) der Größe 1 ml gegeben. In einer Neubauer-Zählkammer konnte nach Anfärbung mit Thymolblau die Anzahl der gewonnenen Lymphozyten bestimmt werden. Der Hauptansatz wurde erneut zentrifugiert (1800 U/min). Der Überstand wurde entfernt und ausgehend von der errechneten Gesamtmenge wurde das Zellpellet mit jeweils 1 ml PBS +10 % DMSO pro 5×10^6 Zellen resuspendiert. Die gewonnene Lymphozytenlösung wurde in 1 ml Eppendorfgefäßen bei -80 °C zur späteren Verwendung eingefroren.

3.2.2 Antikörpermarkierung der Lymphozyten

Zur Differenzierung der verschiedenen Lymphozytensubpopulationen wurden die in Tabelle 3.1 aufgeführten monoklonalen Antikörper verwandt. Die eingesetzten Antikörper waren entweder mit Fluoreszeinisothiocyanat = FITC-konjugierter F(ab')₂ Ziege-anti-Maus mAk vom Typ IgM (Dianova, Hamburg) ($\lambda = 515 - 545 \text{ nm}$) als auch R-Phycoerythrin-Streptavidin-Komplex = PE (Medac, Hamburg) ($\lambda = 560 - 590 \text{ nm}$) markiert. Für die durchflußzytometrische Messung wurden die eingefrorenen Lymphozyten zunächst im Wasserbad aufgetaut. Pro Antikörperansatz wurden jeweils 2×10^5 Zellen entnommen und in 50 μl PBS gelöst. Um die Reste des Einfriermediums zu entfernen, erfolgte eine Zentrifugation der Zellsuspensionen bei 1800 U/min. Nach Entfernung des Überstandes wurde das Zellpellet mit 50 μl PBS + 1 % BSA („bovine serum albumin“(BSA), MBI Fermentas, St. Leon Rot, Deutschland) resuspendiert. Es erfolgte nun die Zugabe von je 20 μl der in Tabelle 3.1 aufgeführten monoklonalen Antikörper und die Inkubation der Ansätze für 30 min bei 4 °C im Dunkeln. Nachfolgend wurde zu den markierten Lymphozyten 1 ml PBS + 1 % BSA gegeben und der Ansatz erneut zentrifugiert (1800 U/min). Dieser Waschvorgang wurde insgesamt 3x wiederholt. Nach Absaugen der Überstände wurden die verbliebenen Zellpellets mit 500 μl PBS resuspendiert. Anschließend erfolgte die Analyse der Lymphozytensubpopulationen im FACScan (Fluorescence activated cell scanner, Becton Dickinson GmbH, Heidelberg, Deutschland). Zur Bestimmung unspezifischer Antikörperbindungen wurden regelmäßig Isotyp-Kontrollen (Becton Dickinson GmbH, Heidelberg, Deutschland) eingesetzt. Die hierbei mit einem irrelevanten FITC- oder PE-gekoppelten Kontrollantikörper bestimmte Fluoreszenz musste < 1% betragen.

Antikörper	Clone, Isotyp und Farbstoff	Spezifität	Hersteller
CD3⁺	HIT3a, MouseIgG2a,κ, FITC	CD3/TCR Komplex	BD Pharmingen
CD4⁺	RPA-T4, MouseIgG1,κ, PE	T-Helfer Zellen	BD Pharmingen
CD19⁺	MouseIgG1,κ, PE	B-Zellen	BD Pharmingen
CD25⁺	2A3, MouseIgG1,κ, FITC	Aktivierte T-Zellen	Becton Dickinson
Simultest™ CD3⁺CD4⁺	CD3-SK7, CD4-SK3, MouseIgG1,κ, FITC, PE	T-Helfer Zellen	Becton Dickinson
Simultest™ CD3⁺CD8⁺	CD3-SK7, CD4-SK1, MouseIgG1,κ FITC, PE	Supressor-/Zytotoxische T-Zellen	Becton Dickinson
Simultest™ CD3⁻ CD16⁺CD56⁺	CD3-SK7, CD16-B73, CD56-MY31, MouseIgG1,κ FITC, PE	Natürliche Killerzellen (NK-Zellen)	Becton Dickinson
Mouse IgG1,κ	X40, MouseIgG1,κ, FITC, PE	Fluoreszenz Kontrolle	Becton Dickinson
Mouse IgG2a,κ	X39, MouseIgG2a,κ, FITC, PE	Fluoreszenz Kontrolle	Becton Dickinson

Tabelle 3.1: Antikörper für Durchflußzytometrie mit FACScan™

3.3 PCR (polymerase chain reaction) und real-time-PCR zur Ermittlung der Foxp3-Expression CD4⁺CD25⁺ T-Lymphozyten

3.3.1 Isolation CD4⁺CD25⁺ T-Lymphozyten mittels Dynabeads[®] CD4 und Dynabeads[®] CD25

Dynabeads[®] sind an magnetische Partikel gebundene monoklonale Antikörper. Der nach der in 3.2. beschriebenen Methode aus dem Vollblut gewonnene Buffy Coat wurde mit 2 ml PBS + 2 % FCS („fetal calf serum“(FCS), Biocrom, Berlin, Deutschland) verdünnt, und auf 4°C gekühlt. Für eine 95-%ige Isolation CD4⁺ T-Lymphozyten wurden jeder Probe 1 x 10⁷ (144 µl) Dynabeads[®] CD4 (Dyna[®] Biotech, USA) zugegeben. Anschließend erfolgte eine Inkubationsperiode von 20 min bei 4°C. Die Dynabeads[®] hatten nach dieser Zeit mit den CD4⁺ Lymphozyten Aggregate gebildet, welche von den restlichen Lymphozyten durch Benutzung eines Dynal-MPC[®] (Magnetic Particle Concentrator, Dynal[®] Biotech, USA) getrennt wurden. Die Dynabeads[®]/T-Lymphozyten-Aggregate konnten nun in ein neues Röhrchen überführt werden und wurden insgesamt 4x mit jeweils 2 ml PBS + 2 % FCS gewaschen. Nach der letzten Waschung wurden die CD4⁺ Zellen in 100 µl RPMI-1640 („Roswell Park Memorial-1640“ (RPMI-1640), Biocrom, Berlin, Deutschland) + 1 % FCS resuspendiert. Anschließend erfolgte in jede Probe die Zugabe von 10 µl DETACHaBEAD[®] (Dyna[®] Biotech, USA). Nach einer Inkubationsperiode von 60 Minuten konnten die von den Zellen gelösten Dynabeads[®] CD4 mittels des Dynal MPC[®] aus der Probe entfernt werden. Die isolierten CD4⁺ Zellen wurden in ein neues Röhrchen überführt, und erneut mit 10 ml RPMI 1640+ 1 % FCS gewaschen. Um jetzt die CD4⁺CD25⁺ Zellen mittels Dynabeads[®] CD25 zu isolieren, wiederholten sich die Arbeitsschritte wie oben beschrieben.

3.3.2 RNA-Extraktion aus den isolierten CD4⁺CD25⁺ Zellen mittels optimierter Guanidinisothiocyanat/Phenol Methode

Die Isolierung der gesamt-RNA sowie der ersten cDNA-Synthese separierter CD4⁺CD25⁺ T-Zellen erfolgte entsprechend der in der Literatur publizierten Methodik. Isolierte CD4⁺CD25⁺ T-Lymphozyten wurden für 8 min zentrifugiert (1800 U/min) und

nach Abziehen des Überstandes mit 1 ml peqGOLD RNAPure™ (PEQLAB Biotechnologie GmbH, Erlangen, Deutschland) pro 5×10^6 Zellen in 0.5 ml Biopur® Eppendorf Gefäßen (Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland) resuspendiert. Nach Inkubation für 5 Minuten bei Raumtemperatur wurde den Ansätzen jeweils 0,2 ml Chloroform zugefügt. Es folgte eine weitere Inkubationsperiode von 10 Minuten bei Raumtemperatur. Die folgende Zentrifugation (12000 U/min) führte zu einer Trennung in 3 Phasen. In der obersten, wässrigen Phase findet sich die Anreicherung extrahierter RNA, während sich in den beiden anderen Phasen vornehmlich Proteine und DNA befinden. Die wässrige Phase wurde abpipettiert und in 1 ml Eppendorf Gefäße überführt. Um die Präzipitation der RNA anzuregen, wurden nun 0,5 ml Isopropanol zu der wässrigen Phase pipettiert und die Proben erneut für 15 min bei Raumtemperatur gelagert. Im Anschluss erfolgte für 4 Minuten eine Zentrifugation bei 12000 U/min (4°C). Das erhaltene gelartige RNA-Präzipitat wurde nach Entfernung des Isopropanolüberstand mit 75 %-igem Ethanol resuspendiert und nochmals für 10 min zentrifugiert (12000 U/min bei 4°C). Dieser Waschvorgang wurde 2x wiederholt. Nach der letzten Waschung wurde der Überstand entfernt, gefolgt von einer kurzen Trockenperiode um die Reste des Ethanols zu entfernen. Zum Abschluss wurde die RNA in 1 ml RNase freiem Wasser (DEPC-Wasser, MBI Fermentas, St. Leon Rot, Deutschland) gelöst und die Menge der erhaltenen RNA photometrisch (GeneQuant II, Amersham Pharmacia Biotec, Buckinghamshire, England) bestimmt (durchschnittliche RNA-Konzentration 1,0-3.9 µg/µl).

3.3.3 Synthese der cDNA

Für die Synthese der cDNA wurde aus jeder Probe eine RNA Menge von 5µg entnommen und mit 12 µl aqua dest. + 2 µl dT (Oligo(dT)₁₈-Primer, MBI Fermentas, St. Leon Rot, Deutschland) in 0.5 ml Eppendorfgefäße aufgefüllt. An diesen Arbeitsschritt schloss sich eine Inkubationsperiode von 10 min bei 70°C im vorgeheizten Microcycler (iCycler®, Bio-Rad Laboratories, München, Deutschland) an. Währenddessen erfolgte die Vorbereitung der für jeden Ansatz benötigten Lösung aus 4 µl Strandbuffer, 2 µl DTT (Dithiothreitol (DTT), MBI Fermentas, St. Leon Rot, Deutschland) und 1 µl dNTP (Desoxyribonukleosidtriphosphate (dNTP), MBI Fermentas, St. Leon Rot, Deutschland) vorbereitet werden. Nach Abschluss der Inkubation wurden die Proben aus dem Microcycler entnommen und auf Eis gelegt. Anschließend wurden 7 µl der vorbereiteten Strandbuffer-, DTT- und dNTP-Lösung hinzugefügt und die Proben auf 42°C für 2

Minuten im Wasserbad erwärmt. Durch Zugabe von jeweils 1 µl Superscript™ II (Invitrogen GmbH, Karlsruhe, Deutschland) und erneutes Erwärmen auf 42°C für 50 Minuten wurde die Transkription eingeleitet. Abschließend erfolgte die Inkubation der Proben im Microcycler bei 70°C für 15 Minuten, um die reverse Transkriptase zu inaktivieren. Die erhaltene cDNA stand nun zur weiteren Analyse mittels Gel-Elektrophorese oder Real-Time-PCR zur Verfügung.

3.3.4 Analyse der erhaltenen cDNA durch PCR und Agarosegel-Elektrophorese

Zur Vorbereitung wurde ein Master-Mix aus 640 µl destilliertem H₂O, 100 µl 10xPuffer PCR Puffer (GeneAmp®, Applied Biosystems, Branchburg, USA), 30 µl MgCl₂ (25 mM MgCl₂ Solution, Applied Biosystems, Branchburg, USA), 20 µl dNTP und 5µl Taq-DNA-Polymerase (AmpliAmp®, Applied Biosystems, Branchburg, USA) erstellt. Jeweils 20 µl diese Master-Mixes wurden in 0,5 ml Eppendorf Cups gegeben und mit 20 µl PCR-Öl (Biostep, Jahnsdorf, Deutschland) überschichtet. Im Anschluss wurde in separaten 0,5 ml Eppendorf Cups jeweils 0,2 µl der entsprechenden Patienten-cDNA mit 1,5 µl FoxP3 Primer und 2 µl Wasser gemischt. Verwendet wurde der Primer Foxp3 vorwärts, 5'-GGAGGCACCTGTGGGGTAGC-3' und Foxp3 reverse, 5'-TCAGGGGCCAGGTGTAGGGTTG-3'. Dieses Gemisch wurde unter die Ölschicht in den vorher auf 80°C erwärmten Master-Mix pipettiert. Danach konnte der eigentliche Amplifikationsvorgang im ICycler® (Bio-Rad™) gestartet werden. Die Tabelle 3.2 zeigt das dafür verwendete Protokoll.

2StepAmp+Melt.tmo

Cycle	Cycle Descript.	Repeats	Step	Process	Ramp Rate	Dwell Time	Hold	Set - Point	Gradient	Range	Melt Curve	+ Temp	- Temp	+ Time	- Time
1		1	1		MAX	03:00		100.0							
2		40	1		MAX	00:10		100.0							
			2		MAX	00:45		100.0							
3		1	1		MAX	01:00		100.0							
4		1	1		MAX	01:00		100.0							
5		80	1		MAX	00:10		100.0			<input checked="" type="checkbox"/>	5.0			

Tabelle 3.2: Protokoll für Amplifikation von Foxp3 im ICycler® (Firma Bio-Rad™)

Während der Amplifikation wurde das Agarosegel vorbereitet. Dazu wurden 40 ml einer 1,5 %-igen Agarose bei 60°C verflüssigt und mit 2 µl Ethidiumbromid (Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland) versetzt. Die flüssige Agarose wurde dann in eine Form mit 20-Kammereinsatz gegeben. Die anschließend benötigte Trockenperiode belief sich auf 15

min, nach welcher der Kammereinsatz entfernt werden konnte. Das fertige Gel-Polster wurde anschließend in das Elektrophorese-Bad gelegt. Nach Abschluss der Amplifikation im ICycler® wurden jeweils 15 µl des Produktes mit 1 µl Farbstoff (Biostep, Jahnsdorf, Deutschland) versetzt und in die Kammern des Agarose-Gels pipettiert. Bei jedem Vorgang wurde eine Negativkontrolle (destill H₂O + Farbstoff) und eine 100 bp DNA-Leiter (GeneRuler™ 100bp DNA Ladder, MBI Fermentas, St. Leon Rot, Deutschland) aufgetragen. Die Elektrophorese erfolgte mit einer Spannung von 80 mV für 20 Minuten. Nach Abschluss wurden die erhaltenen DNA-Banden unter UV-Licht in der Dunkelkammer sichtbar gemacht und mit einer Spiegelreflex Kamera (Zeiss, Jena, Deutschland) abgelichtet. Eine Kontroll-PCR erfolgte jeweils mit dem β-Actin Primer der Sequenz: β-actin vorwärts, 5'-GACGAGGCCAGAGCAAGAG-3', β-actin reverse, 5'-ATCTCCTTCTGCATCCTG TC-3'.

3.3.5 Durchführung der real-time-PCR mit SYBR® Grün

Vor der Durchführung der eigentlichen rt-PCR musste eine Verdünnungsreihe des Foxp3 Standards im ICycler® gemessen werden, um eine korrekte Quantifizierung möglich zu machen. Im Anschluss wurden 2µl cDNA (siehe Abschnitt 3.3.4.) mit 25µl des SYBR® Green (iQ™ SYBR® Green Supermix, Bio-Rad Laboratories, München, Deutschland) und 500 nM des FoxP3-Primers versetzt. Dieser Ansatz wurde für jede cDNA 3x erstellt und mit destilliertem, RNase-freiem H₂O auf insgesamt 50 µl aufgefüllt. In identischer Weise erfolgte die Erstellung der Ansätze zur Bestimmung des β-Actins für jede Probe. Die Proben wurden im ICycler® platziert und nach dem in Tabelle 3.3 aufgestellten Protokoll analysiert. Die Datenanalyse der Ergebnisse erfolgte mit ICycler®-Software (Vs.3.0.6070, Bio-Rad™).

2StepAmp+Melt.tmo

Cycle	Cycle Descript.	Repeats	Step	Process	Ramp Rate	Dwell Time	Hold	Set - Point	Gradient	Range	Melt Curve	+ Temp	- Temp	+ Time	- Time
1		1	1		MAX	03:00		100.0							
2		40	1		MAX	00:10		100.0							
			2		MAX	00:45		100.0							
3		1	1		MAX	01:00		100.0							
4		1	1		MAX	01:00		100.0							
5		80	1		MAX	00:10		100.0			<input checked="" type="checkbox"/>	5.0			

Tab 3.3 Protokoll für Real-Time-PCR von β-Actin/Foxp3 im ICycler® (Bio-Rad™)

3.4. Statistik

Jeder randomisierte Patient, welcher mindestens eine Studienmedikation erhalten hatte, wurde in die statistische Auswertung mit einbezogen. Überlebenszeiten wurden nach Kaplan-Meier analysiert und mit dem generalisierten log-rank-test nach Mantel-Cox verglichen. Für den Vergleich von 2 qualitativen Variablen wurde der Fisher´s-exact Test, von mehr als 2 qualitativen Variablen der Chi-Quadrat Test verwendet. Die Auswertung quantitativer und paarweiser Variablen erfolgte als Varianzanalyse (2-way ANOVA) mit nachfolgendem Bonferroni post Test. Direkte paarweise Vergleiche wurden durch den t-Test analysiert. Das Signifikanzniveau wurde mit $P < 0.05$ festgelegt. Die statistische Auswertung erfolgte mit Hilfe des Computerprogrammes GraphPad-Prism, Version 3.02 (GraphPad Software, San Diego, USA).

4. ERGEBNISSE

4.1 Klinische Verlaufsparemeter

4.1.1 Demographische Daten

In die vorliegende offene prospektive Studie wurden im Zeitraum Mai 2000 bis März 2003 40 Patienten aufgenommen, welche in der Klinik für Allgemeine Chirurgie und Thoraxchirurgie des Universitätsklinikums Schleswig-Holstein, Campus Kiel, ein allogenes Leichennierentransplantat erhalten haben. Die Randomisierung in die beiden Studienarme (Kontroll- versus WOFIE-Gruppe) erfolgte im Verhältnis 1:1 ohne Verblindung. Insgesamt konnten 14 von 20 (70%) WOFIE- und 16 von 20 (80%) Kontroll-Patienten bis 2 Jahre nach Transplantation untersucht werden. Nach 3/6/12/18 Monaten befanden jeweils 18/17/14/14 WOFIE- sowie 17/16/16/16 Kontroll-Patienten in der Nachbeobachtung. Insgesamt 10 von 40 Studienpatienten (25%) (6 WOFIE- und 4 Kontroll-Patienten) mussten im Verlauf von der Studie ausgeschlossen werden. Ursache für einen Studienabbruch waren 3 Transplantatverluste (2 WOFIE-, 1 Kontroll-Patient), Tacrolimus-assoziierte neurologische Nebenwirkungen mit konsekutiver Umstellung der Immunsuppression bei 3 Patienten (1 WOFIE-, 2 Kontroll-Patienten), 2 steroidresistenten Transplantatabstoßungen (1 WOFIE-, 1 Kontroll-Patient), welche eine ATG-Therapie erforderlich machten, sowie ein Münchhausensyndrom (1 WOFIE-Patient) und ein CMV-assoziiertes Todesfall (1 WOFIE-Patient).

4.1.2 Patienten- und Transplantatüberleben, steroidfreie Dauermedikation und Inzidenz akuter primärer Abstoßungsreaktionen

Die wesentlichen klinischen Verlaufsparemeter beider Studiengruppen sind in Abbildung 4.1 graphisch dargestellt. In beiden Studiengruppen waren sowohl das Transplantat- als auch das Patientenüberleben vergleichbar. Von den 20 Patienten der WOFIE-Gruppe verstarb ein Patient aufgrund einer CMV Infektion 18 Wochen nach der Transplantation außerhalb des Zentrums. In der Kontroll-Gruppe waren keine Todesfälle zu verzeichnen (Patientenüberleben Kontroll- versus WOFIE-Gruppe 100% versus 95%; $P=0,291$, nicht signifikant im generalisierten log-rank-test nach Mantel-Cox). Transplantatverluste traten innerhalb des Untersuchungszeitraums bei insgesamt 3 Patienten auf. Ursache der Organverluste waren in 2

Fällen eine Transplantatvenenthrombose (1 WOFIE-, 1 Kontroll-Patient) und in einem Fall ein CMV-Infekt (WOFIE-Gruppe). Das Transplantatüberleben lag somit bei 95% in der Kontroll- und bei 90% in der WOFIE-Gruppe, $P=0,260$, nicht signifikant im generalisierten log-rank-test nach Mantel-Cox). Bei allen Patienten (18 von 20 (90%) der WOFIE- und 17 von 20 (85%) der Kontroll-Patienten), welche für mindestens 4 Monate nach Transplantation nachbeobachtet werden konnten, erfolgte zwischen der 12. und 16. Woche nach Transplantation der im Studienprotokoll vorgesehene schrittweise Entzug der Steroidmedikation. Während bis auf einen Patienten alle Patienten der WOFIE-Gruppe (94,4%) nach Absetzen dauerhaft auf eine Steroidmedikation verzichten konnten, gelang dieses nur bei 76,5% der Kontroll-Patienten ($P=0,177$, nicht signifikant im Fisher's exact Test). Ursache für eine erneute Steroidmedikation waren wiederholte steroidsensitive Abstoßungsreaktionen.

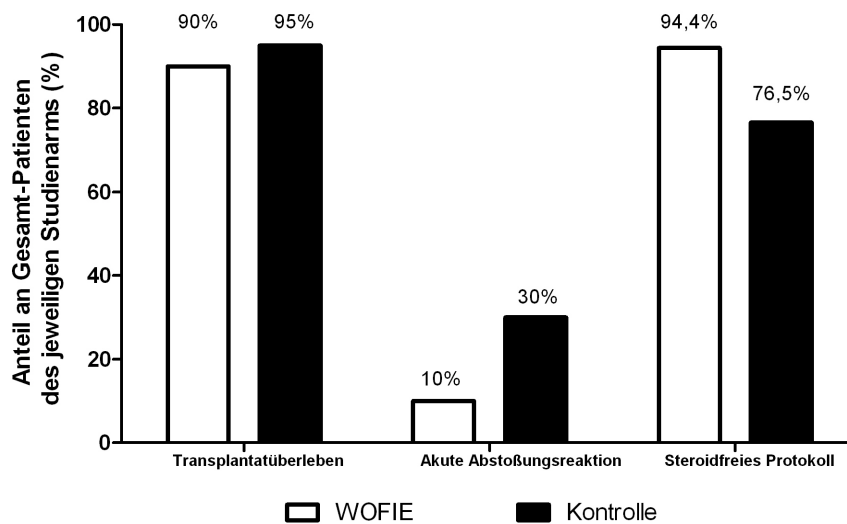


Abbildung 4.1: Transplantatüberleben, Inzidenz akuter primärer Abstoßungsreaktionen und prozentualer Anteil rekrutierter Patienten, welche in ein permanent steroidfreies Protokoll überführt werden konnten. Das Transplantatüberleben war mit 90% in der WOFIE- und 95% in der Kontroll-Gruppe vergleichbar ($P=0,260$, nicht signifikant im generalisierten log-rank-test nach Mantel-Cox). Während jedoch bei 30% der Kontroll-Patienten eine akute Transplantatabstoßung verzeichnet wurde, lag die Inzidenz akuter primärer Abstoßungen in der WOFIE-Gruppe bei 10% ($P=0,100$, nicht signifikant im Chi Quadrat Test). Siebzehn von 18 (94,4%) WOFIE-Patienten, welche mehr als 4 Monate nach Transplantation überwacht wurden, konnten ihrer Steroidmedikation entzogen werden. Dahingegen gelang ein dauerhafter Steroidentzug nur bei 76,5% der Kontroll-Patienten ($P=0,177$, nicht signifikant im Fisher's exact Test).

Ein weiterer deutlicher Unterschied zwischen beiden Studiengruppen zeigte sich im Hinblick auf die Inzidenz akuter primärer Abstoßungsreaktionen. Während in der Kontroll-Gruppe insgesamt 6 akute Abstoßungsreaktionen auftraten, wurden in der WOFIE-Gruppe lediglich 2

akute Transplantatabstoßungen verzeichnet (Inzidenz akuter Transplantatabstoßungen 10% in der WOFIE- versus 30% in der Kontroll-Gruppe, $P=0,100$, nicht signifikant im Chi Quadrat Test). Dabei fand sich bei 3 Kontroll-Patienten eine milde, steroidsensible (Grad I nach der Banff-Klassifikation) Abstoßungsreaktion, 2 Patienten (1 WOFIE, 1 Kontrolle) zeigten eine moderate, steroidresistente (Grad II nach der Banff-Klassifikation) Rejektion, welche erfolgreich mit ATG behandelt wurde und zum Studienausschluß führte. Aufgrund einer medizinischen Kontraindikation wurde bei 2 Patienten (1 WOFIE, 1 Kontrolle) keine Biopsie durchgeführt, bei einem weiteren Kontroll-Patienten war die Nierenbiopsie histologisch nicht auswertbar. Da alle 3 Patienten auf eine Steroidbehandlung reagierten, wurden diese aufgrund der eindeutigen klinischen Symptomatik als Abstoßung gewertet.

4.2 Durchflußzytometrische Analyse lymphozytärer Subpopulationen im peripheren Blut

Zur weiteren Analyse immunologischer Effektormechanismen, welche für die verminderte Inzidenz akuter Transplantatabstoßungen und die erfolgreiche steroidfreie Dauerimmunsuppression in der WOFIE-Gruppe verantwortlich sind, erfolgten zunächst in beiden Studiengruppen zu den definierten Zeitpunkten nach Transplantation (Tag 0 und 7 sowie 1, 2, 3, 6, 12 und 24 Monate nach Transplantation) durchflußzytometrische Messungen der aus dem peripheren Blut isolierten Lymphozyten. Die folgenden Lymphozytenmarker wurden dabei eingesetzt: $CD19^+$ (B-Zellen), $CD3^+CD16^+CD56^+$ (natürliche Killerzellen), $CD3^+$ (Gesamt-T-Zellen), $CD3^+CD4^+$ (T-Helferzellen), $CD3^+CD8^+$ (zytotoxische T-Zellen) und $CD4^+CD25^+$ (regulatorische T-Zellen),.

4.2.1 $CD19^+$ B-Lymphozyten

Der durchflußzytometrisch ermittelte prozentuale Anteil $CD19^+$ B-Lymphozyten im peripheren Blut war in beiden Studiengruppen unabhängig vom immunsuppressiven Protokoll niedrig und lag zwischen $3,3 \pm 1,6\%$ und $5,6 \pm 3,1\%$ in der WOFIE- und zwischen $3,2 \pm 1,7\%$ und $5,2 \pm 2,8\%$ in der Kontroll-Gruppe ($P > 0,05$ zu allen Untersuchungszeitpunkten, statistisch nicht signifikant in der 2-way ANOVA mit anschließendem Bonferroni post Test). Die einzelnen Mittelwerte \pm Standardabweichung sind der Anhangstabelle 8.1 zu entnehmen und in Abbildung 4.2 graphisch dargestellt.

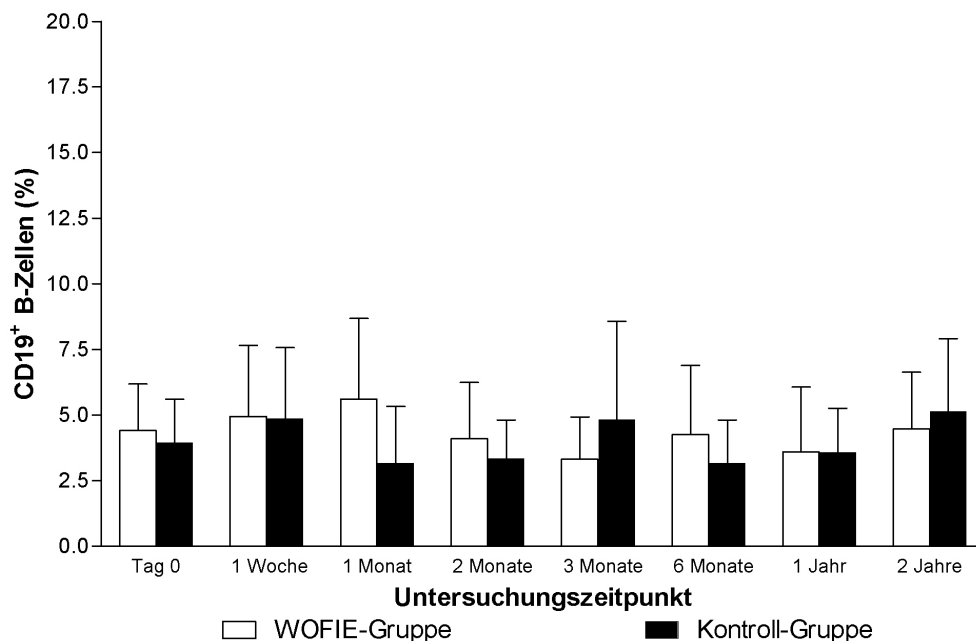


Abbildung 4.2: Durchflußzytometrische Analyse des prozentualen Anteils peripherer B-Lymphozyten (CD19⁺) in beiden Untersuchungsgruppen von Tag 0 bis 2 Jahre nach Transplantation. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm Standardabweichung. Der ermittelte prozentuale Anteil CD19⁺ B-Lymphozyten im peripheren Blut war in beiden Studiengruppen unabhängig vom immunsuppressiven Protokoll niedrig. Die Ergebnisse lagen zwischen $3,3 \pm 1,6\%$ und $5,6 \pm 3,1\%$ in der WOFIE- und zwischen $3,2 \pm 1,7\%$ und $5,2 \pm 2,8\%$ in der Kontroll-Gruppe ($P > 0,05$ zu allen Untersuchungszeitpunkten, statistisch nicht signifikant in der 2-way ANOVA mit anschließendem Bonferroni post Test).

4.2.2 CD3⁺16⁺56⁺ natürliche Killerzellen (NK-Zellen)

Die durchflußzytometrische Ermittlung des prozentualen Anteils natürlicher Killerzellen im peripheren Blut erfolgte unter Zuhilfenahme des Oberflächenmarkers CD3⁺16⁺56⁺ (siehe Abbildung 4.3 und Anhangstabelle 8.1). Ähnlich wie die Analyse peripherer B-Lymphozyten zeigte sich auch hier ein konstant niedriger prozentualer Anteil an der Gesamt-Lymphozytenpopulation (Anteil natürlicher Killerzellen zwischen $6,6 \pm 2,2\%$ und $8,3 \pm 2,8\%$ in der WOFIE- und zwischen $7,5 \pm 2,5\%$ und $9,4 \pm 3,7\%$ in der Kontrollgruppe). Interessanterweise fand sich in der WOFIE-Gruppe bereits 1 Woche nach Transplantation ein leichter Abfall der NK-Zellpopulation im peripheren Blut, welcher bis 6 Monate nach Transplantation nachweisbar war und in der Kontroll-Gruppe bis zum 3. Monat nach Transplantation ausblieb (prozentualer Anteil CD3⁺16⁺56⁺ Zellen $7,1 \pm 2,9\%$, $6,9 \pm 4,1\%$, $7,4 \pm 4,6\%$, $6,6 \pm 2,2\%$ und $7,4 \pm 3,3\%$ in der WOFIE- versus $8,3 \pm 3,5\%$, $8,7 \pm 3,9\%$, $9,4 \pm 3,7\%$, $7,5 \pm 2,5\%$ und $7,8 \pm 1,4\%$ in der Kontroll-Gruppe 1 Woche sowie 1, 2, 3 und 6 Monate nach Transplantation, $P > 0,05$ zu allen Untersuchungszeitpunkten, statistisch nicht signifikant in der 2-way ANOVA mit anschließendem Bonferroni post Test).

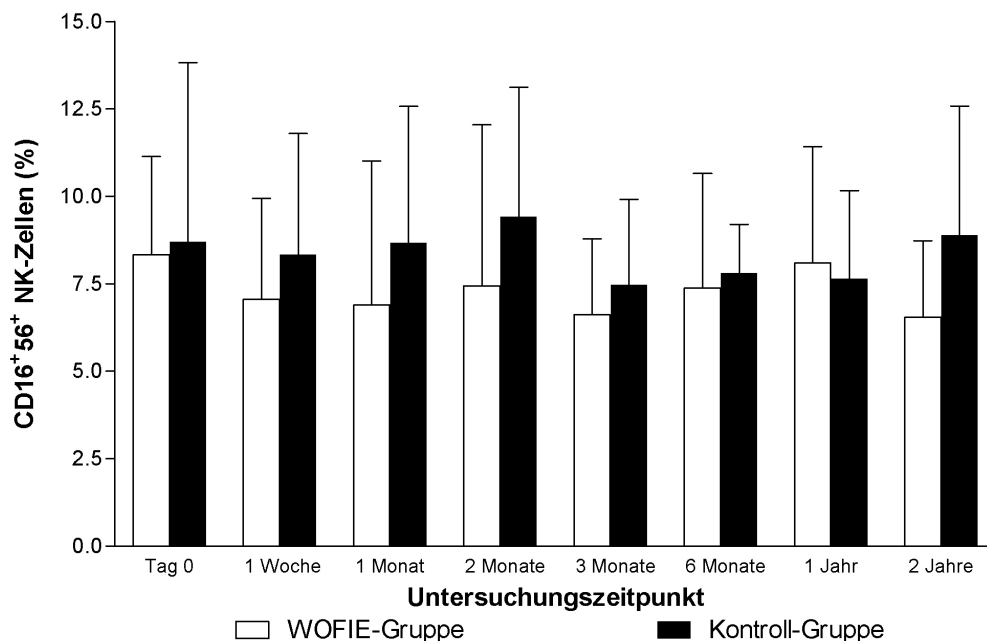


Abbildung 4.3: Durchflußzytometrische Analyse des prozentualen Anteils peripherer natürlicher Killerzellen ($CD3^+16^+56^+$) in beiden Untersuchungsgruppen von Tag 0 bis 2 Jahre nach Transplantation. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm Standardabweichung. Unabhängig vom immunsuppressiven Protokoll zeigte sich ein konstant niedriger prozentualer Anteil natürlicher Killerzellen an der Gesamt-Lymphozytenpopulation. In der WOFIE-Gruppe fand sich 1 Woche nach Transplantation ein leichter Abfall der NK-Zellpopulation im peripheren Blut, welcher bis 6 Monate nach Transplantation nachweisbar war und in der Kontroll-Gruppe bis 3 Monate nach Transplantation ausblieb. Die Unterschiede zwischen beiden Behandlungsgruppen waren jedoch zu keinem Zeitpunkt statistisch signifikant.

4.2.3 $CD3^+$ T-Lymphozyten (pan-T-Zellen)

Die durchflußzytometrische Analyse zeigte in der WOFIE-Gruppe über den gesamten Beobachtungszeitraum von 2 Jahren einen im Vergleich zur Kontrollgruppe geringeren prozentualen Anteil der Gesamt-T-Zellpopulation (siehe Abbildung 4.4 und Anhangstabelle 8.1). Insbesondere nach einem Monat sowie 1 und 2 Jahre nach Transplantation fanden sich nach Einhaltung einer immunsuppressiven Pause deutlich weniger $CD3^+$ Zellen im peripheren Blut ($61,9 \pm 16,8\%$, $75,3 \pm 13,3\%$ und $69,4 \pm 11,7\%$ $CD3^+$ Zellen in der WOFIE- versus $71,9 \pm 15,2$, $79,4 \pm 8,3\%$ und $77,2 \pm 8,8\%$ $CD3^+$ Zellen in der Kontroll-Gruppe 1 Monat, 1 und 2 Jahre nach Transplantation).

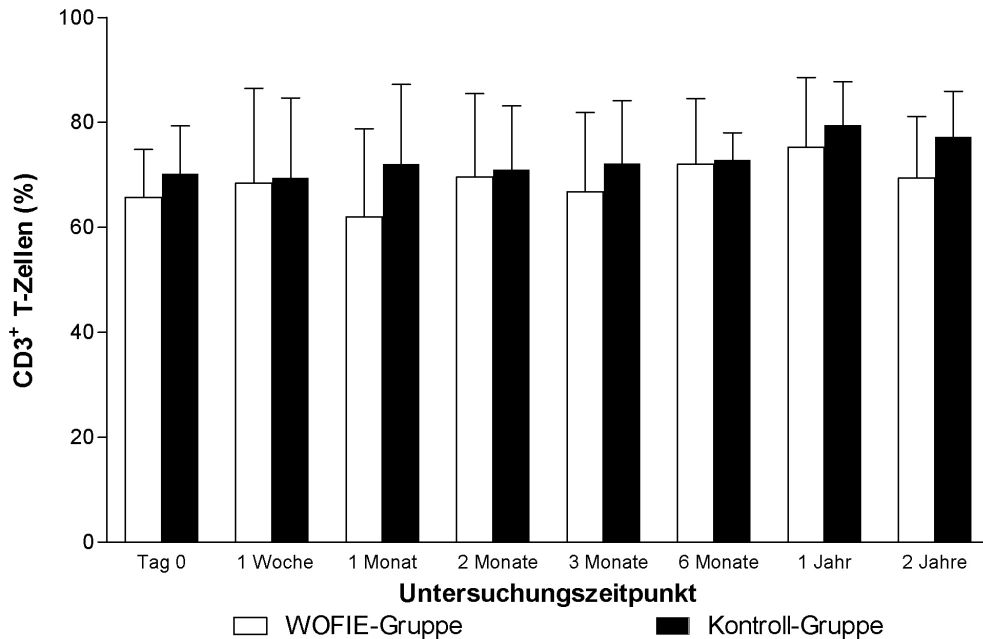


Abbildung 4.4: Durchflußzytometrische Analyse des prozentualen Anteils der peripheren Gesamt-T-Zellpopulation (CD3⁺) in beiden Untersuchungsgruppen von Tag 0 bis 2 Jahre nach Transplantation. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm Standardabweichung. Patienten, welche nach dem WOFIE-Protokoll behandelt wurden, zeigten im Vergleich zur Kontroll-Gruppe 1 Monat sowie 1 und 2 Jahre nach Transplantation weniger CD3⁺ Zellen im peripheren Blut. Die durchflußzytometrisch ermittelten Werte erreichten jedoch zu keinem Zeitpunkt statistische Signifikanz ($P < 0,05$ zu allen Untersuchungszeitpunkten in der 2-way ANOVA mit anschließendem Bonferoni post Test).

Die ermittelten Werte erreichten jedoch zu keinem Zeitpunkt nach Transplantation statistische Signifikanz ($P > 0,05$ zu allen Untersuchungszeitpunkten, statistisch nicht signifikant in der 2-way ANOVA mit anschließendem Bonferoni post Test).

4.2.4 CD3⁺CD8⁺ T-Lymphozyten (Suppressor- und zytotoxische T-Zellen)

Der durchflußzytometrisch ermittelte prozentuale Anteil zytotoxischer (CD3⁺CD8⁺) T-Zellen ist in Abbildung 4.5 aufgeführt und der Anhangstabelle 8.1 zu entnehmen. Während beide Gruppen vor Transplantation (Tag 0) einen vergleichbaren Anteil CD3⁺CD8⁺ Zellen im peripheren Blut aufwiesen (CD3⁺CD8⁺ Zellen $16,2 \pm 4,4\%$ in der WOFIE- versus $16,9 \pm 7,6\%$ in der Kontroll-Gruppe Tag 0 nach Transplantation), fand sich 1 Woche und 1 Monate nach Transplantation in der Kontroll-Gruppe ein leichter Anstieg der untersuchten Zellpopulation, welcher in der WOFIE-Gruppe ausblieb ($19,0 \pm 6,1\%$ und $17,1 \pm 9,0\%$ CD3⁺CD8⁺ Zellen in der Kontroll- versus $15,9 \pm 6,3\%$ und $14,6 \pm 6,6\%$ CD3⁺CD8⁺ Zellen in der WOFIE-Gruppe 1 Woche und 1 Monat nach Transplantation, $P > 0,05$, statistisch nicht signifikant in der 2-way ANOVA mit anschließendem Bonferoni post Test). Erst 8 Wochen nach Transplantation zeigten auch Patienten, deren Immunsuppression initial für 72 Stunden

unterbrochen wurde, eine entsprechende Zunahme zytotoxischer T-Zellen im peripheren Blut ($17,9 \pm 5,2\%$ $CD3^+CD8^+$ Zellen in der WOFIE-Gruppe 2 Monate nach Transplantation). Während der prozentuale Anteil $CD3^+CD8^+$ Zellen jedoch in der WOFIE-Gruppe bis 2 Jahre nach Transplantation auf diesem Niveau stabil blieb, fand sich 1 und 2 Jahre nach Transplantation in der Kontroll-Gruppe ein weiterer Anstieg dieser T-Zellsubpopulation, welcher jedoch keine statistische Signifikanz erreichte ($23,7 \pm 8,3\%$ und $21,3 \pm 5,3\%$ $CD3^+CD8^+$ Zellen in der Kontroll- versus und $18,3 \pm 6,0\%$ und $18,7 \pm 4,7\%$ in der WOFIE-Gruppe 1 und 2 Jahre nach Transplantation, $P > 0,05$, statistisch nicht signifikant in der 2-way ANOVA mit anschließendem Bonferroni post Test).

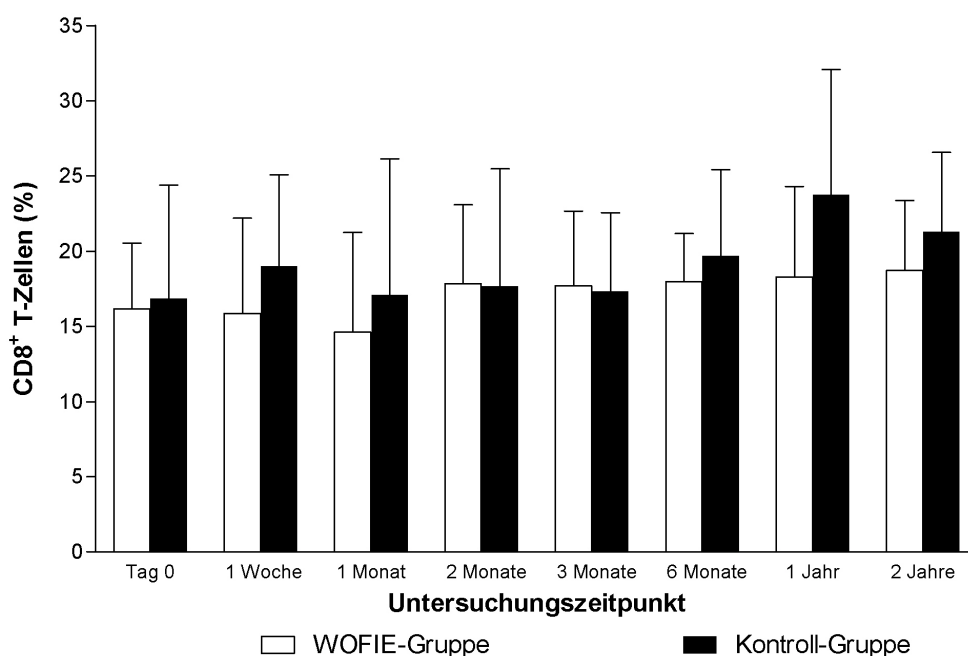


Abbildung 4.5: Durchflußzytometrische Analyse des prozentualen Anteils der peripheren zytotoxischen T-Zellen ($CD3^+CD8^+$ Zellen) in beiden Untersuchungsgruppen von Tag 0 bis 2 Jahre nach Transplantation. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm Standardabweichung. Während die Kontroll-Gruppe bereits 1 Woche nach Transplantation einen Anstieg $CD3^+CD8^+$ Zellen im peripheren Blut aufwies, fand sich eine entsprechende Zunahme dieser T-Zellsubpopulation in der WOFIE-Gruppe erst nach 2 Monaten. Patienten, deren Immunsuppression initial für 72 Stunden unterbrochen wurde, zeigten im weiteren Verlauf einen stabilen Anteil zytotoxischer T-Zellen, während in der Kontrollgruppe 1 und 2 Jahre nach Transplantation eine weiter anteilmäßige Zunahme zu verzeichnen war. Diese Unterschiede erreichten jedoch keine statistische Signifikanz ($P > 0,05$ zu allen Untersuchungszeitpunkten in der 2-way ANOVA mit anschließendem Bonferroni post Test).

4.2.5 $CD3^+CD4^+$ T-Lymphozyten (T-Helferzellen)

Der durchflußzytometrisch ermittelte Anteil der T-Helferzellen ($CD3^+CD4^+$ Zellen) im peripheren Blut war in beiden Untersuchungsgruppen innerhalb der ersten beiden Jahre nach Transplantation stabil (siehe Abbildung 4.6 und Anhangstabelle 8.1). Er lag zwischen $40,4 \pm$

11,2% und $48,9 \pm 13,0\%$ in der WOFIE- und zwischen $42,0 \pm 12,5\%$ und $48,0 \pm 7,8\%$ in der Kontrollgruppe und war zu keinem Untersuchungszeitpunkt statistisch signifikant ($P > 0,05$ zu allen Untersuchungszeitpunkten, statistisch nicht signifikant in der 2-way ANOVA mit anschließendem Bonferroni post Test).

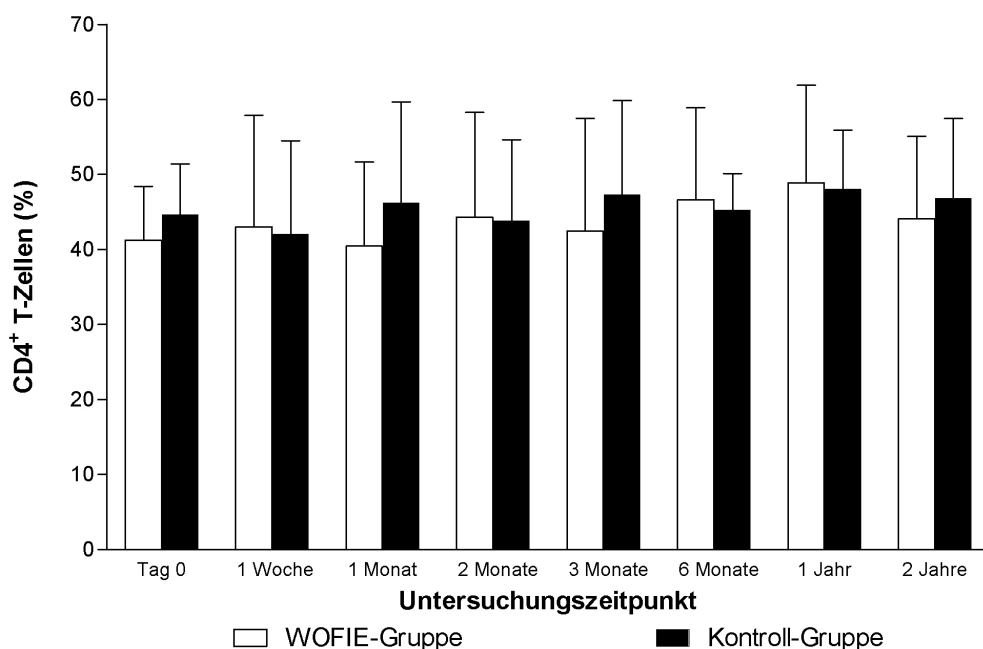


Abbildung 4.6: Durchflußzytometrische Analyse des prozentualen Anteils der peripheren T-Helferzellen ($CD3^+CD4^+$ Zellen) in beiden Untersuchungsgruppen von Tag 0 bis 2 Jahre nach Transplantation. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm Standardabweichung. Er lag zwischen $40,4 \pm 11,2\%$ und $48,9 \pm 13,0\%$ in der WOFIE- und zwischen $42,0 \pm 12,5\%$ und $48,0 \pm 7,8\%$ in der Kontrollgruppe und war zu keinem Untersuchungszeitpunkt statistisch signifikant ($P > 0,05$ zu allen Untersuchungszeitpunkten in der 2-way ANOVA mit anschließendem Bonferroni post Test).

4.2.6 $CD4^+CD25^+$ T-Lymphozyten (regulatorische T-Zellen, T_{regs})

Die durchflußzytometrische Auswertung der für die Induktion von Transplantattoleranz verantwortlichen Subgruppe regulatorischer $CD4^+CD25^+$ T-Lymphozyten erfolgte als prozentualer Anteil $CD4^+$ T-Helferzellen und ist in Abbildung 4.7 graphisch dargestellt (vergleiche auch Anhangstabelle 8.1). Innerhalb der ersten 2 Monate nach Transplantation wiesen beide Untersuchungsgruppen unabhängig vom immunsuppressiven Protokoll nur einen niedrigen prozentualen Anteil regulatorischer T-Lymphozyten im peripheren Blut auf. Auch wenn in der WOFIE-Gruppe 4 Wochen nach Transplantation ein leichter Anstieg dieser Zellpopulation zu verzeichnen war, zeigte dieser im Vergleich mit der kontinuierlich immunsupprimierten Kontroll-Gruppe keine statistische Signifikanz (Anteil regulatorischer T-Lymphozyten $5,7 \pm 1,4\%$ und $4,8 \pm 2,6\%$ in der WOFIE- versus $3,1 \pm 1,9\%$ und $3,9 \pm 2,3\%$ in der Kontroll-Gruppe 4 und 8 Wochen nach Transplantation, $P > 0,05$, statistisch nicht

signifikant in der 2-way ANOVA mit anschließendem Bonferroni post Test). Dahingegen zeigte sich bereits nach 3 Monaten eine Verdopplung des prozentualen Anteils $CD4^+CD25^+$ T-Lymphozyten in der WOFIE-Gruppe, welcher in der Kontrollgruppe ausblieb (prozentualer Anteil regulatorischer T-Lymphozyten 3 Monate nach Transplantation $8,3 \pm 2,7\%$ in der WOFIE- versus $4,1 \pm 1,7\%$ in der Kontroll-Gruppe, $P > 0,05$, statistisch nicht signifikant in der 2-way ANOVA mit anschließendem Bonferroni post Test). Sechs Monate nach Transplantation fand sich in der Studiengruppe, deren Immunsuppression initial für 72 Stunden unterbrochen wurde, verglichen mit der Kontroll-Gruppe ein signifikant höherer Anteil der untersuchten T-Helferzellsubpopulation, welcher auch im Langzeitverlauf, 1 und 2 Jahre nach Transplantation, auf diesem Niveau stabil blieb (prozentualer Anteil $CD4^+CD25^+$ regulatorischer T-Zellen $14,4 \pm 6,4\%$, $15,5 \pm 4,9\%$ und $14,5 \pm 3,3\%$ in der WOFIE- versus $8,1 \pm 4,6\%$, $9,0 \pm 5,6\%$ und $9,3 \pm 4,5\%$ in der Kontroll-Gruppe 6 Monate und 1 und 2 Jahre nach Transplantation, $P < 0,001$, statistisch signifikant in der 2-way ANOVA mit anschließendem Bonferroni post Test).

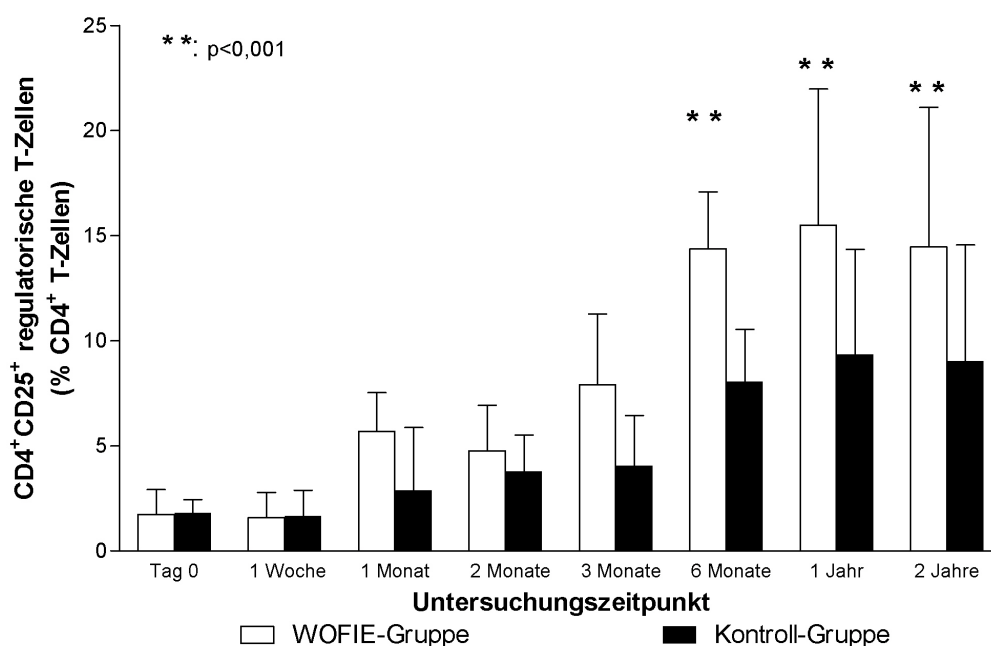


Abbildung 4.7: Durchflußzytometrische Analyse des prozentualen Anteils regulatorischer $CD4^+CD25^+$ T-Lymphozyten an der $CD4^+$ T-Helferzellpopulation in beiden Untersuchungsgruppen von Tag 0 bis 2 Jahre nach Transplantation. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm Standardabweichung. Während beide Untersuchungsgruppen unabhängig vom immunsuppressiven Protokoll innerhalb der ersten 2 Monate nach Transplantation nur einen niedrigen prozentualen Anteil regulatorischer T-Lymphozyten im peripheren Blut aufwiesen, war in der WOFIE-Gruppe nach 3 Monaten eine deutliche Zunahme dieser Zellpopulation zu verzeichnen. Nach 6 Monaten fand sich bei den Patienten, welche nach dem WOFIE-Protokoll immunsupprimiert wurden, ein signifikant höherer Anteil regulatorischer $CD4^+CD25^+$ regulatorischer T-Zellen, welcher sich im Langzeitverlauf, 1 und 2 Jahre nach Transplantation, auf diesem Niveau stabilisierte und in der Kontroll-Gruppe ausblieb ($P < 0,001$, statistisch signifikant in der 2-way ANOVA mit anschließendem Bonferroni post Test).

4.3 Analyse der Foxp3 Expression isolierter CD4⁺CD25⁺ T-Lymphozyten (semiquantitative PCR mit anschließender realtime-PCR)

Die Expression des Foxp3 Gens als spezifischer Marker regulatorischer T-Zellen wurde in isolierten CD4⁺CD25⁺ T-Lymphozyten 2 Jahre nach Transplantation mittels semiquantitativer PCR und anschließender rt-PCR bestimmt. Verwertbare Mengen von cDNA ließen sich zu diesem Untersuchungszeitpunkt bei 12 WOFIE-Patienten und 11 Kontroll-Patienten gewinnen. Initial erfolgte die semiquantitative Analyse der Proben durch Amplifikation und Darstellung mittels Agarosegel-Elektrophorese. Die Abbildungen 4A und 4B zeigen exemplarisch die ermittelten Expressionslevel für β -Actin und Foxp3 bei 4 WOFIE- (Säulen 1-4) und 5 Kontroll-Patienten (Säulen 5-9). Die ermittelten Expressionslevel vom β -Actin (Abbildung 4.8 A), welches als Kontrolle mitgeführt wurde, zeigten bei allen Patienten unabhängig vom immunsuppressiven Protokoll (Säulen 1-4 WOFIE-, Säulen 5-9 Kontroll-Gruppe) eine äquivalente Amplifikation und somit vergleichbare Mengen an vorhandener cDNA. Abbildung 4.8B zeigt exemplarisch die Agarosegel-Elektrophorese von 4 WOFIE- und 5 Kontroll-Patienten. Während in der WOFIE-Gruppe alle 4 Patienten eine deutliche Foxp3 Amplifikation aufwiesen, ließ sich nur bei 2 Patienten der Kontroll-Gruppe eine Expression von Foxp3 nachweisen.

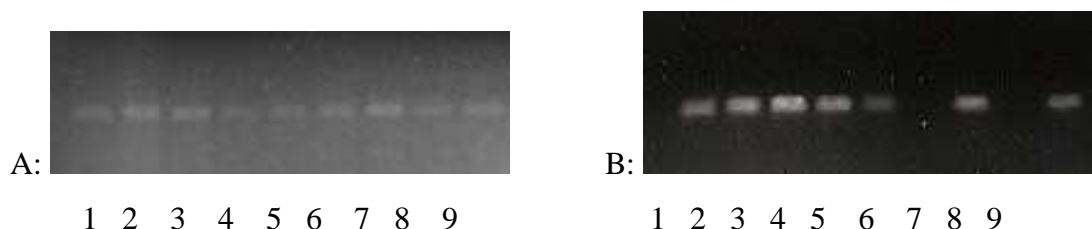


Abbildung 4.8A+B: Exemplarische Darstellung der mittels semiquantitativer PCR ermittelten Expressionslevel von β -Actin (4.8A) und FOXp3 (4.8B) bei 4 WOFIE- (Säulen 1-4) und 5 Kontroll-Patienten (Säulen 5-9) 2 Jahre nach Transplantation. Die Expressionslevel vom β -Actin wiesen dabei unabhängig vom immunsuppressiven Protokoll eine äquivalente Amplifikation und somit vergleichbare Mengen an vorhandener cDNA auf. Dahingegen zeigten nur 2 von 5 Kontroll-Patienten eine Expression von Foxp3, während in der WOFIE-Gruppe alle 4 Patienten eine Foxp3 Amplifikation aufwiesen.

Die nachfolgende rt-PCR erfolgte bei allen Patienten unter Verwendung einer Verdünnungsreihe eines vorgefertigten Foxp3 Standards. Auch hier wurde β -Actin als Kontrolle bei allen Proben mitgeführt. Um Varianzen und Fehlbestimmungen auszuschließen, wurde von jeder Patientenprobe ein 3-facher Ansatz fertig gestellt. Die für die einzelnen Patienten 2 Jahre nach Transplantation ermittelten Werte für Foxp3 und β -Actin sind den

Anhangstabellen 8.2 (WOFIE) und 8.3 (Kontrolle) zu entnehmen. Die nachfolgende Graphik 4.9 zeigt exemplarisch das mittels rt-PCR erhaltene Amplifikationsschema von 4 WOFIE- und 5 Kontroll-Patienten.

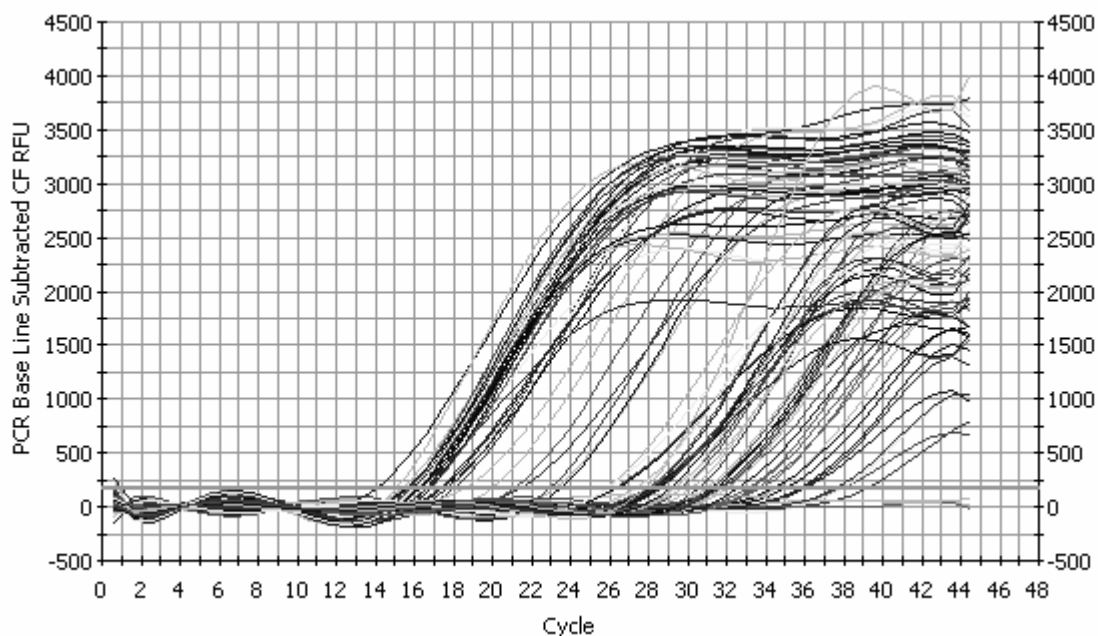


Abbildung 4.9: Graphische Darstellung des mittels rt-PCR erhaltenen Amplifikationsschemas von FoXP3, β -Actin und einem FoXP3-Standard von 4 WOFIE- und 5 Kontroll-Patienten 2 Jahre nach Transplantation. Die Messung jeder Probe erfolgte als 3-fach Ansatz. Der kalkulierte Threshold wurde mit 162,5 festgelegt.

Die genaue Bestimmung der cDNA-Menge (in Nanogramm) von FoXP3 und β -Actin erfolgte anschließend unter Verwendung der ermittelten Standardkurve wie in Abbildung 4.10 für FoXP3 dargestellt.

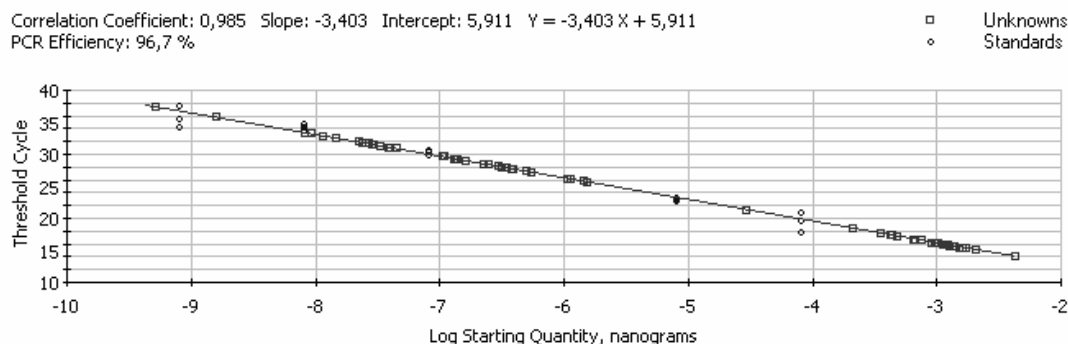


Abbildung 4.10: Bestimmung der cDNA-Menge für FoXP3 (in Nanogramm) unter Verwendung einer Standardkurve. Exemplarische Darstellung der Ergebnisse von 4 WOFIE- und 5 Kontroll-Patienten 2 Jahre nach Transplantation (3-fach Ansatz/Patientenprobe).

Die ermittelte cDNA-Menge für Foxp3 wurde anschließend bei allen Patienten zu β -Actin normalisiert, um vorhandene Varianzen der cDNA-Ausgangsmenge auszugleichen. Zwei Jahre nach Transplantation fand sich in den peripheren $CD4^+CD25^+$ regulatorischen T-Zellen der WOFIE-Gruppe mit $0,000487 \pm 0,0003468$ Foxp3 normalisiert zu β -Actin eine signifikant höhere Expression als in der Kontroll-Gruppe, deren Immunsuppression initial nicht unterbrochen wurde (Foxp3-Expression normalisiert zu β -Actin in $CD4^+CD25^+$ T-Zellen regulatorischer T-Zellen $0,0001723 \pm 0,0001378$, $p < 0,05$, statistisch signifikant im t-Test für unverbundene Stichproben). Die Expression von Foxp3 korreliert somit mit dem nach 2 Jahren signifikant höheren prozentualen Anteil regulatorischer T-Zellen in der WOFIE-Gruppe (Siehe Abbildung 4.11).

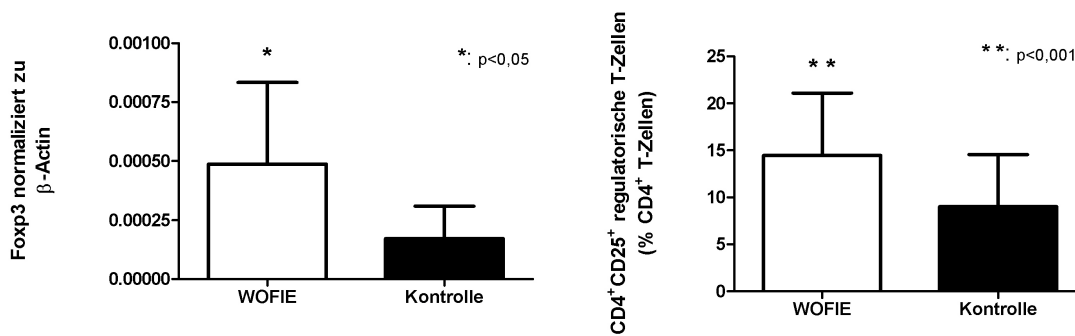


Abbildung 4.11: Darstellung der Ergebnisse der rt-PCR von Patienten der WOFIE und der Kontroll-Gruppe nach 2 Jahren. Zwei Jahre nach Transplantation fand sich in den peripheren $CD4^+CD25^+$ regulatorischen T-Zellen der WOFIE-Gruppe eine signifikant höhere Expression als in der Kontroll-Gruppe, (Foxp3 Expression regulatorischer T-Zellen nach 2 Jahren, normalisiert zu β -Actin, $p < 0,05$). Vergleichend dazu dargestellt der Anteil von $CD4^+CD25^+$ der untersuchten Patienten zum dem Zeitpunkt (WOFIE $14,5 \% \pm 3,3$ vs. Kontrolle $9,3 \% \pm 4,5$; $P < 0,001$).

5. DISKUSSION

Die der vorliegenden Arbeit zugrunde liegende prospektive randomisierte Kieler Studie konnte erstmals unter kontrollierten Bedingungen an nierentransplantierten Patienten nachweisen, dass die Einhaltung eines initialen immunsuppressiven Fensters von 72 Stunden (WOFIE) zu einer deutlichen Verminderung primärer akuter Transplantatabstoßungen führt, und Patienten eine sichere steroidfreie niedrig dosierte Dauerimmunsuppression ermöglicht. Die verantwortlichen immunologischen Vorgänge, die zur Induktion operationaler Toleranz führen, sind jedoch weitestgehend unklar. Tierexperimentelle Arbeiten unter Anwendung des WOFIE-Protokolls zeigten bereits früh nach Transplantation eine Ansammlung zahlreicher proliferierender Zellen im allogenen Herztransplantat, welche sich zwischen intakten Myozyten gruppierten (Dreßke et al., 1998). Eine initiale Aktivierung des Immunsystems mit Nachweis zellulärer Infiltrate im Transplantat selbst konnte auch in anderen Toleranzprotokollen gezeigt werden (Koshihara et al., 2007) und wurde von der Gruppe von R. Calne bei der Induktion spontaner Toleranz nach allogener Lebertransplantation beobachtet (Calne et al., 1969). Regulatorischen $CD4^+CD25^+$ T-Zellen wurde in den letzten Jahren bei der Induktion von Transplantattoleranz eine essentielle Bedeutung zugesprochen (Piccirillo und Shevach 2002; Cobbold et al., 2004; Walsh et al., 2004). Erste klinische Daten nach humaner Lungentransplantation zeigten bei Patienten mit chronischer Transplantatabstoßung und Bronchiolitis obliterans eine vergleichsweise niedrigere Anzahl peripherer $CD4^+CD25^+$ T-Zellen als bei Patienten mit stabiler Transplantatfunktion (Meloni et al., 2004; Louis et al., 2006). Die Gruppe von Pons konnte in operational toleranten Empfängern eines Lebertransplantates nach Absetzen der Immunsuppression einen Anstieg und eine Persistenz peripherer $Foxp3^+$ regulatorischer T-Zellen nachweisen, welcher ausblieb, wenn es nach Absetzen der Immunsuppression zu einer Transplantatabstoßung kam (Pons et al., 2008). Die Rolle der verschiedenen immunologischer Effektorzellen, insbesondere die regulatorischer T-Zellen, im Rahmen des WOFIE-Protokolls ist bislang ungeklärt und sollte in der vorliegenden Arbeit im Verlauf der ersten 2 Jahre nach Transplantation näher analysiert werden. Die durchflußzytometrische Messung im peripheren Blut zeigte über den gesamten Beobachtungszeitraum unabhängig vom immunsuppressiven Protokoll einen niedrigen Anteil $CD19^+$ B-Zellen. Auch der prozentuale Anteil der Gesamt-T-Zellpopulation sowie die Differenzierung in $CD3^+CD8^+$ T-Suppressorzellen und $CD3^+CD4^+$ T-Helferzellen als wichtige Effektorzellen der akuten Transplantatabstoßung (Maspoust, 2007) ergaben nur geringfügige Unterschiede zwischen beiden Behandlungsgruppen. Lediglich in den ersten 4 Wochen nach

Transplantation fand sich in der Kontroll-Gruppe ein leichter Anstieg $CD3^+CD8^+$ T-Suppressorzellen, welcher in der WOFIE-Gruppe ausblieb, aber keine statistische Signifikanz erreichte. Während der prozentuale Anteil regulatorischer $CD4^+CD25^+$ T-Lymphozyten innerhalb der ersten 2 Monate nach Transplantation in beiden Untersuchungsgruppen niedrig war, fand sich 3 Monate nach Transplantation bereits eine Verdopplung dieser Zellpopulation in der WOFIE-Gruppe. Nach 6 Monaten war der Anteil regulatorischer $CD4^+CD25^+$ T-Lymphozyten im Vergleich zur Kontroll-Gruppe signifikant angestiegen und verblieb auch im weiteren Verlauf auf diesem erhöhten Niveau stabil. Die 2 Jahre nach Transplantation an isolierten $CD4^+CD25^+$ T-Lymphozyten durchgeführte PCR mit anschließender real-time-PCR zeigte in Korrelation zu dem durchflußzytometrisch ermittelten signifikant erhöhten prozentualen Anteil $CD4^+CD25^+$ T-Lymphozyten eine signifikant höhere Expression von Foxp3 in der WOFIE-Gruppe. Foxp3 ist ein spezifischer Marker funktionsfähiger regulatorischer T-Zellen (Nishimura et al., 2004) und essentiell für deren Entwicklung (Fontenot et al., 2003; Hori et al., 2003). Zwar konnte Foxp3 auch in aktivierten humanen T-Effektorzellen nachgewiesen werden, doch war hier die Expression zeitlich begrenzt und schien keinen regulatorischen T-Zellphänotyp zu induzieren (Gavin et al., 2006). In verschiedenen in-vitro Studien gelang es, $CD4^+$ T-Zellen durch eine retrovirale Transduktion von Foxp3 in einen $CD4^+CD25^+$ Phänotyp mit entsprechender suppressiver Funktion zu überführen (Fontenot et al., 2003; Chai et al., 2005). Zudem konnte gezeigt werden, dass $CD4^+CD25^+$ Zellen ohne relevante Foxp3-Expression ein deutlich geringeres Suppressionspotential aufweisen (Hori et al., 2003) und Mutationen des Foxp3 Gens in der Maus und beim Menschen zu aggressiv verlaufenden Autoimmunerkrankungen führen (Bennett et al., 2001; Brunkow et al., 2001). Der quantitative Nachweis einer signifikant erhöhten Foxp3-Expression in $CD4^+CD25^+$ T-Zellen nach dem WOFIE-Protokoll behandelte Transplantatempfänger nach einem Zeitraum von 2 Jahren nach Transplantation belegte somit eindeutig die regulatorische Funktion der durchflußzytometrisch ermittelten Zellpopulation im Blut. Bis auf die initiale 72-stündige Unterbrechung der Immunsuppression in der WOFIE-Gruppe haben beide Behandlungsgruppen der vorgelegten klinischen Studie eine in Dosis und Wirkstoff identische immunsuppressive Therapie erhalten. Der signifikant erhöhte Anteil peripherer regulatorischer $CD4^+CD25^+$ T-Zellen und der dazu in Korrelation stehende klinische tolerogene Effekt in der WOFIE-Gruppe müssen daher in der initialen immunsuppressiven Pause begründet sein. Die Aktivierung $CD4^+CD25^+Foxp3^+$ regulatorischer T-Zellen erfolgt im wesentlichen über den indirekten Weg der Antigenpräsentation (Scully et al., 1994, Sanchez-Fueyo et al., 2007). Eine Inaktivierung des

indirekten Weges der Antigenpräsentation bei MHC-Klasse II defizienten Mäusen verhinderte auch bei kostimulatorischer Blockade das Langzeitüberleben allogener Herztransplantate, selbst wenn dem Empfänger $CD4^+$ -T-Zellen nicht-MHC-Klasse II defizienter Mäuse zugeführt wurden (Yamada et al, 2001). Neuere experimentelle Studien konnten zudem zeigen, dass eine vorangegangene retrovirale Transduktion regulatorischer $CD4^+CD25^+$ T-Zellen mit TCR-Genen, welche ein spezifisches Erkennungspotential für MHC-Klasse II Antigene des Spenderes aufwiesen, zu einer Ausbildung von Langzeitorganakzeptanz allogener muriner Herztransplantate führt (Tsang et al., 2008). Die der Rekrutierung regulatorischer T-Zellen zugrunde liegenden immunologischen Vorgänge wurden in der Arbeit von Lee et al. in einem Toleranzmodell der Maus nach Herztransplantation untersucht. Hierbei fand sich neben einer deutlich erhöhten Expression von Foxp3 und CCR4 auch eine erhöhte Expression des Makrophagen-assoziierten CCR4-Liganden CCL22 (Lee et al., 2005). Untersuchungen des WOFIE-Protokolls der eigenen Gruppe im Rattenmodell der allogenen Herztransplantation unter Verwendung verschiedener Immunsuppressiva legten ebenfalls nahe, dass dem Monozyten-Makrophagensystem als antigenpräsentierende Zellen eine entscheidende Rolle bei der Induktion operationaler Toleranz zukommt. Das Langzeitüberleben transplantierte Herzen war unter Anwendung von Rapamycin im Vergleich zu dem Calcineurininhibitor Tacrolimus deutlich verkürzt. Dabei fand sich innerhalb der ersten 3 Tage nach Organreperfusion in den Transplantaten mit Rapamycin behandelte Empfänger eine fast komplette Deletion der Makrophagen im Transplantat (Dreßke et al., 2004). Entsprechend demonstrierte die Arbeitsgruppe von Strober in der Ratte, dass nur die Applikation spenderspezifischer Monozyten nach allogener Nierentransplantation einen immunsuppressiven Effekt zeigte, während die Transfusion separierter T- und B-Zellen das Organüberleben nicht begünstigte (Hayamizu et al., 1999). Die im Gegensatz zu den Zellen der spezifischen Immunantwort frühe Präsenz antigenpräsentierender Zellen im Transplantat (Dresske et al., 1996) legt nahe, dass eine Aktivierung regulatorischer $CD4^+CD25^+$ T-Zellen bereits in der ersten Phase nach Transplantation stattfindet. Eine Unterbrechung der Immunsuppression in dieser Phase, welche entsprechend der von R. Calne postulierten WOFIE-Hypothese (Calne et al., 1994; Calne et al. 2004) eine Interaktion immunkompetenter Effektorzellen zwischen Spender und Empfänger bahnt, scheint somit die Induktion regulatorischer T-Zellen zu ermöglichen. Kontrollbiopsien der Nierentransplantate zu definierten Zeitpunkten nach Transplantation war im Protokoll der vorliegenden klinischen Studie nicht vorgesehen, so dass bezüglich der immunregulatorischen Vorgänge im Transplantat selbst keine Aussage getroffen werden konnte. Die selektive Anreicherung

regulatorischer T-Zellen im Transplantat wurde jedoch tierexperimentell für Toleranzmodelle bei Haut- (Graca et al., 2002), Herz- (Haanstra et al., 2007) und Nierentransplantation (Lee et al., 2005; Wang et al., 2008) sowie in spontan toleranten Lebertransplantaten demonstriert (Li et al., 2004). Auch erste klinische Studien, welche unter anderem die Expression von Foxp3 und CXCR4 in Transplantaten von Nierenempfängern mit nachgewiesener chronischer Abstossung sowie nach Langzeitüberleben (> 9 Jahre) untersuchten, zeigten im Vergleich eine deutlich höhere Expression beider Marker in langzeitüberlebenden Nierenempfängern als Indikatoren für ursächliche regulatorische Prozesse (Alvarez et al., 2009). Entsprechend unterstrichen Brown und Wang die für den weiteren Transplantatverlauf prognostische Bedeutung von Foxp3 und regulatorischen T-Zellen in Transplantat und Urin (Brown und Wong, 2008). Eine detaillierte klinische Untersuchung von Leberbiopsien toleranter Empfänger im Vergleich zu Organen, welche aufgrund einer chronischen Abstoßung entfernt wurden, sowie Transplantaten immunsupprimierter Empfänger und nicht-transplantierten Lebern wurde von der Gruppe von Li durchgeführt. Sie zeigte eine im Vergleich zu immunsupprimierten Empfängern deutlich erhöhte Expression von Foxp3 in toleranten Organen. Diese fand sich vornehmlich in Clustern CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen der Portalregion, wobei sich interessanterweise die absolute Zellzahl dieser Gruppen nicht unterschied. Bei chronisch abgestossenen Transplantaten hingegen war kaum eine Foxp3-Expression nachweisbar (Li et al., 2008). Klinische und experimentelle Studien bezüglich der zeitlichen Kinetik des Auftretens regulatorischer T-Zellen sind jedoch rar. Unpublizierte Daten von Lee et al. beschreiben eine frühe Rekrutierung regulatorischer T-Zellen aus der Milz herztransplantierte Mäuse nach 3 Tagen (Lee et al., 2005). Auch eine Studie von Sakamoto et al., welche an lebertransplantierten Patienten durchgeführt wurde, spricht für eine frühe Aktivierung regulatorischer T-Zellen mit einem entsprechendem Anstieg von Foxp3 innerhalb der ersten 7 Tage nach Transplantation (Sakamoto et al., 2009). Eine immunsuppressive Therapie mit Tacrolimus und Steroiden sowie die kleine Kohorte von nur 15 Patienten schränken jedoch die Aussage hier ein. Die Induktion von Foxp3 in CD4⁺CD25⁻ T-Zellen erfolgt insbesondere durch TGF-β (Fu et al., 2004). Mit TGF-β behandelte CD4⁺CD25⁻ T-Zellen hatten einen deutlichen antiinflammatorischen Effekt nach Pankeasinseltransplantation im murinen Modell und verlängerten das Transplantatüberleben signifikant. Damit zeigten sie eine primären CD4⁺CD25⁺ regulatorischen T-Zellen vergleichbare Funktion. Entscheidend war hier zudem die gleichzeitige Aktivierung des IL-2 Rezeptors. IL-2 ist von besonderer Bedeutung für die Aktivierung und den Erhalt regulatorischer T-Zellen (D’Cruz und Klein 2005; Setoguchi et al., 2005; Bayer et al., 2005).

Bei Patienten mit Ewing- und Rhabdomyosarkomen (Zhang et al., 2005) oder malignen Melanomen (Ahmadzadeh und Rosenberg, 2006) konnte durch Applikation von IL-2 die Anzahl CD4⁺CD25⁺ Zellen signifikant erhöht werden. Andere in-vivo Studien zeigten entsprechend, dass die Aktivierung CD4⁺CD25⁺ regulatorischer T-Zellen durch Blockierung von IL-2 und TNF- β gehemmt wird (Josien et al., 1998 und Furtado et al, 2002). In der vorliegenden Arbeit fand sich zwar ein erster Anstieg peripherer CD4⁺CD25⁺ nach 3 Monaten, aber erst 6 Monate nach Transplantation zeigte sich eine gegenüber der Kontrollgruppe signifikante Zunahme dieser Zellpopulation. Diese Expansion regulatorischer T-Zellen korrelierte zeitlich zum einen mit der Beendigung der IL-2 Rezeptorantikörperbehandlung zum anderen mit dem Ausschleichen der Steroide. Kortikosteroide inhibieren Transkriptionsfaktoren wie NK- κ B und AP-1, welche unter anderem bei der Transkription von IL-2, TNF- α und INF- γ beteiligt sind. CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ T-Zellen exprimieren unter anderem den Glukokortikoidrezeptor sowie GITR (Glukokortikoid-induzierter Tumornekrosefaktor-Rezeptor), einen potenten kostimulatorischen T-Zellrezeptor und Regulator für die Funktion regulatorischer T-Zellen (Chen et al., 2004). Die Hemmung oder Defizienz des GITR hebt die suppressive Funktion regulatorischer T-Zellen auf und führt somit zu einem Anstieg der T-Zellproliferation (Shimizu et al., 2002; Kanamaru et al., 2004). Dahingegen wird unter Kokultivierung regulatorischer T-Zellen mit Steroiden die Expression von Foxp3 unter Erhalt der suppressiven Potenz regulatorischer T-Zellen stimuliert (Karagiannidis et al., 2004). Kortikosteroide scheinen somit die Funktion regulatorischer T-Zellen nicht negativ zu beeinflussen, sondern im Gegenteil Zellüberleben und Funktion zu stützen. Die Blockade des IL-2 Rezeptors durch den monoklonalen Antikörper Daclizumab muss jedoch im Hinblick auf Aktivierung und Entwicklung regulatorischer T-Zellen kritisch bewertet werden. In vitro Studien zeigten unter Zugabe eines IL-2-Rezeptorantikörpers eine Inhibierung der Foxp3 mRNA-Induktion in allostimulierten mononukleären Zellen (Baan et al., 2005), eine Herabregulation der Foxp3-Expression (Kreijveld et al., 2007) sowie eine fehlende Expansion regulatorischer T-Zellen (Lopez et al., 2006). Allerdings wurde in direkter Ko-Inkubation von T-Effektorzellen, regulatorischen T-Zellen und einem anti-CD25 Antikörper die suppressive Potenz regulatorischer T-Zellen nicht gestört (Game et al, 2005). Tierexperimentelle Daten scheinen widersprüchlich. So zeigte die Gruppe von Couper in der Maus, dass der prozentuale Anteil Foxp3⁺ Zellen in der CD4-Zellfraktion durch Zugabe eines IL-2 Rezeptorantikörpers deutlich reduziert wird (Couper et al., 2007), während Kohm et al. nachwies, dass die Anzahl peripherer regulatorischer T-Zellen zwar gleich bleibt, ihre suppressive Funktion

jedoch inaktiviert wird (Kohm et al., 2006). Bislang liegen nur wenige klinische Daten mit meist kleinen Patientenkollektiven vor, welche den Einfluss einer IL-2 Rezeptorantikörpertherapie auf die Population regulatorischer T-Zellen untersuchten. Die Gruppe von Salama konnte berichten, dass die Induktionstherapie mit einem IL-2-Rezeptorantikörper die Entwicklung regulatorischer T-Zellen nicht verhindert (Salama et al., 2003). Wang et al. zeigten bei Empfängern einer Lebendniere, welche mit Daclizumab behandelt wurden, einen geringeren initialen Anstieg regulatorischer T-Zellen im peripheren Blut als bei Lebendnierenempfängern ohne Antikörperinduktion. Dieser Effekt schien jedoch nur vorübergehend und erholte sich im Verlauf. Bei einer Beobachtungszeit von nur 27 Tagen liegen allerdings keine Aussagen über den Langzeitverlauf vor (Wang et al., 2008). Interessanterweise konnte die gleiche Arbeitsgruppe einige Jahre später nachweisen, dass sich zwar die Anzahl regulatorischer T-Zellen unter Therapie mit dem IL-2 Rezeptorantikörper Basiliximab verringert, in einer funktionellen Analyse jedoch die inhibitorische Potenz dieser Zellpopulation gleichbleibt (Wang et al., 2009). Diese Daten wie auch Untersuchungen von Kreijveld et al. (Kreijveld et al., 2007), welche bei nierentransplantierten Patienten demonstrierten, dass auch unter Therapie mit einem anti-CD25 Antikörper ein funktionsfähiger Pool regulatorischer T-Zellen verbleibt, korrelieren mit den Ergebnissen der vorliegenden Studie. Die Induktion regulatorischer T-Zellen wurde hier durch die Medikation mit Daclizumab in der WOFIE-Gruppe nicht verhindert, eine Expansion dieser Zellpopulation fand jedoch erst nach Absetzen der Therapie statt und wurde im großer Wahrscheinlichkeit durch den IL-2 Rezeptorantikörper zeitlich verzögert. In vitro und neuere in vivo Daten sprechen im Hinblick auf die Beeinflussung regulatorischer T-Zellen bei der Wahl einer Antikörperinduktion für eine deutliche Überlegenheit von ATG (Antithymozytenglobulin) und dem anti-CD52 Antikörper Campath 1 H, welcher auch von R. Calne bei der ersten klinischen Anwendung des WOFIE-Protokolls verwandt wurde (Calne et al., 1999). Die Zugabe von ATG zu kultivierten humanen peripheren Blutstammzellen führte zu einer Expansion regulatorischer T-Zellen und einer erhöhten Expression von Foxp3 (Lopez et al., 2006). Dabei schien die Herkunft des ATG von essentieller Bedeutung, da dieser Effekt nur unter Zugabe von Kannichen-ATG zu peripheren mononukleären Zellen, aber nicht unter Zugabe von Pferde-ATG beobachtet wurde (Feng et al., 2008). Die Wirkung von Campath1H auf die Population peripherer regulatorischer T-Zellen wurde von Bloom et al. nach humaner Nierentransplantation untersucht (Bloom et al., 2008). Auch wenn die Behandlung mit dem anti-CD52 Antikörper zu einer Verminderung der peripheren Gesamt-T-Zellpopulation führte, fand sich eine deutliche Erhöhung $CD4^+CD25^+Foxp3^+$ T-Zellen innerhalb der $CD4^+$ T-

Zellpopulation mit einem entsprechenden Anstieg des T_{reg}/T_{eff} -Quotienten bis 24 Monate nach Transplantation. Der genaue immunologische Wirkmechanismus von Campath 1H auf die Population regulatorischer T-Zellen ist jedoch unklar. In vitro Daten der Gruppe schließen eine Proliferation regulatorischer T-Zellen wie auch eine erhöhte thymale Produktion oder eine Schonung dieser Zellpopulation durch den Antikörper aus. Eine mögliche Erklärung bietet die Konversion $CD4^+CD25^-$ zu $CD4^+CD25^+$ Zellen, wie sie für die Maus beschrieben wurde (Curotto de Lafaille et al., 2004; Almeida et al., 2006), in humanen Studien derzeit aber noch kontrovers diskutiert wird (Allan et al., 2007; Vukamanovic-Stejic et al., 2006). Die immunsuppressive Erhaltungstherapie der transplantierten Patienten erfolgte in der vorliegenden Arbeit mit dem Calcineurininhibitor Tacrolimus und Mycophenolatmofetil. Während Mycophenolatmofetil die Expression von Foxp3 und die suppressive Potenz regulatorischer T-Zellen nicht zu beeinflussen scheint (Gregori et al., 2001; Zeiser et al., 2006), interferieren Calcineurininhibitoren über eine Inhibierung der Phosphatase Calcineurin mit der IL-2 Transkription und führen somit zu einer verminderten Bildung von IL-2 (Matsuda und Koyasu, 2000; Hamawy 2003). In der gemischten Lymphozytenkultur wurde durch den Zusatz von Calcineurininhibitoren die Induktion von Foxp3 mRNA gehemmt (Baan et al., 2005). Ähnliche Ergebnisse zeigten in vitro Experimente von Zeiser et al. (Zeiser et al., 2006). Auch in vivo konnte entsprechend in der Maus demonstriert werden, dass die Behandlung mit Cyclosporin A nicht nur die Generierung regulatorischer T-Zellen im Thymus beeinträchtigt, sondern ebenfalls zu einer deutlichen Verminderung dieser Zellpopulation in den peripheren Kompartimenten des Immunsystems führt (Coenen et al., 2007). Der inhibierende Einfluss von Calcineurininhibitoren auf regulatorische T-Zellen scheint dabei mit der Herabregulation von IL-2 zu korrelieren (Demirkiran et al., 2008). Klinische Daten sind auch hier rar. Eine Arbeit von Segundo et al. zeigte jedoch auch, dass die Anzahl regulatorischer T-Zellen bei nierentransplantierten Patienten, welche mit Calcineurininhibitoren therapiert wurden, im Vergleich zu Rapamycin-behandelten Empfängern signifikant reduziert war (Segundo et al., 2006). Diese Ergebnisse konnten durch die vorliegende Arbeit nicht gestützt werden. Hier blieb bei korrelierenden Tacrolimusblutspiegeln in beiden Behandlungsarmen lediglich in der Kontroll-Gruppe der Anstieg regulatorischer T-Zellen aus, während die Calcineurininhibitorbehandlung die Entwicklung $Foxp3^+CD4^+CD25^+$ in der WOFIE-Gruppe nicht beeinträchtigte. Mit den Ergebnissen der Kieler Studie konnte die von R.Calne aufgestellte Hypothese der Induktion operationaler oder Beinah Toleranz auf dem Boden eines immunsuppressiven Fensters unter kontrollierten Bedingungen klinisch und, wie in der vorliegenden Arbeit demonstriert,

erstmalig immunologisch belegt werden. Der Nachweis $\text{Foxp3}^+\text{CD4}^+\text{CD25}^+$ regulatorischer T-Zellen, die auch noch 2 Jahre nach Transplantation im peripheren Blut nachweisbar waren, spricht eindeutig für eine Induktion tolerogener immunologischer Vorgänge, die während der Unterbrechung der Immunsuppression in der initialen Phase stattfinden müssen. Wie diese Prozesse im Detail aussehen, muß im Rahmen weiterer experimenteller und klinischer Untersuchungen unter Berücksichtigung der im Transplantat selbst stattfindenden Vorgänge weiter geklärt werden. Dabei sollten insbesondere die derzeit zur Verfügung stehenden immunsuppressiven Substanzen und ihr Einfluß auf regulatorische immunologische Prozesse genau analysiert werden, um die Immunsuppression für das WOFIE-Protokoll zu optimieren.

6. ZUSAMMENFASSUNG

Entsprechend der von R. Calne postulierten WOFIE-Hypothese konnte in einer prospektiv randomisierten und kontrollierten Studie an nierentransplantierten Patienten der Klinik für Allgemeine Chirurgie und Thoraxchirurgie des Universitätsklinikums Schleswig-Holstein, Campus Kiel, nachgewiesen werden, dass eine initiale Unterbrechung der Immunsuppression für 72 Stunden zu einer Verminderung akuter Transplantatabstoßungen führt und eine steroidfreie niedrig dosierte Dauerimmunsuppression ermöglicht. Ziel der vorliegenden Arbeit war es, die für den beobachteten klinischen tolerogenen Effekt verantwortlichen immunologischen Prozesse näher zu analysieren. Dabei sollte insbesondere die Subpopulation regulatorischer CD4⁺CD25⁺ T-Zellen, welcher bei der Induktion von Transplantattoleranz eine entscheidende Rolle zukommt, genauer betrachtet werden. Das Patientenkollektiv bestand aus 40 nierentransplantierten Patienten, welche im Verhältnis 1:1 in 2 Studienarme (Kontroll-Gruppe versus WOFIE-Gruppe) randomisiert wurden. Die Immunsuppression umfasste den IL-2 Rezeptorantikörper Daclizumab (Tag 0 sowie 2, 4, 6 und 8 Wochen nach Transplantation), Mycophenolat Mofetil, Tacrolimus und Prednisolon. In der WOFIE-Gruppe wurde die immunsuppressive Therapie nach präoperativer Induktion mit Daclizumab, MMF und Prednisolon für insgesamt 72 Stunden unterbrochen, während diese in der Kontroll-Gruppe unmittelbar nach Transplantation fortgesetzt wurde. Acht Wochen nach Transplantation wurden die Steroide in beiden Behandlungsgruppen ausgeschlichen und die Immunsuppression als niedrig-dosierte Dualtherapie mit MMF und Tacrolimus fortgesetzt. Insgesamt konnten 14 Patienten der WOFIE- und 16 Patienten der Kontroll-Gruppe für 2 Jahre nach Transplantation nachbeobachtet werden. Im Rahmen der festgelegten Untersuchungen wurde zusätzlich an den Tagen 0 und 7 sowie nach 1, 2, 3, 6, 12 und 24 Monaten nach Transplantation Vollblut entnommen, welches einer durchflußzytometrischen Analyse zugeführt wurde. Zwei Jahre nach Transplantation erfolgte zudem eine quantitative Bestimmung der Foxp3-Expression an peripheren isolierten CD4⁺CD25⁺ T-Zellen mittels PCR und anschließender real-time-PCR (normalisiert zu β -Actin). Die durchflußzytometrische Analyse zeigte unabhängig vom immunsuppressiven Protokoll während des gesamten Beobachtungszeitraumes einen konstant niedrigen Anteil CD19⁺ B-Lymphozyten. Natürliche Killerzellen (CD3⁺16⁺56⁺ Zellen) machten ebenfalls in beiden Studiengruppen nur einen niedrigen prozentualen Anteil der Gesamtlymphozytenpopulation aus. Interessanterweise fand sich in der WOFIE-Gruppe 1 Woche nach Transplantation ein leichter Abfall der NK-Zellpopulation, welcher bis 6 Monate nach Transplantation

nachweisbar war und in der Kontroll-Gruppe zunächst ausblieb. Der prozentuale Anteil der Gesamt-T-Zellpopulation ($CD3^+$ Zellen) war in der WOFIE- im Vergleich zur Kontroll-Gruppe über den gesamten Beobachtungszeitraum geringer, erreichte jedoch keine statistische Signifikanz. Während beide Gruppen vor Transplantation einen vergleichbaren Anteil $CD3^+CD8^+$ Zellen im peripheren Blut aufwiesen, fand sich 1 Woche und 1 Monate nach Transplantation in der Kontroll-Gruppe ein leichter Anstieg dieser Zellpopulation, welcher in der WOFIE-Gruppe ausblieb. Dahingegen war der Anteil $CD3^+CD4^+$ T-Helferzellen in beiden Untersuchungsgruppen in den ersten 2 Jahren stabil. Innerhalb der ersten 2 Monate nach Transplantation zeigten beide Untersuchungsgruppen einen niedrigen prozentualen Anteil regulatorischer $CD4^+CD25^+$ T-Lymphozyten. Drei Monate nach Transplantation hatte sich der Anteil dieser Zellpopulation in der WOFIE-Gruppe bereits verdoppelt. Nach 6 Monaten fand sich hier im Vergleich zur Kontroll-Gruppe ein signifikant höherer Anteil, welcher im weiteren Verlauf auf diesem Niveau stabil blieb. Die 2 Jahre nach Transplantation an isolierten $CD4^+CD25^+$ T-Lymphozyten durchgeführte PCR mit anschließender real-time-PCR wies im Vergleich zur Kontroll-Gruppe eine signifikant höhere Expression von Foxp3 in der WOFIE-Gruppe nach. Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zeigten, dass der in der Studie zu beobachtende klinische tolerogene Effekt nach Einhaltung einer 72-stündigen Unterbrechung der Immunsuppression mit einer Induktion regulatorischer Foxp3-exprimierender $CD4^+CD25^+$ T-Zellen korrelierte. Der quantitative Nachweis einer höheren Foxp3-Expression in isolierten $CD4^+CD25^+$ T-Zellen der WOFIE-Patienten auch noch 2 Jahre nach Transplantation spricht für einen stabilen Effekt, welcher die von R. Calne aufgestellte Hypothese einer Induktion von Beinah-Toleranz unterstützt. Auch wenn die Gabe des anti-CD25 Antikörpers Daclizumab und die zugeführte Steroidmedikation in den ersten 8 Wochen nach Transplantation eine Expansion regulatorischer T-Zellen supprimierten, verhinderte ihr Einsatz keineswegs die Induktion dieser Zellpopulation. Dahingegen schien die immunsuppressive Medikation mit Tacrolimus und Mycophenolatmofetil weder mit der Induktion noch mit der Expansion dieser Zellpopulation zu interferieren. Die genauen immunologischen Vorgänge, welche zu der Induktion regulatorischer T-Zellen im Rahmen des WOFIE-Protokolls führten, sind jedoch noch unklar und bedürfen weiterer experimenteller und klinischer Untersuchungen im Transplantat selbst als auch im lymphatischen System.

7. LITERATURVERZEICHNIS

Ahmadzadeh, M., Rosenberg, S.A.:

IL-2 administration increase CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ regulatory T cells in cancer patients.

Blood 107, 2409-2414 (2006)

Alexander, S.I., Smith, N., Hu, M., Verran, D., Shun, A., Dorney, S., Smith, A., Webster, B., Shaw, P.J., Lammi, A., Stormon, M.O.:

Chimerism and tolerance in a recipient of a deceased donor liver transplant.

N. Engl. J. Med. 358, 369-374 (2008)

Allan, S.E., Crome, S.Q., Crellin, N.K., Passerini, L., Steiner, T.S., Bacchetta, R., Roncarolo, M.G., Levings, M.K.:

Activation-induced FOXP3 in human T effector cells does not suppress proliferation or cytokine production.

Int Immunol. 19, 345-354 (2007)

Allison, A.C., Eugui, E.M.:

Purine metabolism and immunosuppressive effects of mycophenolate mofetil (MMF).

Clin. Transplant. 10, 77-84 (1996)

Almeida, A.R., Zaragoza, B., Freitas, A.A.:

Competition controls the rate of transition between the peripheral pools of CD4⁺CD25⁻ and CD4⁺CD25⁺ T cells.

Int. Immunol. 18, 1607-1613 (2006)

Alvarez, C.M., Opelz, G., Garcia, L.F., Süsal, C.:

Expression of regulatory T cell related molecule genes and clinical outcome in kidney transplant recipients.

Transplantation 87, 857-863 (2009)

Arns, W., Weber, M.:

Increased frequency of acute rejection episodes is the best predictor for the development of a chronic rejection process in kidney transplantation.

Med. Klein. (Munich) 97/10, 609-613 (2002)

Baan, C., van der Mast, B.J., Klepper, M., Mol, W.M., Peeters, A.M., Korevaar, S.S., Balk, A.H., Weimar, W.:

Differential effect of calcineurin inhibitors, anti-CD25 antibodies and rapamycin on the induction of FOXP3 in human T cells.

Transplantation 80, 110-117 (2005)

Barao, I., Hanash, A.M., Hallett, W., Welniak, L.A., Sun, K., Redelman, D., Blazar, B.R., Levy, R.B., Murphy, W.J.:

Suppression of natural killer cell-mediated bone marrow cell rejection by CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells.

Proc. Nat. Acad. Sci. USA 103, 5460-5465 (2006)

Battaglia, M., Stabilini, A., Roncarolo, M.G.:

Rapamycin selectively expands CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ regulatory T cells.

Blood 105/12, 4743-4748 (2005)

Bayer, A.L., Yu, A., Adeegbe, D., Malek, T.R.:

Essential role for interleukin-2 for CD4⁺ CD25⁺ T regulatory cell development during neonatal period.

J. Exp. Med. 201, 769-777 (2005)

Beilke, J.N., Kuhl, N.R., Van Kaer, L., Gill, R.G.:

NK cells promote islet autografts via a perforin-dependent mechanism.

Nat. Med. 11, 1059-1065 (2005)

Bennett, C.L., Christie, J., Ramsdell, F.:

The immune dysregulation, polyendocrinopathy, enteropathy, X-linked syndrome (IPEX) is caused by mutations of FOXP3.

Nat. Genet. 27, 20 (2001)

Bernard, J.:

Ciclosporin: foreward.

Progress in Allergy 38, 1-8 (1986)

Billingham, R.E., Brent, L., Medawar, P.B.:

“Actively acquired tolerance” of foreign cells.

Nature 172, 603-606 (1953)

Bloom, D.D., Chang, Z., Fechner, J.H., Dar, W., Polster, S.P., Pascual, J., Turka, L.A., Knechtle, S.J.:

CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ regulatory T cells increase de novo in kidney transplant patients after immunodepletion with Campath-1h.

Am. J. Transplant. 8, 793-802 (2008)

Boots, J.M., Christiaans, M.H., van Hooff, J.P.:

Effect of immunosuppressive agents on long-term survival of renal transplant recipients: focus on the cardiovascular risk.

Drugs 64, 2047-2073 (2004)

Borel, J.F., Feurer, C., Gubler, H.U., Stähelin, H.:

Biological effects of cyclosporin A: a new antilymphocytic agent.

Agents and Actions 6, 468-475 (1976)

Brown, K., Wong, W.:

Diagnostic value of regulatory T cells: a new facet of a much studied cell population.

Transplantation 86, 1485-1491 (2008)

Brunkow, M.E., Jeffery, E.W., Hjerrild, K.A., Paepers, B., Clark, L.B., Yasayko, S.A., Wilkinson, J.E., Galas, D., Ziegler, S.F., Ramdell, F.:

Disruption of a new forkhead/winged-helix protein, scurf, results in the fatal lymphoproliferative disorder of the scurfy mouse.

Nat. Genet. 1, 68-73 (2001)

Calne, R.Y., Sells, R.A., Pena, J.R., Davies, D.R., Millard, P.R.,
Herbertson, B.M., Davies, D.A.:
Induction of immunological tolerance by porcine liver allografts.
Nature 223, 472-476 (1969)

Calne, R.Y., White D.J.G., Rolles, K., Smith, D.P.:
Prolonged survival of pig orthotopic heart grafts treated with cyclosporin A.
The Lancet 1182, 1185 (1978)

Calne, R.Y., White, D.J., Thiru, S., Evans, D.B., McMaster, P., Dunn, D. C., Craddock, G.N.,
Pentlow, B.D., Rolles, K.:
Cyclosporin A in patients receiving renal allografts from cadaver donors.
The Lancet 2, 1323-1327 (1978)

Calne, R.Y. ., White, D.J., Thiru, S., Evans, D.B., McMaster, P., Dunn, D.C., Craddock, G.
N., Pentlow, B. D., Rolles, K.:
Cyclosporin A initially as the only immunosuppressant in 34 recipients of cadaveric organs:
32 kidneys, 2 pancreases, and 2 livers.
The Lancet 2: 1327 (1979)

Calne, R.Y., Moffat, S.D., Friend, P.J., Jamieson, N.V., Bradley, J.A., Hale, G., Firth, J.,
Bradley, J., Smith, K.G., Waldmann, H.:
Campath 1H allows low-dose cyclosporine monotherapy in 31 cadaveric renal allograft
recipients.
Transplantation 86, 1631-1616 (1999)

Calne, R.Y.:
Immunological tolerance-the liver effect.
Immunol. Rev. 174,280-282 (2000)

Calne, R.Y., Watson, C.J.E., Brons, I.G., Makisalo, H., Metcalfe, S.M., Sriwatanawosnga, V., Davies, H.S.:

Tolerance of porcine renal allografts induced by donor spleen cells and seven days treatment with cyclosporine.

Transplantation 57, 1433-1435 (1994)

Calne, R.Y.:

Prope tolerance: a step in the search for tolerance in the clinic.

World J. Surg. 24, 793-796 (2000)

Calne, R.Y.:

Prope tolerance-the future of organ transplantation from the laboratory to the clinic.

Transplant. Immunol. 13, 83-86 (2004)

Chai, J.G., Xue, S.A., Coe, D., Addey, C., Bartok, I., Scott, D., Simpson, E., Stauss, H.J., Hori, S., Sakaguchi, S., Dyson, J.:

Regulatory T cells, derived from naïve CD4⁺CD25⁻ T cells by in vivo Foxp3 gene transfer, can induce transplantation tolerance.

Transplantation 79, 1310-1316 (2005)

Chen, Y., Kuchroo, V.K., Inobe, J., Hafler, D.A., Weiner, H.L.:

Regulatory t-cell clones induced by oral tolerance: suppression of autoimmune encephalomyelitis.

Science 265, 1237-1240 (1994)

Chen, X., Murakami, T., Oppenheim, J.J., Howard, O.M.:

Differential response of murine CD4⁺CD25⁺ and CD4⁺CD25⁻ T cells to dexamethasone-induced cell death.

Eur. J. Immunol. 34, 859-869 (2004)

Citterio, F.:

Steroid side effects and their impact on transplantation outcome.

Transplantation 72, 75-80 (2001)

Cobbold, S.P., Castejon, R., Adams, E., Zelenika, D., Graca, L., Humm, S., Waldmann, H.:
Induction of foxP3 regulatory T cells in the periphery of T cell receptor transgenic mice
tolerized to transplants.

J. Immunol. 172, 6003-6010 (2004)

Coenen, J.J.A., Koenen, H.J.P.M., van Rijssen, E., Kasran, A., Boon, L., Hilbrands, L.B.,
Joosten, I.:

Rapamycin, not cyclosporine, permits thymic generation and peripheral preservation of
CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺-T-cells.

Bone Marrow Transplantation 39, 537-545 (2007)

Couper, K.N., Blount, D.G., de Souza, J.B., Suffia, I., Belkaid, Y., Riley, E.M.:

Incomplete depletion and rapid regeneration of Foxp3⁺ regulatory T cells following anti-CD25
treatment in malaria infected mice.

J. Immunol. 178, 4136-4146 (2007)

Curotto de Lafaille, M.A., Lino, A.C., Kutchukhidze, N., Lafaille, J.J.:

CD25⁻ T cells generate CD25⁺Foxp3 regulatory T cells by peripheral expansion.

J. Immunol. 173, 7259-7268 (2004)

D'Cruz, L.M., Klein, L.:

Development and function of agonist-induced CD25⁺Foxp3⁺ regulatory T cells in the
absence of interleukin 2 signaling.

Nat. immunol. 11, 1152-1159 (2005)

Daar, A.S., Fuggle, S.V., Fabre, J.W.:

The detailed distribution of MHC Class II Antigens in normal human organs.

Transplantation 38, 293-298 (1984)

Davis, M., Bjorkmann, P.:

T cell antigen receptor genes and T cell recognition.

Nature 334, 395-402 (1988)

Delves, P.J., Roitt, I.M.:

The immune system. First of two parts.

N. Engl. J. Med. 343, 108-117 (2000)

Demirkiran, A., Hendrikx, T.K., Baan, C.C., van der Laan, L.J.:

Impact of immunosuppressive drugs on CD4+CD25+FOXP3+ regulatory T cells: does in vitro evidence translate to the clinical setting ?

Transplantation 85, 783-789 (2008)

Dreßke, B., Zavazava, N., Jenisch, S., Exner, B., Lenz, P., El Mokthari, N.E., Kremer, B., Faendrich, F.:

WOFIE synergizes with Calcineurin-inhibitor treatment and early steroid withdrawal in kidney transplantation.

Transplantation 75, 1286–1291 (2003)

Dreßke, B., Zhu, X., Herwartz, C., Brötzmann, K., Fändrich, F.:

The time pattern of organ infiltration and distribution of natural killer cells and macrophages in the course of acute rejection after allogeneic heart transplantation in the rat.

Transplant. P. 29, 1715-1716 (1997)

Dreßke, B., Rohlfing, H., Zavazava, N., El Mokhtari, N.E., Thode, M.C., Kremer, B., Fändrich, F.:

Vergleichende Untersuchung der immunsuppressiven Potenz von Rapamycin und Tacrolimus unter Anwendung eines immunsuppressiven Fensters (WOFIE) am Beispiel der vollallogenen Herztransplantation in der Ratte.

Chir. Forum (Deutsche Gesellschaft für Chirurgie), 33, 371-373 (2004)

Ekberg, H., Tedesco-Silva, H., Demirbas, A., Vitko, S., Nashan, B.,

Gurkan, A., Margreiter, R., Hugo, C., Grinyo, J.M., Frei, U., Vanrenterghem, Y., Daloz, P., Halloran, P.F., ELITE-Symphony Study:

Reduced exposure to Calcineurin inhibitors in renal transplantation.

N. Engl. J. Med. 357, 2562-2575 (2007)

Feng, X., Kajigaya, S., Solomou, E.E., Keyvanfar, K., Xu, X., Raghavachari, N., Munson, P.J., Herndon, T.M., Chen, J., Young, N.S.:

Rabbit ATG but not horse ATG promotes expansion of functional CD4⁺CD25⁺highFOXP3⁺ regulatory T cells in vitro.

Blood 111, 3675-3688 (2008)

Fontenot, J.D., Gavin, M.A., Rudensky, A.Y.:

Foxp3 programs the development and function of CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells.

Nat. Immunol. 4, 330 (2003)

Fu, S., Zhang, N., Yopp, C.A., Chen, D., Mao, M., Chen, D., Zhang, H.,

Ding, Y., Bromberg, J.S.:

TFG- β Induces Foxp3⁺ T-regulatory Cells from CD4⁺CD25⁻ Precursors.

J. Transplant. 4, 1614-1627 (2004)

Fulton B., Markham A.:

Focus on Mycophenolate Mofetil.

Drugs 51/2, 278-298 (1996)

Furtado, G.C., Olivares-Villagomez, D., Curotto de Lafaille,

M.A., Kutchukhidze, N., Lafaille, J.J.:

Interleukin 2 signaling is required for CD4⁺ regulatory T cell function.

J. Exp. Med. 196, 851-857 (2002)

Game, D.S., Hernandez-Fuentes, M.P., Lechler, R.I.:

Everolimus and basiliximab permit suppression by human CD4⁺CD25⁺ cells in vitro.

Am. J. Transplant. 5, 454-464 (2005)

Gavin, M.A., Torgerson, T.R., Houston, E., Deroos, P., Ho, W.Y., Stray-Pedersen, A., Ocheltree, E.L., Greenberg, P.D., Ochs, H.D., Rudensky, A.Y.:

Single-cell analysis of normal and FOXP3-mutant human T cells: FOXP3 expression without regulatory T cell development.

Proc. Natl. Acad. Sci. 103, 6659-6664 (2006)

Gilliet, M., Liu, Y.J.:

Generation of human CD8⁺ T regulatory cells by CD40 ligand-activated plasmacytoid dendritic cells.

J. Exp. Med. 195, 695-704 (2002)

Goral, S., Helderman, J.H.:

The evolution and future of immunosuppression in renal transplantation.

Sem. Nephrol. 17, 364-372 (1997)

Graca, L., Cobbold, S.P., Waldmann, H.:

Identification of regulatory T cells in tolerated allografts.

J. Exp. Med. 195, 1641-1646 (2002)

Gregori, S., Casorati, M., Amuchastegui, S., Smiroldo, S., Davalli, A.M., Adorini, L.:

Regulatory T cells induced by 1 alpha, 25-dihydroxyvitamin D3 and mycophenolate mofetil treatment mediate transplantation tolerance.

J. Immunol. 167, 1945-1953 (2001)

Groux, H., O'Garra, Bigler, M., Rouleau, M., Antonenko, S., de Vries, J.E., Roncarolo, M.G.:

A CD4⁺ subset inhibits antigen-antigen-specific-t-cell-responses and prevents colitis.

Nature 389, 737-742 (1997)

Haanstra, K.G., Wubben, J.A., Korevaar, S.S., Kondova, I., Baan, C.C., Jonker, M.:

Expression patterns of regulatory T cell markers in accepted and rejected nonhuman primate kidney allografts.

Am. J. Transplant. 7, 2236-2246 (2007)

Hamawy, M.M.:

Molecular actions of Calcineurin inhibitors.

Drug News Perspect. 16, 277-282 (2003)

Hariharan, S., Johnson, C.P., Bresnahan, B.A., Taranto, S.E.,

McIntosh, M.J., Stablein, D.:

Improved graft survival after renal transplantation in the United States, 1988 to 1996.

Engl. J. Med. 342, 605-612 (2000)

Hayamizu, K., Zeng, D., Strober, S.:

Donor cells that facilitate tolerance to rat heart allografts after posttransplant total lymphoid irradiation and rabbit anti-thymocyte globulin.

Transplant. Proc. 31, 25-26 (1999)

Hori, S., Nomura, T., Sakaguchi, S.:

Control of regulatory T cell development by the transskription factor Foxp3.

Science 299, 1057-1061 (2003)

Itoh, M., Takahashi, T., Sakaguchi, N., Kuniyasu, Y., Shimizu, J., Otsuka, F., Sakaguchi, S.:

Thymus and autoimmunity: production of CD25⁺CD4⁺ naturally anergic and suppressive T cells as a key function of the thymus in maintaining immunologic self-tolerance.

J. Immunol. 162, 5317-5326 (1999)

Janeway, C.A., Medzhitov, R.:

Innate immune recognition.

Anne. Rev. Immunol. 20, 197-216 (2002)

Jindal, R.M., Sidner, R.A., Milgrom, M.L.:

Post transplant diabetes mellitus: the role of immunosuppression.

Drug Safety 16, 242-257 (1997)

Jinushi, M., Takehara, T., Tatsumi, T., Yamaguchi, S., Sakamori, R., Hiramatsu, N., Kanto, T., Ohkawa, K., Hayashi, N.:

Natural killer cell and hepatic cell interaction via NKG2A leads to dendritic cell-mediated induction of CD4⁺CD25⁺ T cells with PD-1-dependent regulatory activities.

Immunology 120, 73-83 (2007)

Jones, L.A., Chin, L.T., Merriam, G.R., Nelson, L.M., Kruisbeck, A.M.:

Failure of clonal deletion in neonatally thymectomized mice: tolerance is preserved through clonal anergy.

J. Exp. Med. 172, 1277-1285 (1990)

Jonuleit, H., Schmitt, E., Schuler, G., Knop, J., Enk, A.H.:

Induction of interleukin 10-producing, nonproliferating CD4 cells with regulatory properties by repetitive stimulation with allogenic immature human dendritic cells.

J. Exp. Med. 192, 1213-1222 (2000)

Josien, R., Douillard, P., Guillot, C., Müschen, M., Anegon, I., Chetritt, J., Menoret, S., Vignes, C., Soulillou, J.P., Cuturi, M.C.:

A critical role for transformin growth factor- β in donor transfusion-induced allograft tolerance.

J. Clin. Invest. 102, 1920-1926 (1998)

Kahan, B.D.:

Sirolimus: a new agent for clinical renal transplantation.

Transplant. Proc. 29, 48-50 (1997)

Kamada, N.:

The immunology of experimental liver transplantation in the rat.

Immunology 55, 369-389 (1985)

Kamada, N., Davies, H.S., Roser, B.:

Reversal of transplantation immunity by liver grafting.

Nature 292, 840-842 (1981)

Kamradt, T., Mitchison, N.A.:

Advances in Immunology: Tolerance and autoimmunity.

N. Engl. J. Med. 344, 655-664 (2001)

Kanamaru, F., Youngnak, P., Hashiguchi, M., Nishioka, T., Takahashi, T., Sakaguchi, S., Ishikawa, I., Azuma, M.:

Costimulation via glucocorticoid-induced TNF receptor in both conventional and CD25+ regulatory CD4+ T cells.

J. Immunol. 172, 7306-7314 (2004)

Karagiannidis, C., Akdis, M., Holopainen, P., Woolley, N.J., Hense, G., Rückert, B., Mantel, P.Y., Menz, G., Akdis, C.A., Blaser, K., Schmidt-Weber, C.B.:

Glucocorticoids upregulate FOXP3 expression and regulatory T cells in asthma.

J. Allergy. Clin. Immunol. 114, 1425-1433 (2004)

Kasiske, B.L., Chakkerla, H.A., Roel, J.:

Explained and unexplained ischemic heart disease risk after renal transplantation.

J. Am. Soc. Nephrol. 11, 1735-1743 (2000)

Kawai, T., Cosimi, A.B., Spitzer, T.R., Tolkoff-Rubin, N., Suthanthiran, M., Saidman, S.L., Shaffer, J., Preffer, F.I., Ding, R., Sharma, V., Fishman, J.A., Dey, B., Ko, D.S.C., Hertl, M., Goes, N.B., Wong, W., Williams, W.W., Colvin, R.B., Sykes, M., Sachs, D.H.:

HLA mismatched renal transplantation without maintenance immunosuppression.

N. Engl. J. Med. 358, 353-361 (2008)

Kitajima, T., Ariizumi, K., Bergstresser, P.R., Takashima, A.:

A novel mechanism of glucocorticoid-induced immune suppression: the inhibition of T cell-mediated terminal maturation of a murine dendritic cell line.

J. Clin. Invest. 98, 142-147 (1996)

Knoop, M., Neumann U., Neuhaus P.:

Immunologic tolerance after experimental liver transplantation.

Langenbecks Arch Chir 380, 281-287 (1995)

Kohm, A.P., McMahon, J.S., Podojil, J.R., Begolka, W.S., DeGutes, M., Kasprovicz, D.J., Ziegler, S.F., Miller, S.D.:

Cutting edge: Anti-CD25 monoclonal antibody injection results in the functional inactivation, not depletion, of CD4+CD25+ T regulatory cells.

J. Immunol. 176, 3301-3305 (2006)

Koshihara, T., Li, Y., Takemura, M., Wu, Y., Sakaguchi, S., Minato, N., Wood, K.J., Haga, H., Ueda, M., Uemoto, S.:

Clinical, immunological and pathological aspects of operational tolerance after pediatric living-donor liver transplantation.

Transpl. Immunol. 17, 94-107 (2007)

Kreijveld, E., Koenen, H.J., Klasen, I.S., Hilbrands, L.B., Joosten, I.:

Following anti-CD25 treatment, a functional CD4+CD25+ regulatory T-cell pool is present in renal transplant recipients.

Am. J. Transplant. 7, 249-255 (2007)

Kuniyasu, Y., Takahashi, T., Itoh, M., Shimizu, J., Toda, G., Sakaguchi, S.:

Naturally anergic and suppressive CD25⁺CD4⁺ T cells as a functionally and phenotypically distinct immunoregulatory T cell subpopulation.

Int. Immunol. 12, 1145-1155 (2000)

Lechler, R.I., Garden, O.A., Turka, L.A.:

The complementary roles of deletion and regulation in transplantation tolerance.

Nat. Rev. Immunol. 3, 147-158 (2003)

Lee, I., Wang, L., Wells, A.D., Dorf, M.E., Ozkaynak, E., Hancock, W.W.:

Recruitment of Foxp3⁺ T regulatory cells mediating allograft tolerance depends on the CCR4 chemokine receptor.

J. Exp. Med. 201, 1037-1044 (2005)

Li, Y., Zhao, X., Cheng, D., Haga, H., Tsuruyama, T., Wood, K., Sakaguchi, S., Tanaka, K., Uemoto, S., Koshiba, T.:

The presence of Foxp3 expressing T cells within grafts of tolerant human liver transplant recipients.

Transplantation 86, 1837-1843 (2008)

Li, Y., Chou, S.T., Wang, C., Kuhr, C.S., Perkins, J.D.:

Role of the liver in peripheral tolerance: induction through oral antigen feeding.

Am. J. Transplant. 4, 1574-1582 (2004)

Lopez, M., Clarkson, M.R., Albin, M., Sayegh, M.H., Najafian, N.:

A novel mechanism of action for anti-thymocyte globulin: induction of CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ regulatory T cells.

J. Am. Soc. Nephrol. 17, 2844-2853 (2006)

Louis, S., Braudeau, C., Giral, M., Dupont, A., Moizant, F., Robillard,

N., Moreau, A., Souillou, J.P., Brouard, S.:

Contrasting CD25^{hi}CD4⁺ T cells/FOXP3 patterns in chronic rejection and operational drug-free tolerance.

Transplantation 81, 398-407 (2006)

Lu, C.Y., Sicher, S.C., Vazquez, M.A.:

Prevention and treatment of renal allograft rejection: new therapeutic approaches and new insights into established therapies.

J. Am. Soc. Nephrol. 4, 1239-1256 (1993)

Malek, T.R., Bayer, A.L.:

Tolerance, not immunity, crucially depends on IL-2.

Nat. Rev. Immunol. 4, 665-674 (2004)

Matsuda, S., Koyasu, S.:

Mechanisms of action of cyclosporine.

Immunopharmacology 47/2, 119-125 (2000)

Mc Cune, T.R., Thacker, L.R. II, Peters, T.G., Mulloy, L., Rohr M.S., Adams, P.A., Yium, J., Light, J.E., Pruett, T., Gaber, A.O., Selman, S.H., Jonsson, J., Hayes, J.M., Wright, F.H. Jr., Armata, T., Blanton J., Burdick, J.F.:

Effects of tacrolimus on hyperlipidemia after successful renal transplantation: a Southeastern Organ Procurement Foundation multicenter clinical study.

Transplantation 65, 87-92 (1998)

Meloni, F., Vitulo, P., Bianco, A., M., Paschetto, E., Morosini, M., Cascina, A., Mazzucchelli, I., Ciardelli, L., Oggionni, T., Fietta, A., M., Pozzi, E., Vigano, M.:

Regulatory CD4⁺CD25⁺ T cells in the peripheral blood of lung transplant recipients: correlation with transplant outcome.

Transplantation 77/5, 762-766 (2004)

Mossmann, T.R., Cherwinski, H., Bond, M.W., Giedlin, M.A., Coffmann, R.L.:

Two types of murine helper T cell clones. I.

Definition according to profiles of lymphokine activities and secreted proteins.

J. Immunol. 136, 2348-2357(1986)

Murray, J.E., Merrill, J.P., Harrison, J.H.:

Kidney transplantation between seven pairs of identical twins.

Ann. Surg. 148, 343 (1958)

Murray, J.E., Merrill, J.P., Harrison, J.H.:

Renal homotransplantation in identical twins.

Surg. Forum 6, 432 (1955)

Nikolic, B., Sykes, M.:

Mixed hematopoietic chimerism and transplantation tolerance.

Immunol. Res. 16, 217-228 (1997)

Niimi, M., Shirasugi, N., Ikeda, Y., Wood, K.J.:

Oral antigen induces allograft survival by linked suppression via the indirect pathway.

Transplant. Proc. 33, 81 (2001)

Nishimura, E., Sakihama, T., Setoguchi, R., Tanaka, K., Sakaguchi, S.:

Induction of antigen specific immunologic tolerance by in vivo and in vitro antigen specific expansion of naturally arising Foxp3⁺CD25⁺CD4⁺ regulatory T cells.

Int. Immunol. 8,1189-1201 (2004)

Pattison, J.M. and A.M. Krensky:

New insights into mechanisms of allograft rejection.

Am. J. Med. Sci. 313(5), 257-263 (1997)

Pallardo, L., Oppenheimer, F., Guirado, L., Conesa, L., Hortal, L., Romero, R., Rivero, M.:

Calcineurin inhibitor reduction based on maintenance immunosuppression with mycophenolat mofetil in renal transplant patients.

Transplant. Proc. 39, 2187-2189 (2007)

Patlolla, V., Zhong, X., Reed, G.W., Mandelbrot, D.A.:

Efficacy of anti-IL-2 receptor antibodies compared to no induction and to antilymphocyte antibodies in renal transplantation.

Am. J. Transplant. 7, 1832-1841 (2007)

Piccirillo, C.A., Shevach, E.M.:

Naturally-occurring CD4⁺CD25⁺ immunoregulatory T cells: central players in the arena of peripheral tolerance.

Semin. Immunol. 16, 81-88 (2004)

Piccirillo, C.A., Letterio, J.J., Thornton, A.M., McHugh, R.S., Mamura, M., Mizuhara, H., Shevach, E.M.:

CD4⁺CD25⁺ regulatory t cells can mediate suppressor function in the absence of transforming growth factor beta1 production and responsiveness.

J. Exp. Med. 196, 237-246 (2002)

Pirsch, J.D., Miller, J., Deierhoi, M.H., Vincenti, F., Filo, R.S.:

A comparison of tacrolimus (FK506) and cyclosporine for immunosuppression after cadaveric renal transplantation.

Transplantation 63, 977-983 (1997)

Pons, J.A., Revilla-Nuin, B., Baroja-Mazo, A., Ramirez, P., Martinez-Alacón, L., Sánchez-Bueno, F., Robles, R., Rios, A., Aparicio, P., Parrilla, P.:

FoxP3 in peripheral blood is associated with operational tolerance in liver transplant patients during immunosuppression withdrawal.

Transplantation 86, 1370-1378 (2008)

Powrie, F., Read, S., Mottet, C., Uhlig, H., Maloy, K.:

Control of immune pathology by regulatory T cells.

Novartis Found. Symp. 252, 92-98 (2003)

Quin, S., Cobbold, S.P., Pope, H., Elliott, J., Kioussis, D., Davies, J., Waldmann, H.:

"Infectious" transplantation tolerance.

Science 259, 974-977 (1993)

Ralainirina, N., Poli, A., Michel, T., Poos, L., Andres, E., Hentges, F., Zimmer, J.:

Control of NK cell functions by CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells.

J. Leukoc. Biol. 81, 144-153 (2007)

Rao, A.:

NF-ATp: a transcription factor required for the coordinate induction of several cytokine genes.

Immunol. Today 15, 274-281 (1994)

Röttschke, O., Falk, K.:

Naturally-occurring peptide antigens derived from the MHC class-I-restricted processing pathway.

Immunol. Today 12, 447-455 (1991)

Salama, A.D., Najafian, N., Clarkson, M.R., Harmon, W.E., Sayegh, M.H.:

Regulatory CD25⁺ T cells in human kidney transplant recipients.

J. Am. Soc. Nephrol. 14, 1643-1651 (2003)

Sakaguchi, S., Sakaguchi, N., Asano, M., Itoh, N., Toda, M.:

Immunologic self tolerance maintained by activated T cells expressing IL-2 receptor alpha chains (CD25). Breakdown of a single mechanism of a self tolerance causes various autoimmune diseases.

J. Immunol. 155, 1151-1164 (1995)

Sanchez-Fueyo, A., Domenig, C.M., Mariat, C., Alexopoulos, S., Zheng, X.X., Strom, T.B.:

Influence of direct and indirect allorecognition pathways on CD4+CD25+ regulatory T cell function in transplantation.

Transplant. Int. 20, 534-541 (2007)

Sawitzki, B., Lehmann, M., Ritter, T., Graser, E., Kupiec-Weglinski, J.W., Volk, H.D.:

Regulatory tolerance mediating T cells in transplantation tolerance.

Transplant. Proc. 33, 2092-2093 (2001)

Scandling, J.D., Busque, S., Dejbakhsh-Jones, S., Benike, C., Millan, M.T., Shizuru, J.A., Hoppe, R.T., Lowsky, R., Engleman, E.G., Strober, S.:

Tolerance and chimerism after renal and hematopoietic-cell transplantation.

N. Engl. J. Med. 358, 362-368 (2008)

Scully, R., Quin, S., Cobbold, S., Waldmann, H.:

Mechanisms in CD4 antibody mediated transplantation tolerance: kinetics of induction, antigen dependency and role of regulatory T cells.

Eur. J. Immunol. 24, 2383-2392 (1994)

Seino, K.I., Fukao, K., Muramoto, K., Yanagisawa, K., Takada, Y., Kakuta, S., Iwakura, Y., Van Kaer, L., Takeda, K., Nakayama, T., Taniguchi, M., Bashuda, H., Yagita, H., Okumura, K.:

Requirement for natural killer T (NKT) cells in the induction of allograft tolerance.

Proc. Natl. Acad. Sci. 98, 2577-2581 (2001)

Segundo, D.S., Ruiz, J.C., Izquierdo, M., Fernandez-Fresnedo, G., Gómez-Alamillo, C., Merino, R., Benito, M.J., Cacho, E., Rodrigo, E., Palomar, R., López-Hoyos, M., Arias, M.: Calcineurin inhibitors, but not Rapamycin, reduce percentages of CD4⁺CD25⁺FOXP3⁺ regulatory T cells in renal transplant recipients.

Transplantation 82, 550-557 (2006)

Setoguchi, R., Hori, S., Takahashi, T., Sakaguchi, S.:

Homeostatic maintenance of natural Foxp3⁺ CD4⁺ CD25⁺ regulatory T cells by interleukin(IL)-2 and induction of autoimmune disease by IL-2 neutralization.

J. Exp. Med. 201, 723-735 (2005)

Shapiro, R.:

Tacrolimus in renal transplantation.

Graft 3, 64-80 (2000)

Shimizu, J., Yamakazi, S., Takahashi, T., Ishida, Y., Sakaguchi, S.:

Stimulation of CD25(+)CD4(+) regulatory T cells through GITR breaks immunological self-tolerance.

Nat. Immunol. 3, 135-142 (2002)

Silkensen, J.R.:

Long-term complications in renal transplantation.

J. Am. Soc. Nephrol. 11, 582-588 (2000)

Solez, K., Vincenti, F., Filo, R.S.:

Histopathologic findings from 2-year protocol biopsies from a U.S. multicenter kidney transplant trial comparing tacrolimus vs. cyclosporine: a report of the FK506 Kidney Transplant Study Group.

Transplantation 66, 1736-1740 (1998)

Starzl, T.E., Zinkernagel, R.M.:

Antigen localization and migration in immunity and tolerance.

N. Engl. J. Med. 339, 1905-1913 (1998)

Stassen, M., Schmitt, E., Jonuleit, H.:

Human CD4⁺CD25⁺ regulatory t cells and infectious tolerance.

Transplantation 77, 23-25 (2004)

Sollinger, H.:

Mycophenolate mofetil for the prevention of acute rejection in primary cadaveric renal allograft recipients.

Transplantation 60, 225-232 (1995)

Suri-Payer, E., Cantor, H.:

Differential Cytokine requirements for regulation of autoimmune gastritis and colitis by CD4⁺CD25⁺ T cells.

J. Autoimmun. 16, 115-123 (2001)

Suthanthiran, M., Morris, R.E., Strom, T.B.:

Immunosuppressants: cellular and molecular mechanisms of action.

Am J Kidney Dis 28:159-172 (1996)

Tsang, J.Y., Tanriver, Y., Jiang, S., Xue, S.A., Ratnasothy, K., Chen, D., Stauss, H.J., Bucy, R.P., Lombardi, G., Lechler, R.:

Conferring indirect allospecificity on CD4⁺CD25⁺ Tregs by TCR gene transfer favors transplantation tolerance in mice.

J. Clin. Invest. 118, 3619-3628 (2008)

Tullius, S.G., Hancock, W.W., Heemann, U., Azuma, H., Tilney, N.L.:

Reversibility of chronic renal allograft rejection. Critical effect of time after transplantation suggests both host immune dependent and independent phases of progressive injury.

Transplantation 58, 93-99 (1994)

Vukmanovic-Stejic. M., Zhang, Y., Cook, J.E., Fletcher, J.M., McQuaid, A., Masters, J.E., Rustin, M.H., Taams, L.S., Beverley, P.C., Macallan, D.C., Akbar, A.N.:

Human CD4⁺CD25^{hi} Foxp3⁺ regulatory T cells are derived by rapid turnover of memory populations in vivo.

J. Clin. Invest. 116, 2423-2433 (2006)

Waaga, A.M., Gasser, M., Laskowski, I., Tilney, N.L.: Mechanisms of chronic rejection.

Curr. Opin. Immunol. 12, 517-521 (2000)

Wakkach, A., Fournier, N., Brun, V., Breittmayer, J.P., Cottrez, F., Groux, H.: Characterization of dendritic cells that induce tolerance and T regulatory 1 cell differentiation in vivo.

Immunity 18, 605-617 (2003)

Waldmann, H., Cobbold, S.:

Regulating the immune response to transplants: a role for CD4⁺ regulatory cells?

Immunity 14, 399-406 (2001)

Wallemacq, P.E., Reding, R.:

FK-506 (Tacrolimus), a novel immunosuppressant in organ transplantation: clinical, biomedical and analytical aspects.

Clin. Chem. 39/11, 2219-2228 (1993)

Walsh, P.T., Taylor, D.K., Turka, L.A.:

Tregs and transplantation tolerance.

J. Clin. Invest. 114, 1398-1403 (2004)

Wang, S., Jiang, J., Guan, Q., Lan, Z., Wang, H., Nguan, C.Y., Jevnikar, A.M., Du, C.:

Reduction of Foxp3-expressing regulatory T cell infiltrates during the progression of renal allograft rejection in a mouse model.

Transplant. Immunol. 19, 93-102 (2008)

Wang, Z., Shi, B.Y., Qian, Y.Y., Cai, M., Wang, Q.:

Short-term anti-CD25 monoclonal antibody administration down-regulated CD25 expression without eliminating the neogenetic functional regulatory T cells in kidney transplantation.

Clin. Exp. Immunol. 155, 496-503 (2009)

Wang, Z., Shi, B., Jin, H., Xiao, L., Chen, Y., Qian, Y.:

Low-dose of tacrolimus favors the induction of functional CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ regulatory T cells in solid-organ transplantation.

Internat. Immunopharmacol. 9/5, 564-569 (2009)

Wenger, R.M.:

Cyclosporin A.

Biomed. J. 3, 19-31 (1982)

Weiss, S., Bogen, B.:

MHC class II-restricted presentation of intracellular antigen.

Cell 64, 767-776 (1991)

Wood, K.J., Sakaguchi, S.:

Regulatory T cells in transplantation tolerance.

Nat. Rev. Immunol. 3, 199-210 (2003)

Yagi, H., Nomura, T., Nakamura, K., Yamazaki, S., Kitawaki, T., Hori, S., Maeda, M., Onodera, M., Uchiyama, T., Fujii, S., Sakaguchi, S.:

Crucial role of Foxp3 in the development and function of human CD25⁺CD4⁺ regulatory T cells.

Internat. Immunol. 16, 1643-1656 (2004)

Yamada, A., Chandraker, A., Laufer, T.M., Gerth, A.J., Sayegh, M.H., Auchincloss, H.:

Recipient MHC class II expression is required to achieve long-term survival of murine cardiac allografts after costimulatory blockade.

J. Immunol. 167, 5522-5526 (2001)

Yin, D., Fathmann, C.G.:

CD4 positive suppressor cells block allotransplant rejection.

J. Immunol. 154, 6339-6345 (1995)

Yu, Y., Y., Bennett, M.:

Murine natural Killer cells and marrow graft rejection.

Annu. Rev. Immunol. 10, 189-213 (1992)

Yu, G., Xu, X., Vu, M.D., Kilpatrick, E.D., Li, X.C.:

NK cells promote transplant tolerance by killing donor antigen-presenting cells.

J. Exp. Med. 203, 1851-1858 (2006)

Zeiser, R., Nguyen, V.H., Beilhack, A., Buess, M., Schulz, S., Baker, J., Contag, C.H., Negrin, R.S.:

Inhibition of CD4⁺CD25⁺ regulatory T cell function by Calcineurin-dependent interleukin-2 production.

Blood 108, 390-399 (2006)

Zhang, H., Chua, K.S., Guimond, M., Kapoor, V., Brown, M.V., Fleisher, T.A., Long, L.M., Bernstein, D., Hill, B.J., Douek, D.C., Berzofsky, J.A., Carter, C.S., Read, E.J., Helman, L.J., Mackall, C.L.:

Lymphopenia and interleukin-2-therapy alter homeostasis of CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells.

Nat. Med. 11, 1238-1243 (2005)

8. ANHANG

Tabelle 8.1 Durchflußzytometrisch ermittelter prozentualer Anteil lymphozytärer Subpopulationen im peripheren Blut zu verschiedenen Zeitpunkten nach Nierentransplantation in Abhängigkeit vom immunsuppressiven Protokoll (WOFIE versus kontinuierliche Immunsuppression)

Studienarm/ Zeitpkt. p. Tx	CD19 ⁺	CD3 ⁺ CD16 ⁺ 56 ⁺	CD3 ⁺	CD8 ⁺	CD4 ⁺	CD4 ⁺ CD25 ⁺
	M ± SD	M ± SD	M ± SD	M ± SD	M ± SD	M ± SD
Tag 0						
Kontrolle	3,9 ± 1,7	8,7 ± 5,1	70,2 ± 9,1	16,9 ± 7,6	44,6 ± 6,7	1,8 ± 0,6
WOFIE	4,4 ± 1,8	8,3 ± 2,8	65,7 ± 9,1	16,2 ± 4,4	41,2 ± 7,2	1,8 ± 1,2
Tag 7						
Kontrolle	4,9 ± 2,7	8,3 ± 3,5	69,3 ± 15,3	19,0 ± 6,1	42,0 ± 12,5	1,7 ± 1,2
WOFIE	5,0 ± 2,7	7,1 ± 2,9	68,4 ± 18,1	15,9 ± 6,3	43,0 ± 14,9	1,6 ± 1,2
1 Monat						
Kontrolle	3,2 ± 2,2	8,7 ± 3,9	71,9 ± 15,2	17,1 ± 9,0	46,2 ± 13,5	3,1 ± 1,9
WOFIE	5,6 ± 3,1	6,9 ± 4,1	61,9 ± 16,8	14,6 ± 6,6	40,4 ± 11,2	5,7 ± 1,4
2 Monate						
Kontrolle	3,3 ± 1,5	9,4 ± 3,7	70,9 ± 12,2	17,7 ± 7,8	43,8 ± 10,8	3,9 ± 2,3
WOFIE	4,1 ± 2,1	7,4 ± 4,6	69,6 ± 15,9	17,9 ± 5,2	44,3 ± 14,1	4,8 ± 2,6
3 Monate						
Kontrolle	4,8 ± 3,8	7,5 ± 2,5	72,1 ± 12,1	17,3 ± 5,2	47,3 ± 12,6	4,1 ± 1,7
WOFIE	3,3 ± 1,6	6,6 ± 2,2	66,8 ± 15,1	17,7 ± 4,9	42,4 ± 15,1	8,3 ± 2,7
6 Monate						
Kontrolle	3,2 ± 1,7	7,8 ± 1,4	72,8 ± 5,3	19,7 ± 5,7	45,2 ± 4,9	8,1 ± 4,6
WOFIE	4,3 ± 2,6	7,4 ± 3,3	71,9 ± 12,5	18,0 ± 3,2	46,6 ± 12,3	14,3 ± 6,4
1 Jahr						
Kontrolle	3,6 ± 1,7	7,6 ± 2,5	79,4 ± 8,3	23,7 ± 8,3	48,1 ± 7,8	9,0 ± 5,6
WOFIE	3,6 ± 2,5	8,1 ± 3,3	75,3 ± 13,3	18,3 ± 6,0	48,9 ± 13,1	15,4 ± 4,9
2 Jahre						
Kontrolle	5,2 ± 2,8	8,9 ± 3,7	77,2 ± 8,8	21,3 ± 5,3	46,8 ± 10,6	9,3 ± 4,5
WOFIE	4,5 ± 2,2	6,6 ± 2,2	69,4 ± 11,7	18,7 ± 4,7	44,1 ± 11,0	14,5 ± 3,3

Tabelle 8.1 zeigt die Ergebnisse nach durchflußzytometrischer Bestimmung diverser Lymphozytenantigene aus dem peripheren Blut nierentransplantierte Patienten in Abhängigkeit vom immunsuppressiven Protokoll (WOFIE versus kontinuierliche Immunsuppression) zu verschiedenen Zeitpunkten nach Transplantation. Dargestellt sind Mittelwerte (%) ± Standardabweichung.

Tabelle 8.2 Quantifizierung der Foxp3- und β -Actin-Expression CD4⁺CD25⁺ T-Zellen in Abhängigkeit vom immunsuppressiven Protokoll 2 Jahre nach Nierentransplantation der WOFIE-Gruppe

Patienten-ID	Messwerte (Dreifachansatz)			Mittelwert	SD
Pat. 11					
Foxp3	3,74E-07	3,11E-07	3,32E-07	3,39E-07	3,22E-08
β-Actin	1,16E-03	1,40E-03	4,25E-03	2,27E-03	1,72E-03
Pat. 14					
Foxp3	1,51E-06	1,07E-07	5,52E-07	7,23E-07	7,18E-07
β-Actin	1,13E-03	9,14E-04	1,21E-03	1,08E-03	1,51E-04
Pat. 18					
Foxp3	2,99E-07	8,21E-09	4,00E-08	1,16E-07	1,60E-07
β-Actin	1,17E-03	3,51E-04	7,46E-04	7,56E-04	4,09E-04
Pat. 20					
Foxp3	4,52E-08	3,83E-08	2,23E-08	3,53E-08	1,17E-08
β-Actin	1,10E-03	9,12E-04	9,54E-04	9,90E-04	1,01E-04
Pat. 21					
Foxp3	2,67E-08	2,88E-08	3,31E-08	2,96E-08	3,28E-09
β-Actin	4,30E-04	4,27E-04	2,13E-04	3,57E-04	1,24E-04
Pat. 22					
Foxp3	1,40E-07	2,28E-07	2,92E-07	2,20E-07	7,65E-08
β-Actin	1,15E-08	6,46E-04	2,93E-05	2,25E-04	3,65E-04
Pat. 24					
Foxp3	2,91E-08	2,38E-08	9,31E-09	2,07E-08	1,02E-08
β-Actin	1,30E-07	1,36E-07	3,93E-07	2,20E-07	1,50E-07
Pat. 32					
Foxp3	1,02E-03	1,13E-03	1,11E-03	1,09E-03	5,71E-05
β-Actin	1,73E-03	1,36E-03	1,51E-03	1,53E-03	1,85E-04
Pat. 34					
Foxp3	1,58E-08	5,18E-09	1,46E-08	5,58E-08	7,87E-09
β-Actin	9,78E-05	1,24E-04	6,61E-05	9,60E-04	2,90E-05
Pat. 35					
Foxp3	1,06E-05	1,12E-05	1,45E-05	1,21E-05	2,09E-06
β-Actin	1,03E-03	2,08E-03	1,62E-03	1,58E-03	5,26E-04
Pat. 36					
Foxp3	1,39E-07	1,64E-07	3,42E-07	2,15E-07	1,11E-07
β-Actin	4,80E-05	4,40E-05	7,44E-05	5,55E-05	1,65E-05
Pat. 38					
Foxp3	2,45E-05	4,95E-05	1,07E-05	2,83E-05	1,97E-05
β-Actin	1,63E-03	1,28E-03	1,16E-03	1,36E-03	2,40E-04

Tabelle 8.2 zeigt die mittels real-time-PCR ermittelte Expression von Foxp3 und β -Actin CD4⁺CD25⁺ T-Zellen bei den in der WOFIE-Gruppe eingeschlossenen Patienten 2 Jahre nach Nierentransplantation. Dargestellt sind die jeweiligen Einzelwerte als Dreifachansatz sowie die daraus berechneten Mittelwerte \pm Standardabweichung.

Tabelle 8.3 Quantifizierung der Foxp3- und β -Actin-Expression CD4⁺CD25⁺ T-Zellen in Abhängigkeit vom immunsuppressiven Protokoll 2 Jahre nach Nierentransplantation der Kontroll-Gruppe

Patienten-ID	Messwerte (Dreifachansatz)			Mittelwert	SD
Pat. 13					
Foxp3	3,24E-06	3,41E-06	3,52E-06	3,39E-06	2,33E-07
β-Actin	2,16E-03	3,40E-03	2,25E-03	2,37E-03	1,62E-03
Pat. 19					
Foxp3	3,51E-07	1,27E-07	1,22E-07	6,25E-07	4,03E-07
β-Actin	2,31E-04	2,45E-05	2,23E-04	2,36E-04	1,32E-04
Pat. 23					
Foxp3	4,09E-06	8,11E-07	5,00E-09	3,26E-07	1,71E-07
β-Actin	3,11E-03	3,52E-04	4,41E-04	4,52E-04	2,16E-04
Pat. 25					
Foxp3	2,31E-08	4,81E-08	2,21E-08	3,71E-08	1,81E-08
β-Actin	3,12E-03	9,22E-04	9,53E-04	7,21E-04	2,51E-04
Pat. 26					
Foxp3	4,07E-07	3,38E-07	2,11E-07	3,66E-07	2,8E-08
β-Actin	2,31E-04	2,21E-04	5,66E-04	3,57E-04	1,54E-04
Pat. 27					
Foxp3	2,41E-06	3,78E-06	2,52E-06	3,22E-06	3,05E-07
β-Actin	2,34E-08	2,26E-04	3,33E-05	3,33E-04	1,52E-04
Pat. 28					
Foxp3	3,74E-0	3,11E-07	3,32E-07	3,39E-07	3,22E-08
β-Actin	1,16E-03	1,40E-03	4,25E-03	2,27E-03	1,72E-03
Pat. 31					
Foxp3	1,51E-06	1,07E-07	5,52E-07	7,23E-07	7,18E-07
β-Actin	1,13E-03	9,14E-04	1,21E-03	1,08E-03	1,51E-04
Pat. 33					
Foxp3	2,99E-07	8,21E-09	4,00E-08	1,16E-07	1,60E-07
β-Actin	1,17E-03	3,51E-04	7,46E-04	7,56E-04	4,09E-04
Pat. 37					
Foxp3	4,52E-08	3,83E-08	2,23E-08	3,53E-08	1,17E-08
β-Actin	1,10E-03	9,12E-04	9,54E-04	9,90E-04	1,01E-04
Pat. 38					
Foxp3	2,67E-08	2,88E-08	3,31E-08	2,96E-08	3,28E-09
β-Actin	4,30E-04	4,27E-04	2,13E-04	3,57E-04	1,24E-04
Pat. 40					
Foxp3	1,40E-07	2,28E-07	2,92E-07	2,20E-07	7,65E-08
β-Actin	1,15E-08	6,46E-04	2,93E-05	2,25E-04	3,65E-04

Tabelle 8.3 zeigt die mittels real-time-PCR ermittelte Expression von Foxp3 und β -Actin CD4⁺CD25⁺ T-Zellen bei den in der Kontroll-Gruppe eingeschlossenen Patienten 2 Jahre nach Nierentransplantation. Dargestellt sind die jeweiligen Einzelwerte als Dreifachansatz sowie die daraus berechneten Mittelwerte \pm Standardabweichung.

9. DANKSAGUNG

An erster Stelle möchte ich Frau Priv. Doz. Dr. med. Bettina Dreßke, Oberärztin in der Klinik für Allgemeine Chirurgie und Thoraxchirurgie des UK-SH, Campus Kiel, für die Bereitstellung des Dissertationsthemas und ihre große Unterstützung bei der experimentellen Durchführung und der schriftlichen Ausarbeitung der Arbeit danken. Ihr persönliches Engagement, welches weit über das Übliche hinausging, sorgte dafür, dass die vorliegende Arbeit trotz aller Widrigkeiten abgeschlossen werden konnte.

Für die Bereitstellung des Arbeitsplatzes und der benötigten Geräte danke ich Herrn Prof. Dr. med. Bernd Kremer, ehemaliger Direktor der Klinik für Allgemeine Chirurgie und Thoraxchirurgie des UK-SH, Campus Kiel (jetziger klinischer Leiter des Krebszentrum-Nord), Herrn Prof. Dr. med. Fred Fändrich, ehemaliger ständiger stellvertretender Direktor der Klinik für Allgemeine Chirurgie und Thoraxchirurgie des UK-SH (jetziger Direktor der Klinik für angewandte Zelltherapie des UK-SH, Campus Kiel) und Herrn Prof. Dr. Dr. Dieter Bröring, kommissarischer Direktor der Klinik für Allgemeine Chirurgie und Thoraxchirurgie des UK-SH, Campus Kiel danken.

Danken möchte ich weiterhin Frau Kerstin Marx, medizinisch-technische Assistentin der Klinik für Allgemeine Chirurgie und Thoraxchirurgie des UK-SH, Campus Kiel, sowie Frau Kyoung Ott, medizinisch-technischen Assistentin am Institut für Immunologie für ihre Einweisung in die Durchflußzytometrie. Herrn Prof. Dr. Dietrich Kabelitz, Direktor des Institutes für Immunologie des UK-SH, danke ich für Möglichkeit der Nutzung des FacsScans. Ein besonderer Dank geht an Herrn Prof. Dr. rer. nat. Hendrik Ungefroren, für die unschätzbare Unterstützung bei der Etablierung der Real-Time-PCR.

Vor allem aber möchte ich meinen Eltern danken: Für die gesamte Unterstützung, welche mich überhaupt erst soweit gebracht hat.

10. LEBENSLAUF

Am 28.01.1977 wurde ich, Frank Händschke, in Frankfurt (Oder) als zweites Kind der Eheleute Dr. med. Hartmut und Heidrun Händschke geboren. Ich wurde 1983 eingeschult und besuchte bis zur 9. Klasse die Polytechnische Oberschule Juri-Gagarin in Frankfurt (Oder). Von 1992 bis 1996 erwarb ich die Allgemeine Hochschulreife am Otto-Brenner-Gymnasium in meiner Heimatstadt. Nach Absolvieren des Zivildienstes beim Deutschen Roten Kreuz (Kreisverband Frankfurt (Oder)) konnte ich im Wintersemester 1997/98 mein Studium der Humanmedizin an der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel aufnehmen. Im Oktober 2004 beendete ich das Studium mit der Gesamtnote 1,66 und erreichte damit meine Approbation als Arzt. Im Anschluß begann im Juni 2005 meine Facharztausbildung zum Unfallchirurgen und Orthopäden am Klinikum Frankfurt Oder. Die Basisweiterbildung Chirurgie konnte ich im Juni 2006 abschließen. Zur weiteren Ausbildung wechselte ich im Oktober 2007 an das Elbe Klinikum Stade, wo ich zurzeit weiterhin als Assistenzarzt für Unfallchirurgie und Orthopädie tätig bin. Die der vorliegenden Dissertation zugrunde liegenden Untersuchungen wurden von 2000 bis 2005 im mikrochirurgischen Labor der Klinik für Allgemeine Chirurgie und Thoraxchirurgie sowie im Institut für Immunologie der Universitätsklinikums Schleswig-Holstein, Campus Kiel durchgeführt. Die Auswertung und Niederschrift der Ergebnisse waren im August 2009 abgeschlossen.