

Aus der
Klinik für angewandte Zelltherapie
der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel
Direktor: Prof. Dr. med. Fred Fändrich

TAIC – II

**Untersuchungen zur Minimierung der immunsuppressiven Therapie bei
Lebendnierentransplantation mittels einer zellbasierten Methode**

–

**Spenderspezifische Toleranzinduktion nach Anwendung allogener und
autologer Regulatorzellen**

INAUGURAL – DISSERTATION

zur

Erlangung des medizinischen Doktorgrades
der Medizinischen Fakultät
der Christian-Albrechts Universität
zu Kiel

vorgelegt 2014
von Thilo Maria Schulte
geboren in Essen

1. Berichterstatter: Prof. Dr. med. F. Fändrich
2. Berichterstatter: Prof. Dr. med. D. Kabelitz
Tag der mündlichen Prüfung: Kiel, den 09.07.2015
Zum Ausdruck genehmigt: Kiel, den 21.05.2015

gez.: Prof. Dr. rer. nat. S. Schütze

Es ist nicht genug zu wissen,
man muss auch anwenden;
es ist nicht genug zu wollen,
man muss auch tun

Johann Wolfgang von Goethe

Inhaltsverzeichnis

Abbildungsverzeichnis	VII
Tabellenverzeichnis	IX
Abkürzungsverzeichnis	X
1. Einleitung	1
1.1. Einführung in das Thema	1
1.1.1. Riset - Reprogrammierung des Immunsystems zur Etablierung von Toleranz	3
1.2. Das Immunsystem	4
1.2.1. Pathogenese der chronischen Abstoßungsreaktion	4
1.2.2. Immuntoleranz.....	8
1.3. Immunsuppressiva.....	11
1.3.1. Wirkungsmechanismus von Calcineurininhibitoren	12
1.3.2. Nebenwirkungsprofil von Calcineurininhibitoren.....	13
1.4. Die Transplantat-Akzeptanz induzierende Zelle.....	14
1.4.1. Klassifikation	15
1.4.2. Wirkmechanismus am Immunsystem.....	16
2. Fragestellung.....	18
3. Patienten, Material und Methode.....	20
3.1. Studiendesign	20
3.1.1. Ethikkommission	21
3.2. Patienten.....	21
3.2.1. Einschlusskriterien.....	21
3.2.2. Ausschlusskriterien.....	22
3.3. Untersuchungsziele.....	23
3.4. Studienprotokoll	24
3.4.1. Rekrutierungsphase	24
3.4.2. Screeningphase (6M – Tag -16).....	25
3.4.3. Injektionsphase (Tag -5).....	25
3.4.4. Stationäre Phase	26
3.4.5. Ambulante Phase	26
3.5. Reduktionsschema zum Immunprotokoll	26

3.6. Datenerhebung	27
3.6.1. Nierenbiopsie	27
3.6.2. Durchflusszytometrie	28
3.6.3. Antikörperscreening.....	29
3.6.4. MLC- MCA.....	29
3.6.5. Kryokonservierung.....	30
3.7. Versuchsmedikation.....	30
3.7.1. Gewinnung allogener TAIZ- Zellen	31
3.7.1.1. "Buffy- Coat"- Präparation	31
3.7.1.2. TAIZ- Inkubationsmedien	32
3.7.1.3. TAIZ- Generierung	34
3.7.2. Gewinnung autologer regulatorischer T- Zellen.....	35
3.7.3. Co- Kultivierung.....	35
3.7.4. Zellernte	36
4. Ergebnisse	37
4.1. Rekrutierung und Behandlung der Studienteilnehmer	37
4.2. Ergebnisse der einzelnen Studienteilnehmer	38
4.2.1. Studienpatient CRG KI/T03/P01	38
4.2.1.1. Patienteninformation	38
4.2.1.2. Studienverlauf	38
4.2.2. Studienpatient CFH KI/T03/P02	43
4.2.2.1. Patienteninformationen	43
4.2.2.2. Studienverlauf	43
4.2.3. Studienpatient WG KI/T03/P04	45
4.2.3.1. Patienteninformation	45
4.2.3.2. Studienverlauf	45
4.2.4. Studienpatient AG KI/T03/P05	47
4.2.4.1. Patientenanamnese	47
4.2.4.2. Studienverlauf	48
4.2.5. Studienpatient FI KI/T03/P08	49
4.2.5.1. Patientenanamnese	49
4.2.5.2. Studienverlauf	49
5. Diskussion	54
6. Zusammenfassung.....	60

7. Studienzentren	62
7.1. Versuchszentren	62
7.2. Unterstützende Zentren	62
8. Anhang der verwendeten Materialien	63
9. Literaturverzeichnis	65
10. Danksagungen	77
11. Curriculum vitae	78
12. Publikationen	79

Abbildungsverzeichnis

Abb. 1: Ursachen der terminalen Niereninsuffizienz in Deutschland in % (Quasi, Niere 2004)	1
Abb. 2: Kaplan-Meier Schätzung zum Überleben von Nierentransplantaten unter Cyclosporin-Immuntherapie (Pascual et al. (2003))	2
Abb. 3: Representative phenotypische Durchflusszytometrie der applizierten Studienmediation von Patient CFH	28
Abb. 4: Schematische Darstellung der TAIC Herstellung nach GMP-Bedingungen	31
Abb. 5: Reduktionsschema der Immunsuppression bei Pat. CRG	40
Abb. 6: Übersicht Kreatininspiegel vs Immunsuppression bei Pat. CRG	41
Abb. 7: Nierenbiopsie, PAS gefärbt, von Pat CRG in der 24 Woche ohne Nachweis einer Abstoßungsreaktion, 100fach vergrößert	41
Abb. 8: Nierenbiopsie, Woche 50, von Patient CRG mit dem histologischen Nachweis der Akkumultation von Lymphozyteninfiltraten, 100fach vergrößert	42
Abb. 9: Nierenbiopsie, Woche 50, von Patient CRG mit dem histologischen Nachweis der Akkumultation von Lymphozyteninfiltraten, 200fach vergrößert	42
Abb. 10: Spezifisches Anti-Spender Reaktions Bestimmung bei Patient CRG mittels MLC, Woche 60, anhand des Proliferationsindex (f), der IL- 2 Sekretion (g) und der IFN- γ Produktion. Der Vergleich erfolgte gegen ein Full-Mismatch und ein neutrales Medium als Kontrollgruppen	42
Abb. 11: Reduktionschema der Immunsuppression bei Patientin CFH	44
Abb. 12: Tacrolims-Talspiegel im Vergleich zum Kreatininspiegel bei Patientin CFH	44
Abb. 13: Immunsuppressives Protokoll von Patient WG	46
Abb. 14: Tacrolims-Talspiegel im Vergleich zum Kreatininspiegel bei Patient WG47	
Abb. 15: Reduktionschema der Immunsuppression bei Patient AG	48
Abb. 16: Tacrolims-Talspiegel im Vergleich zum Kreatininspiegel bei Patient AG	49
Abb. 17: Reduktionschema der Immunsuppression bei Patient FI	50
Abb. 18: Tacrolims-Talspiegel im Vergleich zum Kreatininspiegel bei Patient FI ..	51

Abb. 19: Nierenbiopsie, PAS gefärbt, von Patient FI, 24 Woche, ohne Nachweis einer Abstoßungsreaktion, 100fach vergrößert.....	51
Abb. 20: Nierenbiopsie, PAS gefärbt, von Patient FI, 54 Woche, ohne Nachweis einer Abstoßungsreaktion, 100fach vergrößert.....	52
Abb. 21: Zielaufnahme, Nierenbiopsie, PAS gefärbt, von Patient FI, 54 Woche, Balken 300µm.....	52
Abb. 22: Spezifische Anti-Spender-Reaktions-Bestimmung bei Patient FI mittels MLC, Woche 1, 26, 29 und 40, anhand des Proliferationsindex (f), der IL-2 Sekretion (g) und der IFN- γ -Produktion (h). Der Vergleich erfolgte gegen ein Full-Mismatch, Klasse-I Mismatch und ein neutrales Medium als Kontrollgruppen.....	53

Tabellenverzeichnis

Tab. 1: Strategien zum Schutz vor Langzeit - Transplantatversagen (Pascual et al 2013).....	3
Tab. 2: Histologische Einteilung der chronischen Transplantatnephropathie nach der Banff-Klassifikation (Solez et al 2007)	5
Tab. 3: Immunologische und nicht-immunologische Faktoren der chonischen Transplantaten-phropatie (Lie et al 2009)	6
Tab. 4: Charakteristika der Spender/Empfänger und empfängerspezifische Studienmedi-kationsdosis	37
Tab. 5: HLA-Übereinstimmungen, Blutgruppen und Crossmatches der Studienpaare	38

Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
AB0	Blutgruppen A,B,0
AB serum	Serum der Blutgruppe A und B
ADR	Acute Drug Reaction
AAE	Adverse Event
AEs	severe Adverse Event
AMG	Arzneimittelgesetz
APZ	Antigen präsentierende Zelle
ATG	Anti-Thymozyten-Immunglobulin
bzw.	beziehungsweise
CD	Cluster of Differentiation
CDC	Complement Dependent Cytotoxicity
Cl	Chlor
CL _{CR}	Kreatinin Clearance
CNI	Calcineurininhibitoren
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
CsA	Cyclosporin A
CSF	Colony stimulating factor
CTN	chronische Transplantatabstoßung
DI	Deziliter
DMSO	Dimethylsulfoxid
DPBS	Dulbecco PBS
DTT	Dithiothreitol
EBV	Ebstein-Barr Virus
EKG	Elektrokardiogramm
ELISA	Enzyme Linked Immunabsorbent Assay
ESRD	End- Stage Renal Disease / Chronisches Nierenversagen
ET	Eurotransplant
FACS	Fluorescence Activated Cell Sorting
Fl.	Flasche
g	Gramm

G	Zentrifugalbeschleunigung
GMP	Good Manufacturing Practice
h	Hour / Stunde
HBV	Hepatitis B Virus
HD/ HDF	Hämodialyse / Hämodiafiltration
HCV	Hepatitis C Virus
HF	Hämofiltration
HIV	Humanes Immundefizienz Virus
HLA	humanes Leukozyten Antigen
HSA	Humanes Serum Albumin
kg	Kilogramm
KG	Körpergewicht
KI	Kiel
KMT	Knochenmarktransplantation
l	Liter
IFN- γ	Interferon- γ
rh-IFN- γ	rekombinantes IFN- γ
IgG	Immunglobulin G
IgM	Immunglobulin M
IL-2	Interleukin-2
max.	maximal
M-CSF	Makrophagen-Kolonie stimulierender Faktor
rhM-CSF	rekombinantes humanes M- CSF
mg	Milligramm
mind.	mindestens
ml	Milliliter
MLA	Gemischtes Lymphozyten Antigen
MLC	Gemischte Lymphozyten Kultur
mM	Millimeter
MMF	Mycophenolatmophetyl (Cellcept)
Na	Natrium
NF-AT	Nuclear factor of aktivatet T-Cells
ng	Nanogramm
OD	am Tag

OM	am Morgen
ON	am Abend
PBMC	Peripheral Blood Mononuclear Cells
PBS	Phosphate Buffered Saline
PCMO	Progammierbare Zelle monocytären Ursprungs
PD	Peritonealdialyse
pos.	positiv
RISSET	Reprogramming the Immune System for Establishment of Tolerance
RPMI	Roswell Park Memorial Institute
RRT	Renal Replacement Therapy
spez.	spezifisch
s.o.	siehe oben
Tab.	Tabelle
TAIZ / TAIC	Transplantat Akzeptanz - induzierende Zelle
TCR	T- Zellen Rezeptor (T-cell receptor)
TPG	Transplantationsgesetz
Treg.	Regulatorische T-Zelle
U	Units / Einheiten
IU	International Units
UK S-H	Universitätsklinikum Schleswig – Holstein
ZMV	Zytomegalie Virus
µg	Microgramm
µl	Mikroliter
z.B.	zum Beispiel
°C	Grad Celsius
®	eingetragenes Warenzeichen

1. Einleitung

1.1. Einführung in das Thema

Die Nierentransplantation ist heutzutage ein akzeptiertes Verfahren zur Behandlung einer Vielzahl chronischer Nierenerkrankungen (Abb 1). Dabei zählt sie neben den heute angewandten Dialyseverfahren (HD, HF, HDF, PD) nicht nur zu den etablierten und akzeptierten Methoden der Nierenersatzverfahren (RRT) bei terminalem Nierenversagen (ESRD), sondern als die Therapieform der ersten Wahl. Die Organtransplantation ist im Vergleich zu den anderen Methoden nicht nur für den Patienten, sondern auch aus ökonomischer Sicht die Therapie der ersten Wahl. (Quinn et al 2007; Winkelmayr et al 2002; Croxson und Ashton 1990).

Patienten mit chronischem Nierenversagen stellen gegenwärtig weltweit die Gruppe mit dem größten Prävalenzanstieg der lebensbedrohlichen Erkrankungen (Coresh et al 2008). Diese Entwicklung ist vor allem auf die immer älter werdende Bevölkerung der Industrieländer und der damit steigenden Zahl von Erkrankungen wie Diabetes, Hypertonie und anderen kardiovaskulären Erkrankungen zurückzuführen.

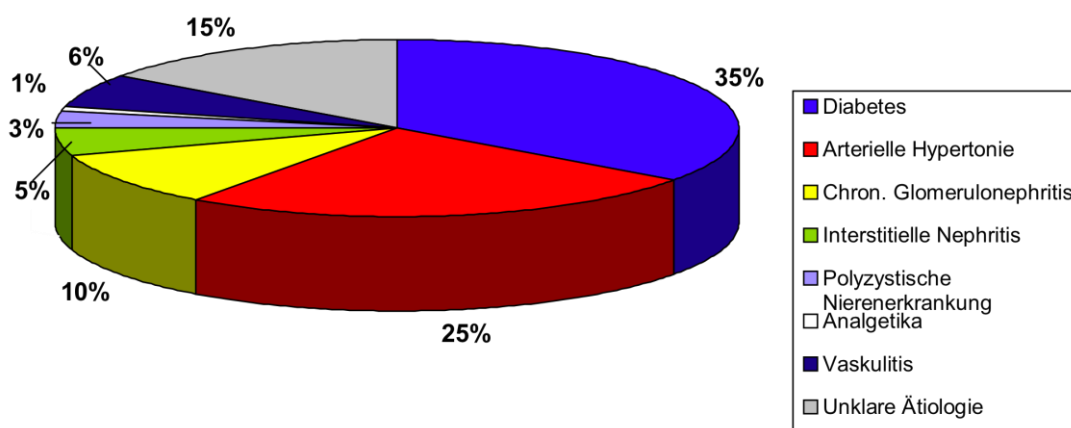


Abb. 1: Ursachen der terminalen Niereninsuffizienz in Deutschland in % (Quasi, Niere 2004)

Durch die Entwicklung und den Einsatz von immer neuen Immunsuppressiva wurde in den letzten Jahrzehnten ein deutlicher Fortschritt in der Unterdrückung und Behandlung akuter Abstoßungsreaktionen erzielt. Jedoch sind die Ergebnisse in Hinsicht auf das Langzeitüberleben nach Nierentransplantation in den letzten Jahren unverändert. Das mittlere Langzeittransplantatüberleben liegt derzeit bei ca. 10-15 Jahre (Sola et al 2010).

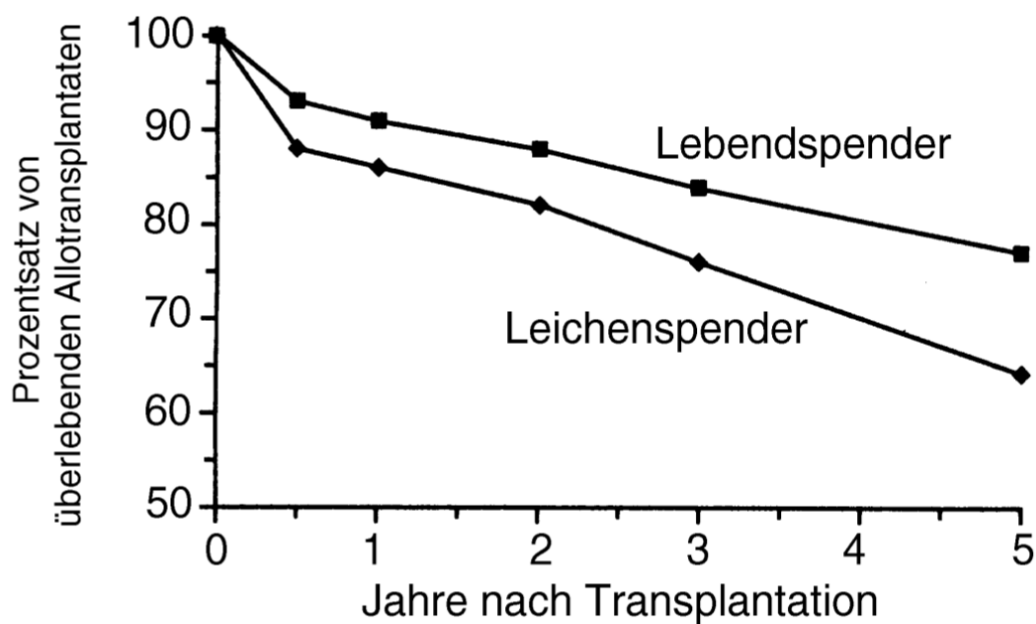


Abb. 2: Kaplan-Meier Schätzung zum Überleben von Nierentransplantaten unter Cyclosporin-Immuntherapie (Pascual et al 2003)

Dabei sind 6 % der jährlichen Transplantatverluste auf eine progressive Verschlechterung der Organfunktion zurückzuführen und somit müssten 20% der zur Verfügung stehenden Organe zur Re-Transplantation verwendet werden. Somit verschärft sich die Diskrepanz zwischen Organspende und Organbedarf.

Die Notwendigkeit zur Entwicklung neuer Strategien zur Unterdrückung der Immunantwort ist der Tatsache geschuldet, dass aktuelle Immunsuppressiva das Risiko einer Langzeitabstoßung nicht verhindern und diese Therapie das Risiko von unerwünschten Begleiterkrankungen erhöht. Langzeitergebnisse zeigen, dass die meisten Patienten nach einer Nierentransplantation nicht als Folge der eigentlichen

Transplantation, sondern auf Grund der Nebenwirkungen der immunsuppressiven Medikation sterben.

Die kontinuierliche Verbesserung des Transplantatüberlebens ist daher eine der vorrangigen Aufgaben in der aktuellen klinischen Forschung auf dem Gebiet der Transplantationsmedizin.

Derzeitige Strategien	Zukünftige Strategien
Verbesserungen im perioperativen Management (Verringerung der frühen Transplantatschädigung) Pharmakologischer Schutz vor akuter Abstoßung Behandlung der schweren oder refraktären Abstoßung Definition der optimalen Langzeitdosierung von Calcineurin-Inhibitoren Absetzen der Kortikosteroide bei stabilen Patienten Behandlung von Hypertension und Hyperlipidämie	Vermeiden von Calcineurin-Inhibitoren oder Kortikosteroiden Induktion von spenderspezifischer Hypo-Reaktionsfähigkeit (nur minimale Erhaltungssimmunsuppression erforderlich) Induktion und Erhaltung von Toleranz (keine Erhaltungssimmunsuppression erforderlich)

Tab. 1: Strategien zum Schutz vor Langzeit - Transplantatversagen (Pascual et al 2003)

1.1.1. Riset - Reprogrammierung des Immunsystems zur Etablierung von Toleranz

Das Riset- (Reprogrammierung des Immunsystems zur Etablierung von Toleranz) Programm wurde 2005 im Rahmen des Sixth Framework Programm (FP6) von der Europäischen Union auf Grund immenser internationaler Bemühungen, Konzepte zur Induktion Spender-spezifischer Toleranz zu entwickeln, aufgestellt und finanziert. Dabei handelt es sich um ein multinationales Forschungsprogramm, welches sich zur Aufgabe gemacht hat, experimentelle Fortschritte im Bereich der Toleranzinduktion in der Transplantationsmedizin zu fördern und in den klinischen Gebrauch zu integrieren (Riset).

Die TAIC – II Studie wurde von Riset unterstützt und im Rahmen dieses Forschungsprogrammes aufgesetzt, um die Anwendbarkeit und Wirkung sogenannter immunregulatorischer Zellen in Bezug auf die Reduktion der Immunsuppression bei der Nierenlebenspende im klinischen Gebrauch zu überprüfen.

1.2. Das Immunsystem

Eine Übertragung von allogenem (genetisch verschiedenem) Gewebe führt immer zu einer Immunreaktion. Besondere Bedeutung kommt dabei neben dem ABO-Blutgruppensystem vor allem dem Human-Leukocyten-Antigen (HLA) System zu. Die HLA-Antigene, codiert durch Gene des Haupthistokompatibilitätskomplexes (MHC), lassen sich auf der Oberfläche kernhaltiger Zellen lokalisieren und sind primäre Auslöser und Ziel der immunologischen Abwehrreaktion gegen ein Transplantat. Dabei bestimmt die Übereinstimmung der Gewebemerkmale des HLA-Systems die Verträglichkeit des Spenderorgans durch den Empfänger. Jedoch auch bei vollständiger Übereinstimmung dieser Alloantigene kommt es im Verlauf zu einer Abstoßungsreaktion. Dabei spielen die Oberflächenmarker, die nicht durch MHC – Moleküle codiert werden, sogenannte minor Histokompatibilitätsantigene (mHAg) eine zentrale Rolle. Diese Oberflächenmoleküle auf dem Transplantat werden durch die T-Lymphozyten des Empfängers als fremde Moleküle erkannt. Diese als Alloreaktivität beschriebene Reaktion führt zu einer Aktivierung unterschiedlichster T-Zell Subtypen und zur Destruktion des Transplantatgewebes (Sayegh et al 1994).

1.2.1. Pathogenese der chronischen Abstoßungsreaktion

Die chronische Transplantatabstoßung stellt die häufigste Ursache für den vorzeitigen Organverlust nach Langzeitüberleben eines Transplantates (Transplantatüberleben von mehr als einem Jahr) dar und ist definiert als eine fortschreitende Transplantatverschlechterung, welche durch eine immunsuppressive Therapie nicht vermieden werden kann. Sie tritt meist nach Monaten oder Jahren auf und ist gekennzeichnet durch eine stetige Verschlechterung der Funktion des transplantierten Organs bis hin zum terminalen Transplantatversagen. Neben den klinischen Anzeichen, bedingt durch einen kontinuierlichen Anstieg der Retentionsparameter, häufig in Kombination mit einer arterieller Hypertonie und Proteinurie, ist die chronische Transplantatabstoßung histopathologisch durch das Auftreten von mononuklearen Zellen in Glomeruli und peritubulären Kapillaren, sowie durch eine interstitielle Fibrose und Tubulusathrophie gekennzeichnet.

Die Einteilung des Schweregrades erfolgt anhand der Banff-Klassifikation (Solez et al 2007).

	EINTEILUNG DER CHRONISCHEN TRANSPLANTATNEPHROPATHIE
Grad I	Milde interstitielle Fibrose und Tubulusatrophie ohne (a) oder mit (b) spezifischen Veränderungen, die auf eine chronische Rejektion hinweisen
Grad II	Moderate interstitielle Fibrose und Tubulusatrophie (a) oder (b)
Grad III	Schwere interstitielle Fibrose und Tubulusatrophie (a) oder (b)

Tab. 2: Histologische Einteilung der chronischen Transplantatnephropathie nach der Banff-Klassifikation (Solez et al 2007)

Histopathologisch wird die chronische Transplantatnephropathie in eine frühe und eine späte Phase unterteilt. Im Gegensatz zur späten Phase zeichnet sich die frühe Phase - umfaßt den Zeitraum des ersten Jahres nach Transplantation - durch einen tubulointerstitiellen Schaden aus. Die Spätphase der chronischen Transplantatnephropathie wird durch die arterioläre Hyalonose und die Glomerulosklerose geprägt (Banasik und Klinger 2005).

Gekennzeichnet durch die Infiltration von mononuklearen Zellen überwiegt im Vergleich zur Gewebeeinfiltration durch T-Lymphozyten bei der akuten Abstoßungsreaktion bei der chronischen Transplantatabstoßung die Infiltration durch Monozyten und Makrophagen. Der Pathomechanismus des chronischen Transplantatversagens ist dabei sehr komplex und noch nicht vollständig verstanden. Er beinhaltet jedoch eine Reihe immunologischer und nicht-immunologischer Faktoren (Li und Yang 2009).

Immunologic (Antigen Dependent)	Nonimmunologic (Antigen Independent)
Cellular immunity direct <i>versus</i> indirect allorecognition donor–host mismatch subclinical inflammation co-stimulatory signaling inadequacy of immunosuppression	Organ viability donor senescence donor age prolonged cold ischemic time delayed graft function/acute tubular necrosis living <i>versus</i> deceased reduced renal mass donor brain injury
Humoral immunity antibody-mediated rejection previous sensitization	Treatment drug toxicity
Infection CMV BK polyomavirus	Recipient factors lipid disorders diabetes recurrent disease compliance hypertension obstruction

Tab. 3: Immunologische und nicht-immunologische Faktoren der chronischen Transplantatnephropathie (Lie und Yang 2009)

Bei der Entwicklung der Transplantatnephropathie spielt unter den nicht-immunologischen Faktoren wie die Viabilität des Organes (Kalte Ischämiezeit, Reperfusionsschaden, Spenderkriterien) oder des Empfängers (arterielle Hypertonie, Diabetes mellitus oder die Proteinurie), vor allem auch die Nephrotoxizität der Calcineurininhibitoren eine wesentliche Rolle (Walli und Weir 2008). Aus diesem Grund ist ein wesentlicher Bestandteil neben der Therapie der chronischen Transplantatnephropathie durch den Versuch der Reduktion der immunsuppressiven Therapie, die Behandlung der anderen nicht-immunologischen Faktoren (Pascual et al 2003).

Neben den nicht-immunologischen Faktoren sind auch immunologische, alloantigen- abhängige Faktoren an der chronische Transplantatabstoßung mit beteiligt (Barth et al 1998).

Dabei sind nach derzeitigem Wissen sowohl humorale (getriggert durch Antikörper) als auch zelluläre (getriggert durch Lymphozyten) Abstoßungsmechanismen des menschlichen Immunsystem an der Immunreaktion beteiligt. Neben der durch T-Zell Aktivierung, die dabei als zentrales Ereignis in der Aktivierungskaskade der chronischen Transplantatabstoßung eine Rolle spielt, und Makrophagen vermittelten Immunantwort vom verzögerten Typ führen Zytokinausschüttungen und die durch B-Lymphozyten bedingte Antikörperbildung zur chronischen Entzündungsre-

aktion und folgedessen zur kontinuierlichen Fibrosierung des Transplantates. Dabei dominiert die T-Zell Aktivierung, wobei die Erkennung von Alloantigenen durch alloreaktiver $CD4^+$ T-Zellen zur Sekretion von Zytokinen zu zytotoxischen Effektormechanismen führt. Dazu gehört die Rekrutierung von Effektorzellen wie $CD8^+$ T-Lymphozyten, natürlichen Killerzellen (NK-Zellen), Makrophagen und B – Lymphozyten.

Die Alloantigenerkennung kann dabei über zwei völlig unterschiedliche Wege erfolgen, dem direkten und dem indirekten Aktivierungsweg (Whitelegg und Barber 2004). Der direkte Weg wird durch sogenannte "passanger Leukozyten" aktiviert. Dies sind spendereigene professionelle antigenpräsentierende Zellen die mit dem Transplantat ins Blut des Empfängers transfundiert werden, und durch Präsentation allogener MHC – Moleküle von alloreaktiven T-Lymphozyten als fremd erkannt werden (Ali et al 2013). Dabei wird angenommen, dass die direkte Aktivierung der T-Lymphozyten vor allem bei der akuten Abstoßungsreaktion eine Rolle spielt.

Die indirekte Alloantigenerkennung, dessen Rolle bei der chronischen Transplantatabstoßung lange Zeit vernachlässigt worden ist, bekommt jedoch nun zunehmend Beachtung im Verständnis der Pathophysiologie der chronischen Abstoßungsreaktion. Dabei entspricht die indirekte T-Zell Aktivierung dem der normalen Antigenerkennung (Szabolcs et al 2012). Exogene, mit dem Transplantat eingeschwemmte allogene Antigene (lösliche MHC-Moleküle) werden durch empfänger-eigene antigenpräsentierende Zellen aufgenommen. Nach Prozession der Antigene, können die Peptide auf empfängereigenen MHC- II Molekülen von APC- Zellen präsentiert werden und somit zur Aktivierung von $CD4^+$ T-Lymphozyten führen.

Durch Aktivierung von $CD4^+$ T-Lymphozyten kommt es zu einer funktionell gegensätzlichen Aufteilung (Dichotomie der T-Helferzellen) in T_H1 - und T_H2 - Lymphozyten. Die Aufteilung erfolgt dabei anhand der Zytokine, welche durch die jeweiligen Lymphozyten produziert werden. Die T_H1 - Lymphozyten sind an der zellulären Immunantwort beteiligt. Durch Ausschüttung von Interleukin- 2, $INF- \gamma$ und $TNF- \alpha$ kommt es zur Aktivierung und Differentierung von Makrophagen, die wiederum durch Ausschüttung von Zytokinen die Polarisierung von T_H1 -Lymphozyten herbeiführen und durch Ausschüttung von Chemokinen weitere Zellen ins Gewebe locken. Lymphozyten vom Typ T_H2 hingegen regulieren durch Sekretion von IL- 4, IL- 5, IL- 6, IL- 10 und IL- 13 die Aktivität von B-Lymphozyten.

Die Dichotomie der T-Helferzellen gilt auch für die CD8⁺ T-Zellen (Mosmann et al 1986).

1.2.2. Immuntoleranz

Die Erforschung der immunologischen Toleranz bleibt so etwas wie der "Heilige Gral" in der Transplantationsimmunologie und Transplantationsmedizin.

Natürlich auftretende Toleranz ist bereits mehrfach beschrieben und ist meistens bei Patienten zu beobachten, welche die immunsuppressive Therapie eigenständig abgesetzt haben. Dabei weisen ca. 10% eine spontane Immuntoleranz gegen das Empfängerorgan auf (Burlingham et al 1995).

Unter Immuntoleranz versteht man das Phänomen der spezifischen Areaktivität des Immunsystems oder die Unterdrückung der Antikörperbildung, welche durch Verabreichung eines Antigens (Transplantat) hervorgerufen wird (Hasek 1965). Dabei kommt es zur Unterdrückung der Immunantwort des Empfängers gegenüber dem spenderspezifischen Antigen bei ansonsten vollständigem Erhalt der Immunkompetenz des Wirts.

Bereits 1953 beschrieb Medawar das Prinzip der postnatal induzierten Immuntoleranz. Die Applikation von allogenen Milzzellen eines zweiten Stammes bei neugeborene Mäusen mit unausgereiftem Immunsystem führt dabei zu einem dauerhaften Überleben eines später transplantierten Hauttransplantates und somit zu einer spezifischen allogenen Immuntoleranz gegenüber dem zweiten Stamm (Billingham et al 1953).

Seitdem sind viele Versuche unternommen worden dieses Phänomen auf den Menschen zu übertragen und in die Klinik zu überführen. Die Umsetzung in den klinischen Gebrauch ist jedoch nur von geringem Erfolg geprägt (Mc Curry et al 1995, Rutella und Lemoli 2004) Einige der derzeit verfolgten Strategien zur Toleranzinduktion sind die Blockade von T-Zell Kostimulationen, Induktion von gemischtem Chimärismus, die spezifische T-Zell Depletion oder der Toleranzinduktion mittels spezifischer regulatorischer T-Zellen, wobei die Strategien in zwei Kategorien unterteilt werden können: die Toleranzinduktion durch Knochenmarktransplantation (KMT) und ohne Knochenmarktransplantation (Ashton-Chess et al 2006).

Dabei spielen immunologische Mechanismen wie die klonale Deletion, die klonale Anergie, die Unterdrückung, die Ignoranz und die Immundeprivation eine entscheidende Rolle (Fuchs 2014, Sykes 2009). Die aktiven Prozesse sind dabei von wesentlichere Bedeutung bei der Toleranzinduktion, als die bloße Abwesenheit einer Immunreaktion.

Die Knochenmarkstransplantation führt durch Etablierung eines gemischten dauerhaften Makrochimerismus zur vollständigen spenderspezifischen Toleranzinduktion. Dabei entsteht ein kompletter hämatopoetischer Chimerismus, der durch einen vollständigen Austausch der Empfängerleukozyten gegen Spenderleukozyten definiert ist und durch kombinierte myeloablative Konditionierung des Immunsystems und anschließende KMT erfolgt (Blaha et al 2005). Hingegen entsteht der gemischte hämatopoetische Chimerismus durch KMT nach Konditionierung des Immunsystems durch sogenannte non-myeloablative Verfahren (Pascual et al 2003). Dabei entsteht eine Ko-Existenz von Spender- und Empfängerleukozyten, wobei per Definition der Anteil an Spenderlymphozyten mindestens 5% betragen muss.

Die Lymphozyten des Spenders gelangen in den Thymus und induzieren durch negative Selektion einen intrathymalen Spenderchimerismus (Asthon-Chess et al 2006). Das frühzeitige Erkennen spenderspezifischer Antigene während der Reifung und dem Absterben durch Apoptose beschreibt den Mechanismus der zentralen Toleranz durch klonale Deletion. Zur Einnistung der allogenen Stammzellen ist jedoch neben der zentralen Toleranz auch die durch T-Zellen vermittelte periphere Toleranz von Bedeutung (Sachs et al 2009). Dabei ist die Kompatibilität von MHC-Antigenen zwischen Knochenmark- und Organspender der Schlüssel zur Transplantattoleranz durch gemischten Chimerismus (Jäger et al 2002).

Die zentrale Toleranz durch Makrochimerismus ist dabei die robusteste und beständigste derzeit zu erreichende Form (Fuchs 2014), jedoch sind die Umsetzung in den klinischen Gebrauch und Anwendung in der Transplantationsmedizin auf Grund der schweren Toxizität und dem einhergehenden Komplikationsrisiko, wie der Graft versus Host – Reaktion, nicht möglich.

Strategien zur Toleranzinduktion ohne Knochenmarktransplantation beinhalten die T- Lymphozyten Depletion, die Blockade der Co-Stimulation oder die Stimulation regulatorischer T-Zellen (Knechtle 2005). Diese Strategien greifen im Wesentlichen in die Funktion der peripheren Toleranz ein, wobei hier immunologische Mechanismen wie die klonale Anergie, die Unterdrückung oder die Ignoranz beteiligt sind und wodurch in der Peripherie die immunsuppressive Reaktion unterdrückt und reguliert wird. Im Vergleich zur zentralen Toleranz, bedingt durch klonale Deletion, kann diese Form der Toleranz jedoch nicht dauerhaft garantiert werden, da mögliche Infektionen Einfluss auf den Toleranzstatus nehmen können (Fuchs 2014).

T-Zell Depletion kann mittels Lymphozytenirradiation oder durch die Verwendung von mono- bzw polyklonalen Antikörpern erreicht werden. Klinische Studien zur Anwendung von Lymphozytenirradiation haben jedoch nur einen geringen Erfolg aufgewiesen (Strober 2000), weshalb der klinischen Anwendung nur wenig Bedeutung beigemessen wird (Ashton-Chess et al 2006). Mehr Bedeutung wird den Antikörpern zugesprochen, wie dem Anti- CD3 Immunotoxin oder dem Anti-CD52 Antikörper. Jedoch lässt sich eine vollständige Immuntoleranz damit nicht induzieren. Heutzutage angewandt, ermöglicht es die Reduktion von immunsuppressiven Therapie-Schemata. Infektionsraten und die Inzidenz von malignen Begleiterkrankungen unterscheiden sich jedoch nicht wesentlich von denen derzeit angewandter Schemata (Knechtle 2005).

Die Toleranzinduktion durch Blockade der Co-Stimulation konnte in Tierexperimenten einen Status der Immuntoleranz herbeiführen. Die Blockade des B7 – CD28 Induktionsweg, durch CTLA4- Immunglobulin oder anti- B7 Antikörper, in Kombination mit der Blockade des CD40 – CD154 Induktionsweg, durch anti- CD154 oder anti- CD40 Antikörper führte zu einem Langzeittransplantatüberleben jedoch nicht zu einer Transplantattoleranz. Akute Abstoßungsreaktionen konnten durch eine fortlaufende Therapie verhindert werden (Kirk et al 1999). Bei dem Versuch der klinischen Anwendung kam es jedoch zu einer gehäuften Anzahl von akuten Abstoßungsreaktionen und thrombo-embolischen Ereignissen (Knechtle 2000). Weitere Co-Stimulationsblocker, wie der anti- CD28 Antikörper weisen vielversprechende Ergebnisse auf, müssen aber noch in der klinischen Anwendung getestet werden (Vanhove et al 2003).

Derzeit angewandte Co- Stimmulationsblocker wirken daher eher als Immunsuppressivum, als ein Medikament zur Toleranzinduktion.

Eine weitere Strategie zur Induktion von Transplantattoleranz ist die Stimulation von regulatorischen T-Lymphozyten. Die Knochenmarktransplantation hat den Stellenwert des vielstämmigen stabilen Chimerismus bewiesen, jedoch verbleibt unklar, welcher zelluläre Mechanismus für die Toleranzinduktion im wesentlichen verantwortlich ist. Dabei bleibt zu klären, ob eventuell nur eine bestimmte Subpopulation von Spenderzellen notwendig ist Toleranz zu induzieren. Durch Applikation von spenderspezifischen Zellen ist die Induktion eines temporären peripheren Mikrochimerismus möglich.

Neue Methoden sind dabei in-vitro mit M-CSF und IFN- γ kultivierte, vom Transplantatspender gewonnene Zellen monozytären Ursprungs (Fändrich et al 2004). Durch Co-Kultivierung mit regulatorischen T-Lymphozyten des Empfängers kommt es zur vermehrten Bildung von Oberflächenrezeptoren mit regulatorischen Eigenschaften und nach Applikation zu einem transienten Mikrochimerismus.

Ähnliche Eigenschaften werden dendritischen Zellen bei der Toleranzinduktion nachgesagt. Dabei vermutet man, dass dendritische Zellen immunologische Suppressorfunktionen besitzen. Diese sind einerseits in der Lage die Antigenpräsentation zu verhindern, andererseits können sie aktiv als Suppressorzelle agieren (Thompson et al 2004).

1.3. Immunsuppressiva

Zum Erhalt der Organfunktion und zur Unterdrückung der Immunantwort ist nach der Organtransplantation eine dauerhafte medikamentöse immunsuppressive Therapie notwendig. In der derzeit angewandten Therapie werden die Calcineurin - Inhibitoren am häufigsten eingesetzt.

Nach der Einführung der Kortikosteroide in die immunsuppressive Therapie in den 50 Jahren und dem Azathioprin in den 60 Jahren galt zwischen 1962 und 1978 nach Nierentransplantation die Kombinationstherapie aus Azathioprin (6-Mercaptopurin) und Kortikosteroiden als Standardtherapie zur Immunsuppression.

Mit der Einführung des Azathioprins waren auf einmal 1-Jahresüberlebensraten von 60% möglich (Hamburger et al 1965). Diese Medikation war auf Grund seiner antiproliferativen Wirkung jedoch auch mit erheblichen Nebenwirkungen behaftet (Dupont et al 1986).

Der Durchbruch in der medikamentösen Unterdrückung des menschlichen Immunsystems gelang insbesondere durch die Entdeckung der Calcineurininhibitoren, wie dem Cyclosporin A (CsA), einem Stoffwechselprodukt aus dem Bodenpilz *Tolypocladium inflatum gams* (Green CJ 1981, Eisenman et al 1980) im Jahr 1978. Eine 10-100 fach stärkere ähnliche immunsuppressive Wirkung wurden bei dem Makrolidlacton FK 506 (Tacrolimus) 1984 in Japan nachgewiesen, welches ebenfalls als Stoffwechselprodukt aus einem Pilz namens *Streptomyces tsukubaensis* gewonnen wird (Mrowietz 2001).

Trotz großer Unterschiede in der chemischen Struktur beider Stoffe wiesen diese ein sehr ähnliches Wirkungs- und Nebenwirkungsprofil auf, bedingt durch ihren Einfluss auf die Calcineurin-Phosphatase (Mihatsch et al 1998). In niedriger Dosierung hingegen konnte die 1-Jahres-Überlebensrate vieler Spenderorgane unter der Kombinationstherapie mit Calcineurininhibitoren auf über 86% deutlich verlängert werden (Land 2004).

Anhand der Daten des "Organ Procurement and Transplantation" – Netzwerk (OPTN) des "U.S. Department for Health & Human Services" zeigte sich, dass 2010 96% der Patienten zum Ende der stationären Behandlung nach Nierentransplantation mit CsA eingestellt waren (OPTN/SRTR 2010).

1.3.1. Wirkungsmechanismus von Calcineurininhibitoren

Calcineurin-Inhibitoren wirken durch die Blockade des Enzyms Calcineurin und greifen daher frühzeitig und spezifisch in die Signaltransduktion und Aktivierung von T-Lymphozyten ein.

Calcineurin ist ein zytosolisches Protein und zählt zur Gruppe der Phosphatasen (Phosphatase 2B). Calcineurin wird eine Schlüsselrolle in der Regulation der Immunantwort nach Organtransplantation zugeordnet (Molkentin et al 1998). Im Rahmen einer Immunantwort erfolgen durch die Antigenpräsentation über T-Zelloberflächenrezeptoren ein intrazellulärer Anstieg von Calcium und die Bildung

von Ca^{2+} /Calmodulin-Komplexen. Durch deren Bindung an Calcineurin kommt es zur Aktivierung der Phosphatase. Calcineurin dephosphoryliert NF-AT_c (nuclear factor of activated T-cells), ein Transkriptionsfaktor von T-Lymphozyten.

Die De-Phosphorylierung ermöglicht die Translokation von NF-AT_c in den Nucleus, wo es durch die Fusion des zytoplasmatischen NF-AT_c und des nukleären NF-AT_n wiederum zur Bildung des funktionsfähigen Kernkomplex NF-AT kommt. Dieser Transkriptionsfaktor reguliert eine Vielzahl von Zelloberflächenrezeptoren, wie z.B. IL-2 und $\text{INF}\gamma$ (Macian F 2005). Die Interleukin getriggerte T- Zell Proliferation führt zu einer Abwehrreaktion des Immunsystems und zum Verlust des Transplantates.

Die Calcineurininhibitoren CsA und FK 506 unterbinden diese Aktivierungskaskade durch Blockade von Calcineurin (Borel et al 1979). Durch die Bindung an spezifische Rezeptorproteine (Cyclophilin, FK 506 binding Cyp3A4 protein) im Zytosol kommt es zu einer Komplexbildung, sogenannten Immunophilinen (Handschuhmacher et al 1984, Barik S 2006). Diese Immunophilinen (CsA/Cyclophilin ; FK 506/ FK506 binding Cyp 3A4 protein) binden kompetitiv an das Calcineurin und hemmen somit die Phosphataseaktivität. Es erfolgt zu einem frühen Zeitpunkt der T-Zell-Aktivierungskaskade die Hemmung der Interleukin-2 und Interleukin-2 Rezeptor Synthese durch Blockade spezifischer Transkriptionsfaktoren (O'Keefe et al 1992).

1.3.2. Nebenwirkungsprofil von Calcineurininhibitoren

Bereits in den ersten Anwendungsversuchen zeigten die Calcineurininhibitoren bei hoher Dosierungen eine starke Nephrotoxizität, die bis hin zum akuten Nierenversagen führen kann (Calne RY 1976). Dabei handelt es sich jedoch um akute und reversible Nebenwirkungen, bedingt durch die Minderperfusion des Transplantates auf Grund des vasokonstriktiven Effekt an afferenten Ateriolen (Zhang und Victor 2000). Daher ist der therapeutische Bereich von Calineurininhibitoren nur sehr schmal, ein zu niedriger Talspiegel würde eine Transplantatabstoßung zur Folge haben, ein zu hoher Plasmaspiegel wiederum führt zur toxischen Schädigung des Organes.

Hauptproblem stellt jedoch die nicht immunologische, medikamentös getriggerte chronische Transplantatnephropathie (CTN) durch Calcineurininhibitoren dar (Bennett et al 1996). Dabei spielt einerseits die erhöhte Inzidenz nicht immunologischer Faktoren wie Bluthochdruck, Diabetes und Hyperlipidämie (Thomas et al 2013, (Kesiraju et al 2014) eine wichtige Rolle, andererseits ist auch die dosisabhängige erhöhte Infektanfälligkeit und ein erhöhtes Tumorrisiko unter der immunsuppressiven Therapie zu beachten (Hultsch et al 2005).

Zudem vermutet man eine Schlüsselrolle in der Stimulation pro-fibrotischer Zytokine wie TGF- β in T-Lymphozyten durch Calcineurin-Inhibitoren (Ahuja et al 1995). Die Stimulation von TGF- β besitzt dabei nicht nur eine antiinflammatorische Wirkung auf Th1-Zellen, sondern führt auch zur vermehrten Synthese von extrazellulären Matrixproteinen. Über die TGF- Rezeptor vermittelte Signalkaskade kommt es dadurch zu einer überschießenden vasculären Fibroseinduktion (Waiser et al. 2002).

Eine Akkumulation von extrazellulärer Matrix ist in 30 – 40 % der Transplantate nach Langzeitüberleben nachzuweisen und Grundlage aller histopathologischen Veränderungen der Calcineurin-Inhibitoren (CNI), die zur chronischen Transplantatinsuffizienz führen.

1.4. Die Transplantat-Akzeptanz induzierende Zelle

Die Transplantat –Akzeptanz aktivierende Zelle (TAIC) ist eine in –vitro gezüchtete Zelle monozytären Ursprungs, welche aus dem peripheren Blut (PBMC) oder der Milz gewonnen werden kann. Durch die besondere In-Vitro Kultivierung in einem Medium, unter Einfluss eines Wachstumsfaktors (M-CSF) und eines Zytokins ($\text{IFN}\gamma$), erfolgt die Differenzierung zu einer Sub-Population von Makrophagen (TAIC-Phänotyp), welche bis dato noch nicht beschrieben worden ist, sogenannte $\text{IFN}\gamma$ - stimulierte Zellen monozytären Ursprungs ($\text{IFN}\gamma$ - MdC) (Brem-Exner et al 2008). Dabei unterscheiden sich diese Zellen von anderen Makrophagen anhand der Morphologie, Oberflächenstruktur und Funktion. Die Heterogenität von Makrophagen ist im wesentlichen von ihrem Aktivierungszustand abhängig (Gordon und Taylor 2005, Strauss et al 2007).

Die TAIC-Zelle lässt sich somit als ein immunregulatorischer Makrophag (M reg) in einem neuartigen Aktivierungszustand bezeichnen (Brem-Exner et al 2008).

1.4.1. Klassifikation

Morphologisch weisen die TAIC-Zellen einen tesselierten epitheloiden Zellverbund auf, wobei die Ränder einzelner Zellen wegen ihrer engen Apposition kaum abgrenzbar sind. Die einzelnen Zellen weisen einen einzelnen runden Zellkern auf, umgeben von einem dichten schmalen Zytoplasmasaum. Das Zytoplasma erscheint dabei extrem grobkörnig, bedingt durch die Fähigkeit zur Phagozytose zellulärer Bestandteile.

In Abhängigkeit von der Zelldichte liegt der Durchmesser bei 50µm (Hutchinson et al 2008).

Phenotypisch lassen sich die TAIC-Zellen anhand der Oberflächenrezeptoren eindeutig als partiell gereifte Makrophagen identifizieren. Sie lassen sich jedoch auf Grund eines charakteristischen Expressionsprofils keiner beschriebenen Subpopulation zuordnen. TAIC-Zellen weisen jedoch eine größere Ähnlichkeit gegenüber M1 Makrophagen als M2 Makrophagen auf (Gordon et al 2005).

Durch den Nachweis von Markern wie CD 13, CD 30, CD 64, CD 205 und CD 206, welche auf allen TAIC-Zellen nachzuweisen sind, lassen sich TAIC-Zellen dem myeloepoetischen System zuordnen (Hutchinson et al 2008). Insbesondere die Expression des endozytischen Rezeptors CD 205 identifiziert diese als Zelle monozytären Ursprungs. CD 205 zählt zu den Mannose-Rezeptoren und spielt eine wichtige Rolle in der Antigenpräsentation gegenüber dendritischen Zellen an MHC-II Molekülen (Bonifaz et al 2002) und in der Aktivierung regulatorischer T-Zellen (Mahnke et al 2003). Die Expression von CD 14⁺ erscheint variabel, jedoch ist die CD 163 Expression auf die CD 14⁺ TAIC-Zellen beschränkt. Der CD 163 Oberflächenrezeptor zählt zu der Cystein-reichen Scavenger Rezeptoren- (SRCR) Superfamilie und ist nur auf Monozyten und Makrophagen zu finden (Moller 2012).

Unter der Kultivierung von Monozyten mit M-CSF und IFN γ kommt es zu einer vermehrten Ausbildung von CD3⁺/CD14⁺- TAIC-Zellen.

Des Weiteren zeigen sich die Spiegel der Rezeptoren HLA-DR, CD 80 und CD 86 im Vergleich zu ruhenden Makrophagen wesentlich erhöht, jedoch geringer zu klassisch aktivierten Makrophagen. CD 80 (B7-1) und CD 86 (B7-2) sind dabei wichtige Co-Stimulatoren in der Aktivierung von T-Zellen, wobei ohne eine B7-CD28 Verbindung keine T-Zell Aktivierung stattfindet (Vasilevko et al 2002).

Phänotypisch können TAIC-Zellen somit als partiell gereifte Makrophagen bezeichnet werden. Die unterschiedlichen Expressionsgrade der Oberflächenrezeptoren sind dabei eher Ausdruck unterschiedlicher Reifegrade als unterschiedlicher Subpopulationen (Hutchinson et al 2008).

Auch ist weiterhin von Bedeutung, daß TAIC-Zellen eine hohe Anzahl an Rezeptoren mit immunregulatorischen Eigenschaften wie die Rezeptoren Foxp3, CTLA-4 (CD 152) und CD 103 (Integrin $\alpha_6\beta_7$) exprimieren. Dabei weisen sie deutlich höhere Expressionsmuster auf TCR⁻ (T-Zellen Rezeptor) - TAIC-Zellen als auf TCR⁺ - Zellen auf. Bisher sind diese Oberflächenmarker nur auf TCR⁺ Zellen beschrieben worden.

1.4.2. Wirkmechanismus am Immunsystem

Unter den Bedingungen der Ko-Kultivierung spenderspezifischer Lymphozyten des peripheren Blutes mit den in vitro gezüchteten TAIC-Zellen des Spenders kommt es zu einem Überleben und Anreicherung einer phenotypisch klar definierten Subpopulation von T-Zellen, charakterisiert als CD4⁺/CD25^{High}, CD45^{low}, CD 103⁺, GITR⁺ - Zellen. Deren funktionellen Eigenschaften bestätigt die Annahme, dass sie eine Untergruppe regulatorischer T-Zellen präsentieren. Nach Isolation dieser regulatorischen T-Zellen zeigt sich eine Unterdrückung der Proliferation von Antigen präsentierenden Zellen (APC) - stimulierten naiven T-Zellen. Dies weist daraufhin, daß TAIC-Zellen als immunregulatorische Makrophagen in der Lage sind, die Entwicklung allogenspezifischer Empfänger- eigener regulatorischer Zellen zu induzieren. Dieser Prozess ist jedoch an die Anwesenheit von CD4⁺ während der Generierung von TAIC-Zellen gekoppelt. Bei Kokultivierung mit ruhenden oder M1-Makrophagen kann dieser Effekt nicht nachgewiesen werden (Brem-Exner et al

2008). Die immunsuppressive Wirkung von TAIC-Zellen ist somit einerseits durch die Aktivierung CD4⁺/CD25⁺ regulatorischer T-Zellen, andererseits durch die Inaktivierung alloreaktiver cytotoxischer T-Zellen bedingt.

Regulatorische T-Zellen sind in der Lage eine überschießende Immunantwort z.B. bedingt durch Chemotaxine abgebende Makrophagen als Teil der inflammatorischen Cascade zu unterdrücken. T_{reg}-Zellen sind mit spezifischen Chemokin-Rezeptoren ausgestattet, wie dem C-C Chemokin Rezeptor CCR4 (CD194) und dem C-C Chemokin Rezeptor CCR8 (Cdw198). Dies stellen Rezeptoren für die Chemokine CCL22 (Makrophage-derived Zytokin), CCL1/CCL17 (Thymus und Aktivierungs regulieren des Zytokin) und MIP-1 (Makrophagen-inflammatorisches Protein) dar. Insbesondere werden diese durch Makrophagen, dendritische Zellen und Lymphozyten produziert. Chemokine locken regulatorische T-Zellen in Gebiete entzündlicher Aktivität. Dies hat eine Unterdrückung der T-Zell Aktivierung zur Folge. Zirkulierende CD4⁺ T-Zellen, welche mit den Chemokine CCL1 und CCL22 binden, haben einen deutlichen Einfluss auf die Reduktion einer alloproliferativen Immunantwort. Gleichzeitig kann in den sekundären Lymphorganen ein Einnistungsprozess nachgewiesen werden, wobei T_{reg} – Zellen kompetitiv mit aktivierten T-Zellen an professionellen Antigen präsentierenden - Zellen binden und somit die weitere T-Zell Aktivierung unterbinden.

Die Aktivierung regulatorischer T-Zellen hat zudem die Eigenschaft eine durch CD8⁺/ CD44⁺ T-Gedächtniszellen getriggerte Immunantwort zu unterdrücken. Dabei ist der Oberflächenrezeptor CD 30, welcher auch auf TAIC-Zellen nachzuweisen ist, von essentieller Bedeutung (Dai et al 2004). Das Ausschalten dieser Zellen durch spenderspezifische regulatorische T-Zellen würde das Risiko einer chronischen Transplantatabstoßung wesentlich reduzieren.

In den vorangegangenen Tierversuchen an der Maus, Ratte oder dem Mini-Pig Schwein konnte gezeigt werden, dass TAIC-Zellen kein allgemeines Immundefizit verursachen und somit kein erhöhtes Infektionsrisiko für den Empfänger besteht. Ein erhöhtes Tumorrisiko konnte ebenfalls nicht nachgewiesen werden (Hutchinson et al 2008).

2. Fragestellung

Eine mögliche Toleranzinduktion mittels Immunmodulation anhand der präoperativen Gabe spezifischer Toleranz-induzierender Zellgruppen stellt in der Organtransplantation einen reizvollen Therapieansatz dar.

Um ein therapeutisches Potential einer zellbasierten immunologischen präoperativen Konditionierung in Betracht zu ziehen, muß man den vor kurzem beschriebenen positiven Effekt einer spender-spezifischen Bluttransfusion einordnen (Burlingham et al 2001, Opelz et al 1973, Salvatierra et al 1980, Anderson et al 1982, Roelen et al 2004).

Bei der Entwicklung einer solchen immunregulierenden zellbasierten Therapie muss auch gezeigt werden, daß die beschriebenen Vorteile ohne Komplikationen erreicht werden können. Dies sind insbesondere eine Empfängersensibilisierung auf Spender spezifische Antigene, ein erhöhtes Risiko für Infektionen sowie eine erhöhte Inzidenz maligner Erkrankungen. Auch ein erhöhtes Embolierisiko auf Grund therapiebedingter zellulärer Aggregationen sollte beachtet werden.

Vorrausgegangene Versuche am Tiermodell haben gezeigt, daß Toleranz von Transplantationsantigenen ohne weiteres mittels regulatorischer T-Zellen übertragen werden kann. Zudem konnte gezeigt werden, das die entsprechend stimulierten Antigen-präsentierenden Zellen (APZ) und bestimmte T-Zell Subgruppen einen Zustand einer spender- spezifischen Transplantat-toleranz ermöglichen. Jedoch ist eine Übertragung dieser seit geraumer Zeit bestehenden und etablierten experimentellen Protokolle in die klinische Anwendung nur von geringem Erfolg gezeichnet (Mc Curry et al 2006, Rutella und Lemoli 2004, Lechler 2005, Bluestone 2007).

Ein Grund dafür besteht sicherlich aus der Folge der umfangreichen technischen Herausforderung der Isolation und Vermehrung der seltenen und oft falsch definierten Zellen, Gewinnung und Transport dieser Zellen, sowie die Art und Weise der fachgerechten Transplantation können Ursache des geringen klinischen Erfolgs sein.

Weitere vorausgegangene experimentelle Arbeiten der Kieler Arbeitsgruppe haben sich mit dem Potential dieser spezifischen Untergruppe immunregulierender Mak-

rophagen auseinandergesetzt. Der Einsatz solcher "Transplantat-Akzeptanz"-induzierenden Zellen (TAIZ) zeigte einen nachweisbaren funktionellen Status von Transplantationstoleranz (Hutchinson et al 2008 a, Hutchinson et al 2008 b, Fändrich et al 2002 a, Fändrich et al 2002 b, Heumann et al 2005, Brem-Exner et al 2004, Brem-Exner et al 2008). Diese TAIZ wiesen eine Anzahl von Eigenschaften auf, welche sich insbesondere für den klinischen Einsatz eigneten. Im Rahmen der "TAIC-I singel-centre, open label Studie" zur Anwendung von TAIZ bei der Nierentransplantation konnte bereits gezeigt werden, dass der Einsatz von solchen TAIZ keine unerwünschten Reaktionen bezüglich des Transplantatüberlebens oder seiner Funktion bewirken. Die TAIZ-I Studie konnte ohne akute Komplikationen im mittelfristigen Verlauf abgeschlossen werden (Hutchinson et al 2008 a).

Diese klinische Studie (TAIZ II) wurde im Dezember 2007 beendet. In der Studie wurden die Zellen als additive Therapie zur Konditionierung des Immunsystems in der Lebendtransplantation verwendet.

Ziel der vorliegenden Arbeit sollte sein, den klinischen Verlauf über ein Jahr von fünf Patienten zu beschreiben die im Rahmen dieser TAIZ II – Studie immunmodulierend vor einer Nierentransplantation behandelt wurden und folgende Fragen zu beantworten:

Frage 1: Ist die Anwendung von allogenen-spezifisch-konditionierten immunregulatorischen Makrophagen (TAIC-Zellen) in der Lebendnierentransplantation sicher und für den Transplantatempfänger ohne ein erhöhtes Komplikationsrisiko verbunden ?

Frage 2: Kann durch die Anwendung von allogenen-spezifisch-konditionierten immunregulatorischen Makrophagen (TAIC-Zellen) ein Status von partieller bzw. vollständiger Toleranz erzielt werden und als Folge dessen die immunsuppressive Therapie teilweise bzw. vollständig abgesetzt werden ?

Frage 3: Kann durch die Anwendung von allogenen-spezifisch-konditionierten immunregulatorischen Makrophagen (TAIC-Zellen) die chronische Transplantatabstoßung vermieden und das Transplantatlangzeitüberleben verbessert werden ?

3. Patienten, Material und Methode

3.1. Studiendesign

Die in der vorliegenden Arbeit beschriebenen Untersuchungsergebnisse wurden am Patienten erhoben, die an der TAIC II – Studie teilgenommen haben.

TAIC II ist eine klinische Studie, konzipiert als eine Phase I/II - Studie, in einem offenen, multizentrischen Muster. Als „proof of concept“ Pilotstudie, zur Untersuchung der Toleranzinduktion bei Lebendnierentransplantation, wurde diese unkontrolliert und ohne Randomisierung durchgeführt.

Die Patienten erhielten eine einmalige Gabe einer Dosis spenderspezifisch generierter TAIZ- Zellen nach co-Kultivierung mit Treg-Zellen des Empfängers. Während einer Laufzeit von 52 Wochen wurden Daten über das Transplantatüberleben bei schrittweiser Reduktion der Immunsuppression bis hin zu einem völligen Absetzen der immunsuppressiven Medikation gewonnen und ausgewertet. Mit dieser Studie sollten erste Ergebnisse über die Toleranzinduktion durch TAIZ- Zellen und ihrer Verträglichkeit erhoben werden. Schon ein möglicher Verzicht von Immunsuppressiva über einen Zeitraum von 6 Monaten sollte als Erfolg zu werten sein.

Regelmäßige klinische Kontrollen und Biopsien des transplantierten Organs vor dem Beginn eines neuen Studienabschnittes und im Verlauf wurden als Basisuntersuchungen ausgewertet und als Kriterium für das Fortschreiten oder Unterbrechen der Studie verwendet.

Der Beobachtungszeitraum wurde bei Unterbrechung der Studie, bis auf maximal 27 Monate ausgeweitet.

Um das Auftreten von Langzeitfolgen unter Immunsuppression nach Gabe von TAIZ–Zellen weiter beobachten zu können, werden die Patienten nach Beendigung der Studie in einem separaten Programm lebenslang weiterbetreut. („Follow-up“).

3.1.1. Ethikkommission

Das Studienprotokoll wurde den lokalen Ethikkommissionen aller beteiligten Studienzentren vorgelegt und genehmigt. Herstellung, Aufbewahrung und die Applikation der Studienmedikation erfolgte nach GMP – Standard unter Beachtung des des Arzneimittelgesetzes (AMG).

Die Durchführung der Studie erfolgte unter Beachtung aller Regeln des Transplantationsgesetzes (TPG).

Die Vorbereitung zur Nierenlebenspende erfolgte nach den Richtlinien des deutschen Transplantationsgesetzes (TPG). Vor dem Einschluß in die Studie mußte ein positives Votum zur Lebendnierenspende der zuständigen Ethikkommission vorliegen.

Der Nierenempfänger war gemäß der gesetzlichen Vorgaben während der Vorbereitungsphase bei Eurotransplant, Leiden, Holland, gelistet.

Die Patienten wurden ausführlich über die Studie und mögliche Risiken und Nebenwirkungen aufgeklärt, bevor Sie ihr schriftliches Einverständnis zur Teilnahme gaben. Insbesondere wurde darüber aufgeklärt, jederzeit und ohne Angabe von Gründen die Teilnahme an der Studie beenden zu können.

3.2. Patienten

Insgesamt konnten fünf Patienten für die beschriebene Untersuchung rekrutiert werden. Die Rekrutierung erfolgte an allen beteiligten Studienzentren nach den im Folgenden benannten Kriterien.

3.2.1. Einschlusskriterien

- Patienten beider Geschlechter: Lebensalter zwischen 18 und 65
- Keine vorherige Nierentransplantation
- Gelistet auf der Warteliste für Nierentransplantation

- Erfüllung der Voraussetzungen für die Lebendnierentransplantation (ET manual for organ allocation)
- Adäquater Spender musste zur Verfügung stehen
- Bei Patientinnen Nachweis zum Ausschluss einer bestehenden Schwangerschaft und ausreichender Konzeptionsschutz
- unauffällige haematologische Parameter in Hinblick auf absolute Lymphozyten und Monozyten Zahl
- Vorliegen eines schriftlichen Einverständnis zur Teilnahme an der Untersuchung

3.2.2. Ausschlusskriterien

- Patienten, die vorab schon einmal ein Nierentransplantat erhalten haben
- Aktive Infektionen, einschließlich HIV-, HBV-, HCV- Infektionen
- EBV oder CMV – Virusinkompatibilität des Spender- und Empfänger-Paares (Spender pos. / Empfänger neg.)
- Keine ausreichende Sprachkenntnis und mangelndes Einverständnis
- Psychische oder emotionale Instabilität
- Bekannte Ausschlusskriterien für Lebendnierentransplantation (Sepsis, Drogen- oder Alkoholmissbrauch)
- Schwangerschaft, stillende Mütter
- Gleichzeitige Teilnahme an anderen Studien
- Bekannte Medikamentenunverträglichkeit (gegen in der Studie verwendete Medikamente)
- Nachweis von HLA-Antikörpern > 5%
- Bestehende, nicht therapierte oder therapierbare Malignomkrankung
- Vaskulitis als Grunderkrankung der Niereninsuffizienz
- Patienten mit intermittierendem Gebrauch von Immunsuppressiva aufgrund anderer bestehender Grunderkrankungen

Zusätzlich galten für die Lebendnierspender gesonderte die von Eurotransplant formulierte Ausschlusskriterien.

Alle eingeschlossenen Patienten wurden in Hinblick auf Abstoßungsreaktionen und Transplantatakzeptanz durch das RISET-Netzwerk überwacht. Sie erhielten folgende Codierung:

1. CRG , KI/T03/P01
2. CFH , KI/T03/P02
3. WG , KI/T03/P04
4. AG , KI/T03/P05
5. FI , KI/T03/P08

Ein Patient (CK , KI/T03/P06) wurde nach Rekrutierung von der Untersuchung wegen einer aufgetretenen respiratorischen Insuffizienz vor TAIC- Gabe ausgeschlossen.

3.3. Untersuchungsziele

Bei dieser Untersuchung im Rahmen der Sicherheits Phase- I Studie „Zellspezifische Toleranzinduktion nach Nierentransplantation“ sollte die Auswirkung der Versuchsmedikation auf die Möglichkeit einer Reduktion der immunsuppressive Therapie nach Lebendnierentransplantation untersucht werden.

Dazu wurden folgende Ziele benannt:

Primäres Ziel:

Läßt sich eine Toleranzinduktion nach Gabe von allogenen und autologen Regulatorzellen (allogenen TAIC-Zellen und autologen T_{reg} – Zellen) anhand der Reduktion bis hin zum Absetzen einer immunsuppressiven Therapie verifizieren . Als Kriterien der Toleranzinduktion wurden Kreatinin_(Serum), Abstoßungsreaktionen und Wiederaufnahme der immunsuppressiven Therapie bestimmt.

Sekundäres Ziel:

Monitoring von Sicherheit und Verträglichkeit.

Dazu wurden Parameter wie Abstoßungsreaktionen, schwerwiegende unerwünschte Ereignisse (AE_s), akute Medikamentenunverträglichkeitsreaktionen (ADR), Laborergebnisse, Vitalparameter, körperliche Untersuchung, Körpergewicht, EKG, Urinausscheidung, CL_{CR}, Nierenbiopsien und Ultraschalluntersuchungen erhoben.

3.4. Studienprotokoll

Der durch das Protokoll vorgesehene Zeitplan wurde für jeden Patienten individuell angelegt. Wurde der Tag der Transplantation als Tag 0 im Protokoll verzeichnet, sind die Tage vor der Transplantation als negative Tage bezeichnet.

3.4.1. Rekrutierungsphase

Die Rekrutierungsphase für diese Untersuchung wurde über einen Zeitraum von 2 Jahren angesetzt. In diesem Zeitraum sollten alle 3 Studienzentren eine Zahl von max. 10 Patienten einschließen.

3.4.1.1. Abbruchkriterien

Patienten, die auf Grund der Ausschlußkriterien nach der Screeningphase und vor Applikation der Studienmedikation von der Untersuchung ausgeschlossen werden mußten, wurden als "Drop-out" bezeichnet.

Erfolgte der Abbruch nach Erhalt der Medikation wurde der Teilnehmer als "Withdrawal" in den Studienunterlagen geführt.

Unerwartete Ereignisse in Zusammenhang mit der Studienmedikation (Thromboembolien, Anaphylaktischer Schock oder Infektionen) führten zu einem sofortigen Abbruch der Studie.

Zudem konnte der Patient ohne Angaben von Gründen jederzeit aus freiem Willen die Studie beenden. In diesem Falle wurde der Patient auf die am jeweiligen Zentrum übliche immunsuppressive Therapie umgestellt.

3.4.2. Screeningphase (6M – Tag -16)

Die Screeningphase begann 6 Monate vor Studienbeginn. Im Rahmen des Pre-Screenings erfolgte nach Überprüfung der Ein- und Ausschlusskriterien der Einschluß in die Studie und Abgabe der schriftlichen Einverständniserklärung. Anhand der Pre-Screening MLC erfolgten zu diesem Zeitpunkt erstmals die Überprüfung des immunsuppressiven Effektes der spenderspezifischen TAIC-Zellen, sowie die Aktivierung der Treg Zellen des Empfängers.

Die eigentliche Screeningphase begann an Tag -16, bzw Tag -17 an den weiteren Zentren. Dabei erfolgte die vollständige medizinische Erfassung und klinische Untersuchung des Patienten.

3.4.3. Injektionsphase (Tag -5)

Die Verabreichung der Studienmediation erfolgte 5 Tage präoperativ durch intravenöse Injektion über einen zentralvenösen Zugang. Dabei erhielten die Teilnehmer die Studienmedikation gewichtsadaptierte von $1-10 \times 10^6$ TAIZ/kg x Körpergewicht (KG) in co-Kultur mit $2-30 \times 10^6$ autologen T-Lymphozyten/kg x KG, Der Anteil $CD4^+/CD25^+/CD45RO^+$ regulatorischer T-Zellen betrug dabei mehr als 25%. Somit wurde eine Gesamtdosis von $3 \times 10^6 - 40 \times 10^6$ Zellen injiziert (Tab.1). Zur Risikominimierung von Lungenembolien erhielten die Patienten präventiv niedrigdosiertes Heparin.

Die Applikation der Studienmedikation an alle Patienten erfolgte am Studienzentrum Kiel, am Universitätsklinikum Schleswig-Holstein (UK-SH).

3.4.4. Stationäre Phase

Nach dem postoperativen Aufenthalt erfolgte die stationäre Überwachung. Auf der Station wurde das Ausschleichen der immunsuppressiven Medikation überwacht. Nach dem Studienprotokoll erfolgte dies in den Wochen 10, 11 und 14, sowie von der 26. bis 29. Woche. Während des stationären Aufenthaltes wurden die Patienten mittels einer täglichen Visite betreut. Stationäre Behandlungen im Rahmen des Studienprotokolls wurden nicht im Sinne eines unerwünschten Ereignisses protokolliert.

3.4.5. Ambulante Phase

Während der Reduktionsphase erfolgte die Nachsorge in 2 wöchentlichen ambulanten Visiten. Lediglich mit Beginn der Reduktion der Immunsuppression in den Wochen 13 und 25 erfolgte die Kontrolle 3x wöchentlich.

In der "Follow-up" Periode ab Woche 30 erfolgte die Nachsorge einmal pro Woche. Für die Woche 52 wurde die Abschlusskontrolle angesetzt.

3.5. Reduktionsschema zum Immunprotokoll

Neben der Applikation der Studienmedikation erhielten die Patienten initial eine dreifache Immunsuppression, bestehend aus Tacrolimus (Zielspiegel 8-12 ng/ml), Antithymozytenglobulin (ATG) und Steroiden. ATG wird dabei lediglich an den Tagen 0, 1 und 2 verabreicht.

An Tag 56 wurde mit dem Ausschleichen der Steroide über einen Zeitraum von 14 Tagen begonnen, wenn folgende Kriterien erfüllt waren:

- 5% TAIC- und 10% Treg - Zellen
- Serum-Kreatinin < 2.0mg/dl
- Histologisch ausgeschlossene Abstoßungsreaktion (Banff – Kriterien)
- Klinisch und sonographisch unauffällige Transplantatfunktion

Dazu erhielten die Patienten in der 9. Woche 10mg/d und in der 10. Woche 5mg/d Prednisolon, bevor die Steroide vollständig abgesetzt wurden. Zeigte sich unter der Tacrolimus-Monotherapie bis zu Woche 13 keine Veränderung der Kreatinin-Clearance von mehr als 25% im Vergleich zu Tag 56 erfolgte im zweiten Schritt die Senkung des Tacrolimus-Talspiegels auf 5-8 ng/dl. Das schrittweise Ausschleichen des Tacrolimus begann ab Woche 25. Waren die oben genannten Kriterien erfüllt, wurde der Talspiegel zunächst unter den therapeutischen Spiegel von 4,1ng/dl gesenkt. Zeigte sich dabei keine Veränderung der Kreatinin-Clearance wurde die Dosis in Woche 25 und 26 halbiert, in der Woche 27 auf 3x / Woche und in Woche 28 auf 2x / Woche reduziert.

Im Falle einer Abstoßungsreaktion erfolgte die Umstellung auf das jeweilige immunsuppressive Regime des jeweiligen Zentrums.

3.6. Datenerhebung

Die Datenerhebung erfolgte an den jeweiligen im Protokoll festgeschriebenen Visiten sowie zum Studien-Ein- und Ausschluss. Neben dem klinischen Verlauf und der Bestimmung der haematologischen Parameter wurden folgende Diagnostik zur Datengewinnung durchgeführt.

3.6.1. Nierenbiopsie

Zur histologischen Überprüfung der Organfunktion und des Transplantatzustands während des Studienverlaufes erfolgte zu festgelegten Zeitpunkten eine Nierenbiopsie der transplantierten Niere. Dazu wurde eine erste Biopsie intraoperativ vor Reperfusion der Spenderniere durchgeführt, weitere Biopsien fanden planmäßig an Tag 56 vor dem Beginn der Reduktion der immunsuppressiven Therapie, sowie in der 24. und 52. Woche zum Abschlusscreening statt.

Bei Auftreten oder dem Verdacht auf eine akute Abstoßungsreaktion wurden, wie durch das Protokoll vorgeschrieben, zusätzliche Biopsien des Transplantates entnommen.

Die Biopsien wurden verblindet durch ein unabhängiges Labor des pathologischen Institutes der Universität Basel, unter der Leitung von Prof. Dr. M. Mihatsch untersucht und ausgewertet. Dabei wurden die Proben mit einem Code versehen und anonymisiert untersucht.

3.6.2. Durchflusszytometrie

Nach dem Ernten der TAIZ aus den Zellkulturflaschen wurden die Zellen zweimalig mit eiskaltem färbendem Puffer (DPBS mit 10% BSA und 0.02%NaN₃) gewaschen und anschließend mit 10% FcR Block für 30 Minuten auf Eis mit einer Zelldichte von 10⁷ Zellen/ml geblockt. Anschließend wurden den Zellen, bei einer entgeltigen Konzentration von 1µg/10⁶ Zellen, direkt bindende primäre Antikörper beigefügt. Dabei wurden folgende Antikörper verwendet: CD14, CD13, HLA-DR, CD 80, CD86, GM-7 und 7-AAD.

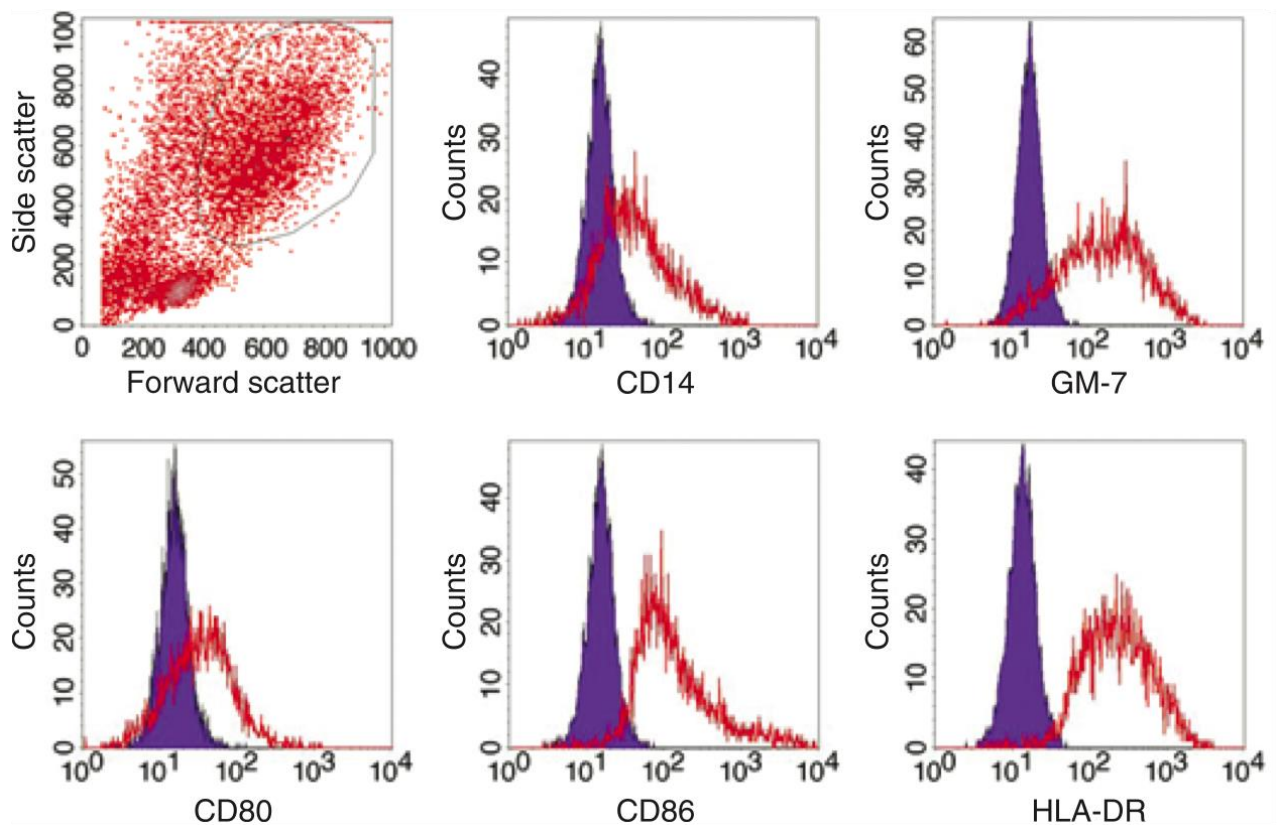


Abb. 3: Representative phenotypische Durchflusszytometrie der applizierten Studienmediation von Patient CFH

Bei GM-7 handelt es sich um einen unvollständig charakterisierten TAIZ-spezifischen Antikörper, der im Kieler hergestellt wird (Heumann A et al 2000). Der 7-AAD Marker wurde zur farblichen Markierung abgestorbener Zellen verwendet.

3.6.3. Antikörperscreening

Das Screening der Patienten erfolgte prä- und postoperativ zum Nachweis HLA-spezifischer Antikörper mittels dem Nachweisverfahren nach ELISA und dem Zytotoxizitätstest (CDC Assay).

Die Differenzierung zwischen IgG- und IgM- Antikörpern erfolgte anhand der Anwendung des Dithiothreitol (DTT)-Sensitivitätstest und dem Immnglobulin-G (IgG)-spezifischen ELISA.

3.6.4. MLC- MCA

Die gemischte Lymphozytenkultur mit multiplem Zytokin Assay ist ein in vitro Modell. Es wird in der Transplantationsmedizin zur Bestimmung eines Aktivitätsindex durch Messung fremder MHC-Genprodukte, wie IL-2 und INF- γ , von Spenderlymphozyten durch Reaktion mit Empfängerleukozyten angewandt. Dazu wird eine Lymphozytensuspension aus Empfänger - PBMC (10^5 Zellen/Probe) und Spender - PBMC (10^5 Zellen/ Probe) in dreifacher Ausführung auf "U-Bottom"-Tablets angelegt. Nach einer Inkubation von 5 Tagen bei 37° C und 5% CO₂ werden 100 μ l des Überstandes entnommen und in Silikon-beschichtete Eppendorf-Röhrchen überführt. Die Lagerung erfolgt bei -70° C.

Vor dem Proliferations-Assay wird der Lymphozytensuspension ³H-Thymidin hinzugegeben und die Zellen nach 16 Stunden geerntet. Thymidin ist ein Nukleotid, welches in die neusynthetisierte DNS eingebaut wird und folgedessen im Sinne eines Proliferationsindex gemessen werden kann. Dabei werden die Filter mit einem β -Szintillationszähler ausgewertet. Die Bestimmung der Zytokin-Konzentration erfolgte mit dem Luminex Zytokin-Assay, dazu wird das Bio-Plex Human Th1/Th2 Kit verwendet.

Die Ergebnisse der Reaktivität in der gemischten Lymphozytenkultur werden mit der Zytokinaktivität gegenüber einem neutralen (autologen) Medium und einem unspezifischen dritten (stimulierten) Medium verglichen. Anhand des Verhältnisses der stimulierten Reaktion zum neutralen Medium kann ein Stimulationsindex erstellt werden.

3.6.5. Kryokonservierung

Zu unterschiedlichen Zeitpunkten der Zellherstellung und der FACS- Analysen wurden Proben als Rückstellmuster kryokonserviert.

Kryomedium: 45 ml Humanes AB Serum
 5 ml DMSO

Zur Kryokonservierung von Rückstellmustern wurde das vorgekühlte Kryomedium unter langsamer Bewegung auf das Zellpellet gegeben und vermischt. Die Kryotube wird zunächst bei -80 °C für 24 h zwischengelagert und anschließend in flüssigem Stickstoff konserviert.

Während der Studie wurden Rückstellmuster an den Tagen 0 und 56, sowie in den Wochen 12,18 und 28 gewonnen.

3.7. Versuchsmedikation

Die unter der pharmazeutischen Formulierung „Transplantat-Akzeptanz induzierende Zellen (TAIZ) mit co-Kultivierung regularischer T- Zellen (Treg-Zellen)“ erprobte Versuchsmedikation ist ein Zellgemisch aus empfängereigenen autologen regulatorischen T-Zellen und spenderspezifischen allogenen TAIZ- Zellen.

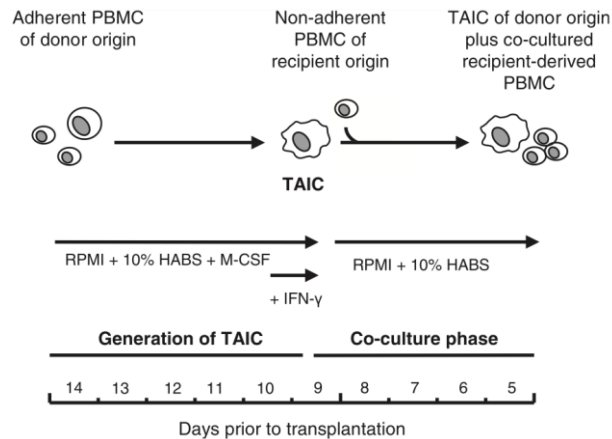


Abb. 4: Schematische Darstellung der TAIC Herstellung nach GMP-Bedingungen

Alle ex vivo durchgeführten Zellmodifikationen wurden anhand der GMP- Richtlinien in den Laboratorien des Institutes für Hämatologie am UK S-H durchgeführt. Zur Qualitätssicherung wurde dabei die Präparation und Handhabung der Zellen im Rahmen der „Single-Hand“- Methode durch einen Mitarbeiter des UK S-H, Campus Kiel unter sterilen Bedingungen durchgeführt.

Alle verwendeten Materialien sind im Herstellerverzeichnis im Anhang gelistet.

3.7.1. Gewinnung allogener TAIZ- Zellen

Zur Herstellung der TAIZ- Zellen sind die Organspender 14 Tage vor der geplanten Operation einer Leukapherese unterzogen worden. Das dabei gewonnene Vollblut wurde umgehend in einer frisch hergestellten Normosol/Natrium-Zitrat Präparierlösung in einem Verhältnis von 1: 6 verdünnt.

3.7.1.1. „Buffy- Coat“- Präparation

Als Buffy- Coat wird ein Lymphozytenkonzentrat bezeichnet, welches man nach dem Abzentrifugieren aus Vollblut enthält. Mittels Dichtegradientenzentrifugation über

ein Ficoll- Separationsmedium (spez. Dichte 1.077 g/ml) lassen sich die mononuklearen Zellen des peripheren Blutes (PBMC) isolieren.

Präparierlösung: 1000 ml Normosol
 140 ml 4% Na- Citrat

Anschließend wurden 15 ml des Ficoll- Separationsmediums in ein 50 ml Falcon[®]- Röhrrchen gefüllt und von einer Schicht aus 20 ml des verdünnten Leukapherese- Produktes überschichtet. Nach 20 minütiger Zentrifugation mit 400 G konnten die PBMCs durch Ansammlung, anhand der unterschiedlichen spez. Dichten, in der Interphase zwischen dem Überstand (Plasma / Thrombozyten) und dem Ficoll- Separationsmedium von den übrigen Bestandteilen des Leukapherese- Produktes abpipettiert werden.

Die dabei gewonnenen isolierten mononukleären Zellen wurden erneut in 50 ml Falcon[®]- Röhrrchen suspendiert, mit der Präparierlösung aufgefüllt und bei 300 G und Bremse für 6 min zentrifugiert. Anschließend wurde das Zellpellet zwei weitere Male mit der Präparationslösung gewaschen und bei jeweils 200 G mit Bremse für 6 min zentrifugiert.

Das gereinigte Zellpellet wurde in ein weiteres 50 ml Falcon[®]- Röhrrchen resuspendiert und mit dem TAIZ- Inkubationsmedium vermengt.

Zur Prozesskontrolle wurde anschließend unter einer Neubauer- Zählkammer eine erste Zellzählung zur Bestimmung der Zellzahl und Zellaktivität durchgeführt und einige Proben für mikrobiologische Screeninguntersuchungen (z.B. Sterilprüfung) entnommen.

3.7.1.2. TAIZ- Inkubationsmedien

Zum Herstellung der TAIZ- Inkubationsmedien wurden zunächst folgende Lösungen angesetzt und kühl gelagert.

Grundmedium : 500 ml RPMI- 1640 ohne Glutamin und Phenol Red
 5 ml L-Glutamine/Penicillin/Streptomycin-Lösung
 50 ml 10% Hitze- inaktiviertes humanes AB Serum

Das Grundmedium basiert auf einer RPMI- 1640 Lösung ohne Glutamin und Phenol Red. Dazu wurden 50 ml der 500 ml Flasche verworfen und mit 5 ml einer Lösung aus 2mM L-Glutamine, 100 U/ml Penicillin, 100 µg/ml Streptomycin und 10% Hitze- inaktiviertes humanes AB Serum versetzen.

M-CSF Stocklösung : 100 µg rhM- CSF
20 ml RPMI
100 µl 20% HSA Lösung

100 µg der rhM- CSF Trockensubstanz zunächst in 20ml RPMI lösen, anschließend 100 µl einer 20 % HSA Lösung hinzupipettieren. Die somit erhaltene Stocklösung von 5µg/ml rhM- CSF in RPMI entspricht $7,5 \times 10^5$ IU/ml, 0,1 % HSA. Die Stocklösung wird in Mengen von je 550 µl aliquotiert und bei -80 °C eingefroren.

INF- γ Aliquots : 500 µl rh- IFN- γ (Imukin®)
500 ml M- CSF Stocklösung auf 62,5 µl IFN- γ

Zur Herstellung der IFN- γ Aliquots wurden 500 µl (entsprechen 2×10^6 IU, 100 µg) IFN- γ zu jeweils 70 µl Portionen aliquotiert und kühl gelagert. Bei Bedarf wurden 62,5 µl in 500 ml Stocklösung gegeben, um eine Endkonzentration von 25 ng/ml (entsprechen 500 IU/ml) zu erreichen.

Die Inkubationsmedien für die allogenen Monozyten zur Generierung der TAIZ-Zellen wurden erst kurz vor der Verarbeitung angesetzt.

TAIZ- Inkubationsmedium I : 1-2 Fl. Grundmedium
500 µl M- CSF Stocklösung pro Fl.

Zur Herstellung des Inkubationsmedium I das Grundmedium mit der aufgetauten Stocklösung vermischen und für 30 min bei 37 °C aufwärmen.

TAIZ- Inkubationsmedium II : 1-2 Fl. Grundmedium
IFN- γ Alliquots

Zur Herstellung des Inkubationsmedium II IFN- γ Alliquot in das Grundmedium pipettieren und vermengen. Anschließend für 30 min bei 37 °C erwärmen.

Alle angebrochenen Medien wurden nach ihrem Gebrauch verworfen und bei erneutem Gebrauch neu angesetzt.

3.7.1.3. TAIZ- Generierung

Zur weiteren Verarbeitung der isolierten PBMCs erfolgte zunächst die Verdünnung der Zellsuspension so weit mit dem Inkubationsmedium I (s.o.), das man eine Lösung mit 5×10^7 lebens- und entwicklungsfähigen Zellen/ml Inkubationsmedium I erhielt.

Vor der Weiterkultivierung wurden eine weitere Probe von $2,5 \times 10^7$ Zellen zur Prozesskontrolle (Produktüberprüfung und FACS- Analyse) entnommen.

Anschließend wurde die verdünnte Zellsuspension zu je 30 ml auf die dafür bereitstehenden T 175 „Cell+“- beschichtete Gewebekulturflaschen verteilt. Somit enthielt jede Kulturflasche eine äquivalente Zellzahl von $1,5 \times 10^9$ Zellen. Übernachten inkubierten die Zellen bei 37 °C und 5% CO₂ für mind. 10 h und höchstens 20 h. Am folgenden Tag wurden 20 ml des Überstands mit dem lockeren Zellanteil, nach vorsichtigem Schwenken der Kulturflaschen, abpipettiert, in eine neue T 175 Kulturflasche überführt und mit weiteren 10 ml Inkubationsmedium I aufgefüllt. Zur leerpipettierte Flasche wurde ebenfalls wieder 20 ml frisches Inkubationsmedium I hinzugegeben. Für weitere 24 h kamen die Kulturmedien waagrecht liegend zurück in den Inkubator (37 °C, 5% CO₂). An Tag -12 (präoperativ), zweiter Tag des Generierungsprozesses, wurde nach erneutem Schwenken der Kulturmedien, der gesamte Überstand abpipettiert und samt Überstandszellen verworfen. Die Kulturflaschen mit den in sich befindenden adhären Zellen wurden ein weiteres Mal mit frisch angesetztem Inkubationsmedium I versetzt und für weitere 48 h im Inkubator gelagert.

An Tag -10, der 4. Tag des Inkubationsprozesses, wurden die TAIZ- Medien für 24h mit rh- INF- γ inkubiert. Dazu fand ein kompletter Austausch des Kulturmediums statt. Der gesamte Überstand wurde abgesaugt und verworfen und dafür mit 30 ml des TAIC- Inkubationsmedium II (s.o.) ersetzt.

3.7.2. Gewinnung autologer regulatorischer T- Zellen

Die Empfängerleukapherese zur Gewinnung der autologen Lymphozyten wurde 5 Tage nach der Spenderleukapherese durchgeführt. Nach dem Auffangen des Leukaphereseprodukts in einem Blutbeutel, wurde dieses nach der gleichen Methode wie bei der Spenderleukapherese aufgearbeitet. Anschließend mit dem Grundmedium zu einer Zellsuspension mit der Konzentration von 2×10^7 Zellen/ml verdünnt, wurden 6×10^8 der isolierten PBMCs mit 30 ml des Grundmediums auf T 175 Kulturflaschen verteilt und für genau eine Stunde bei 37°C und 5% CO_2 inkubiert. Nach dieser einstündigen Adhärenz konnten die Lymphozyten von den Monozyten voneinander separiert werden, wobei die Lymphozyten als lose Überstandszellen im Überstand entnommen, in Grundmedium gewaschen und anschließend bei 200 G für 10 min zentrifugiert werden konnten. Die adhärennten Monozyten wurden verworfen. Das dabei erhaltende Monozyten- arme Zellpellet wurde nun mit dem Grundmedium zu einer Zellsuspension mit der Dichte von 2×10^7 Zellen/ml vermengt.

3.7.3. Co- Kultivierung

Nach der Inkubation der spenderspezifischen PBMCs im TAIC- Inkubationsmedium II konnte der gesamte Überstand, inklusive der sich darin befindenden nicht-adhärennten Zellen entsorgt werden. Zur co- Kultivierung wurde das Medium für die allogenen, adhärennten TAIZ- Zellkulturen gegen 30 ml der vom Empfänger stammenden nicht-adhärennten Lymphozytenkultur ausgetauscht. Für weitere 4 Tage bis zur Injektion wurden beide Zelllinien co- kultiviert und an Tag -7 nur noch ein letztes Mal mit 20 ml Grundmedium aufgefrischt.

3.7.4. Zellernte

Um die Zellsuspension für die Injektion vorzubereiten, erfolgte im nächsten Schritt zunächst die Zellernte und Aufbereitung. Dazu wurden die Kulturflaschen nach leichtem Schwenken, um die sich abgelagerten nicht- adhärenen Zellen aus der adhärenen Zellschicht zu befreien, vom Überstand befreit und in 50 ml Falcon®-Röhrchen übertragen. Nachdem der Zellenrasen vom Flaschenboden mit Hilfe eines flexiblen Zellschabers gelöst und in 10 ml DPBS aufgemischt worden war, wurde das Zellgemisch ebenfalls in ein 50 ml Zentrifugenröhrchen umgefüllt. Diese wurden daraufhin bei 200 G für 6 min und 37 °C zentrifugiert, der dabei resultierte Überstand wurde abpipettiert und verworfen. Die übriggebliebenen Zellpellets wurden dann gemeinsam in 40 ml 5% HSA- Lösung bei 4 °C gepoolt und resuspendiert. Anschließend können sie für 48h gelagert werden ohne ihre tolerogene Wirkung zu verlieren.

Einige Proben wurden für mikrobiologische Untersuchungen und weitere Qualitätskontrollen entnommen.

4. Ergebnisse

4.1. Rekrutierung und Behandlung der Studienteilnehmer

In dem gesamten Rekrutierungszeitraum der Studie wurden acht Paare, bestehend aus Patient (Empfänger) und Lebendspender für diese Studie als kompatibel ausgewählt, von denen 6 Patienten entgeltlich in die Studie eingeschlossen werden konnten. 5 von 6 Studienteilnehmern erhielten die Behandlung mit der Studienmedikation (Tab. 1 und 2).

Alle Patienten erhielten an Tag -5 die TAIZ Studiendosis (Tab. I). Die Applikation der Studienmedikation wurde von allen Patienten gut vertragen. Während der Applikation der Studienmedikation und über den gesamten Zeitraum der Untersuchungen wurden keine akuten oder verzögerten Reaktionen im Sinne einer unerwünschten Reaktion beschrieben.

Keiner der Patienten musste nach Applikation der Studienmedikation aus der Studie ausgeschlossen werden (kein Withdrawal).

Die 6. Studienteilnehmerin KI/T03/P06, Frau CK, erkrankte nach der Spenderleukapherese vor Gabe der TAIC-Injektion an einer Lungeninfektion und wurde von der Untersuchung ausgeschlossen (Drop-Out).

Patient	Age	Body weight (kg)	Sex	Disease	Donor age	Donor BW (kg)	Donor	Cell-dose (vital cells/kg BW $\times 10^7$)
CRG	42	80	Male	IgA nephritis	40	100	Brother	1.74
CFH	39	57	Female	Glomerulonephritis	38	84	Husband	10.39
WG	48	83	Male	Polycystic kidney disease	38	98	Brother	3.95
AG	59	77	Male	Glomerulonephritis	24	60	Daughter	1.82
CK	37	95	Female	Polycystic kidney disease	36	118	Husband	2.08
FI	48	94	Male	Polycystic kidney disease	40	56	Wife	2.54

Tab. 4: Charakteristika der Spender/Empfänger und empfängerspezifische Studienmedikationsdosis.

Patient	HLA type	Blood group	Crossmatch
CRG	A2, 68; B27, 53; DR13, 15	0 RhD ⁺	Negative
Donor	A2, 68; B27, 53; DR13, 15	0 RhD ⁺	
CFH	A2, –; B7, 44; DR12, 15	A RhD ⁻	Negative
Donor	A11, 25; B18, 44; DR7, 11	0 RhD ⁻	
WG	A2, 68; B8, 35; DR3, 7	B RhD ⁺	Negative
Donor	A1, 68; B8, 35; DR3, 7	B RhD ⁺	
AG	A3, 26; B7, 57; DR7, 11	A RhD ⁺	Negative
Donor	A2, 26; B44, 57; DR4, 7	A RhD ⁺	
CK	A2, 3; B51, –; DR11, 8	A RhD ⁺	Negative
Donor	A2, –; B39, 58; DR1, 3	A RhD ⁺	
FI	A31, 32; B60, 44; DR3, 15	A RhD ⁺	Negative
Donor	A1, 3; B7, 8; DR3, 15	A RhD ⁺	

Tab. 5: HLA-Übereinstimmungen, Blutgruppen und Crossmatches der Studienpaare.

4.2. Ergebnisse der einzelnen Studienteilnehmer

4.2.1. Studienpatient CRG KI/T03/P01

4.2.1.1. Patienteninformation

Bei dem Patienten CRG handelte es sich um einen 42jährigen Mann mit einem chronischen Nierenversagen auf dem Boden einer IgA Nephropathie. Der Patient wurde unter der Nummer KI/T03/P01 in die Studie eingeschlossen.

Das Spenderorgan erhielt der Patient von seinem Bruder. Bei der HLA-Gewebetypisierung zeigte sich eine vollständige Übereinstimmung der Antigene (Full House match).

4.2.1.2. Studienverlauf

Wie im Protokoll vorgesehen, erhielt der Patient an Tag -5 vor Transplantation die vom Spender abgeleiteten TAIZ-Zellen. Die Nierentransplantation konnte wie geplant am Tag 0 durchgeführt werden. Ohne intraoperative Komplikationen zeigte

sich postoperativ eine gute Organfunktion. Der stationäre Verlauf verlief ohne Zwischenfälle und somit wurde der Patient nach Protokoll ambulant weiter betreut.

Bei stabiler Transplantatfunktion wurde nach 8 Wochen mit der Reduktion der Steroidtherapie begonnen. Bei stetiger Reduktion der Steroide, konnten in der 10. Woche die Behandlung mit Steroiden vollständig abgesetzt und der Patient mit einer Monotherapie Tacrolimus mit Serumspiegel um die 8-10 ng/ml geführt werden.

In der 10. Woche zeigten sich bei dem Patienten keine klinischen Hinweise für eine Abstoßungsreaktion, woraufhin in dem Zeitraum zwischen der 10. und 24. Woche die immunsuppressive Dosis des Tacrolimus gleichmäßig auf einen Spiegel von 4-8 ng/ml gesenkt wurde.

In der 24. Woche zeigte sich eine stabile Transplantatfunktion, die zweite Transplantatbiopsie wies ebenfalls keine Zeichen einer Abstoßungsreaktion auf. Nach Vorgabe des Protokolls wurde ab der 25. Woche die Tacrolimusdosis auf Serum-Talspiegel von kleiner 4 ng/ml gesenkt. Bei unauffälliger Transplantatfunktion wurde dieses Regime bis zur 43. Woche fortgesetzt, bevor die immunsuppressive Therapie vollständig ausgeschlichen werden konnte.

Das vollständige Absetzen der Immunsuppression wurde von dem Patienten ohne Zwischenfälle toleriert und die Transplantatfunktion verlief über die nächsten 8 Monate (Woche 44 – 76) stabil, ohne Hinweise für eine akute Abstoßungsreaktion.

Bei klinisch unauffälligem Verlauf wurde in Woche 50 eine Routinebiopsie des Transplantates entnommen. Diese wies eine deutliche fokale interstitielle zelluläre Infiltration mit unregelmäßiger positiver HLA-DR Färbung des Tubulusepithels auf. Diese histologischen Veränderungen ergaben noch keine eindeutige Hinweise für eine akute Abstoßungsphase, zudem zu diesem Zeitpunkt kein klinischer Verdacht für eine Abstoßungsreaktion bestand. Ähnliche histopathologische Veränderungen wurden bereits bei Nierentransplantationen in Zusammenhang mit einer Langzeit-Monotherapie mit niedrigdosiertem Tacrolimus beschrieben. Dabei wurde gezeigt, dass diese Veränderungen nicht zwangsläufig mit einer Transplantatverschlechterung einhergehen (Hutchinson et al 2008, Starzl et al 2003).

Die Kontrollbiopsien, welche 25 und 65 Tage später dem Transplantat entnommen wurden, wiesen die gleichen Veränderungen auf. Auf Grund des stabilen klinischen

Verlaufes wurde daher beschlossen die immunsuppressive Therapie nicht wieder zu beginnen, sondern den den weiteren Verlauf engmaschig zu überwachen.

In der 61 Woche wurde ein MLC / MCA – Vergleichstest des Empfängers zu einer dritten Person mit einem vollständigen HLA – Mismatch durchgeführt. Dabei zeigte sich keine messbare Reaktion gegen die Zellen des Spenders, sowohl in Bezug auf den T-Zell Proliferation als auch die Sekretion von Interleukin – 2 (IL- 2) und IFN- γ , jedoch gegen die der dritten Person.

In der 77. Woche kam es bei dem Patienten CRG zu einer akuten Abstoßungsreaktion. Diese konnte erfolgreich mit einer Kortisonstoßtherapie und der Wiederaufnahme der Tacrolimus – Monotherapie behandelt werden. Darunter kam es zu einer Normalisierung der Transplantatfunktion.

Zum Abschluss der Untersuchungen war Herr CRG auf einen Tacrolimus Serumtalspiegel zwischen 6 und 8 ng/ml eingestellt, worunter sich eine stabile Transplantatfunktion zeigte.

HLA- spezifische Antikörper konnten zu keinem Zeitpunkt der Untersuchungen nachgewiesen werden.

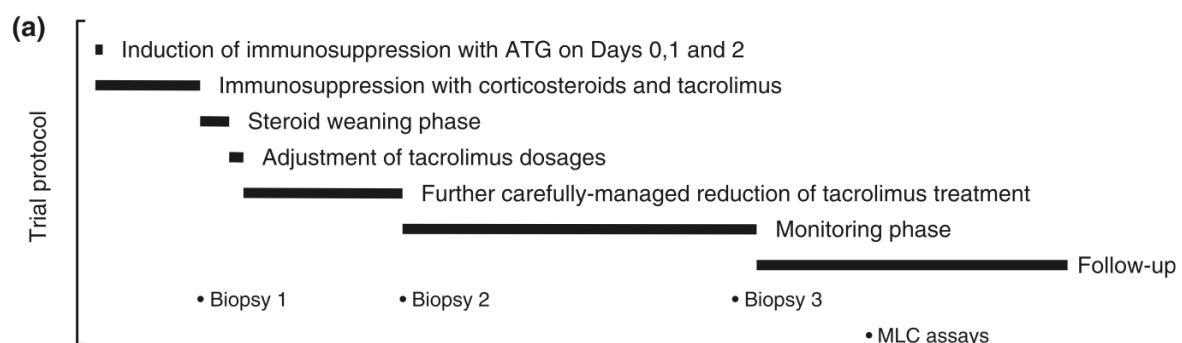


Abb. 5: Reduktionsschema der Immunsuppression bei Pat. CRG.

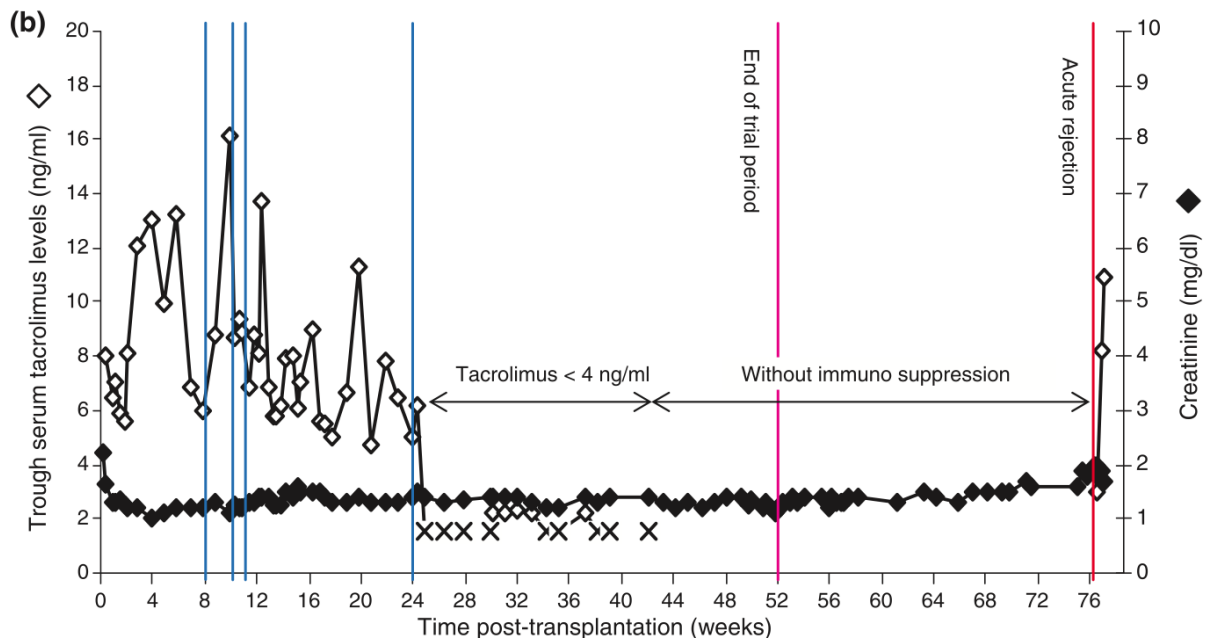


Abb. 6: Übersicht Kreatininspiegel vs Immunsuppression bei Pat. CRG.

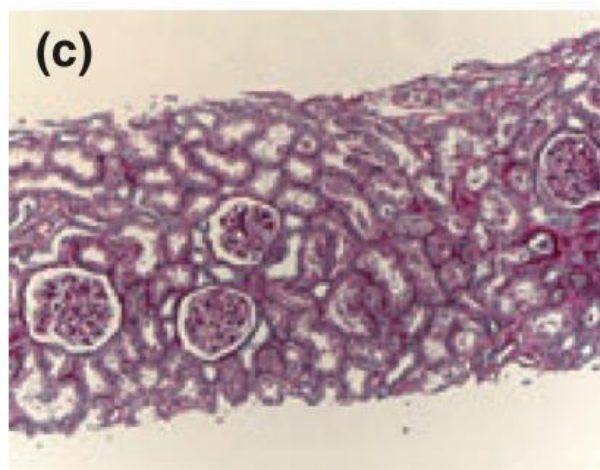


Abb. 7: Nierenbiopsie, PAS gefärbt, von Pat CRG in der 24 Woche ohne Nachweis einer Abstoßungsreaktion, 100fach vergrößert.

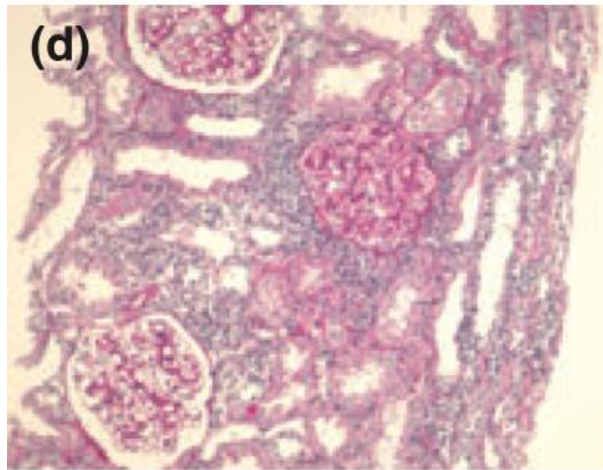


Abb. 8: Nierenbiopsie, Woche 50, von Patient CRG mit dem histologischen Nachweis der Akkumulation von Lymphozyteninfiltraten, 100fach vergrößert.

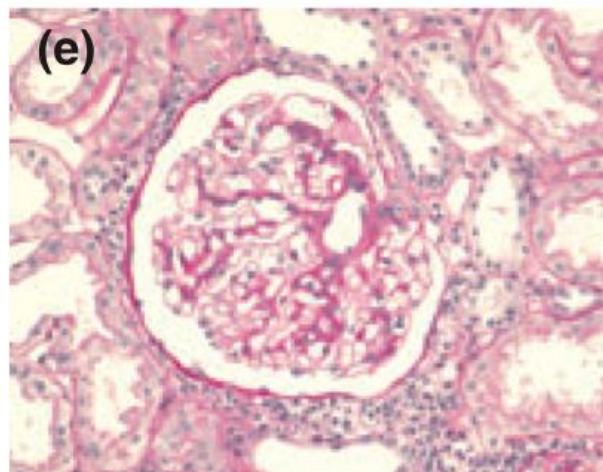


Abb. 9: Nierenbiopsie, Woche 50, von Patient CRG mit dem histologischen Nachweis der Akkumulation von Lymphozyteninfiltraten, 200fach vergrößert.

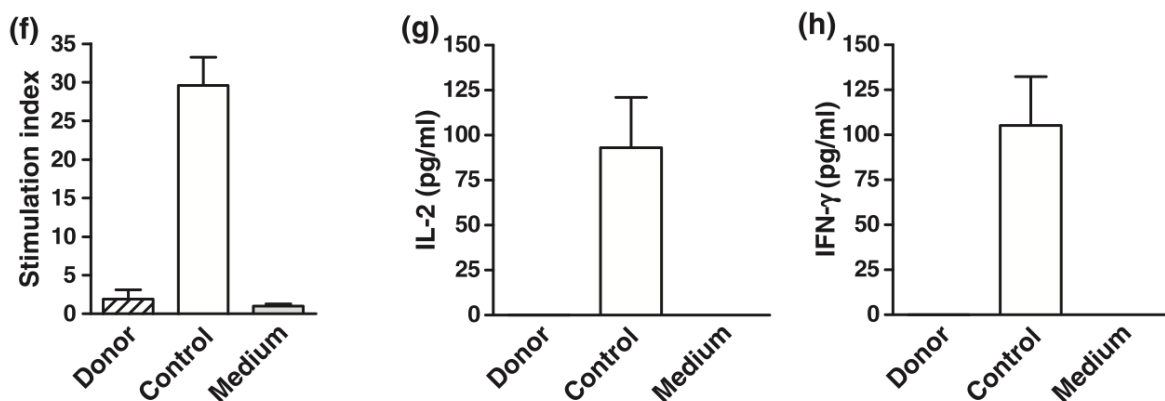


Abb. 10: Spezifisches Anti-Spender Reaktions Bestimmung bei Patient CRG mittels MLC, Woche 60, anhand des Proliferationsindex (f), der IL- 2 Sekretion (g) und der IFN- γ Produktion. Der Vergleich erfolgte gegen ein Full-Mismatch und ein neutrales Medium als Kontrollgruppen.

4.2.2. Studienpatient CFH KI/T03/P02

4.2.2.1. Patienteninformationen

Bei der Patientin Frau CFH handelte es sich um eine 39 jährige Frau mit terminaler Niereninsuffizienz auf dem Boden einer Glomerulonephritis (Tab 1). Die Patientin wurde unter der Nummer KI/T03/P02 in die Studie eingeschlossen.

Die Lebendnierenspende erfolgte durch den Ehemann. Bei der HLA-Gewebetypisierung zeigte sich ein Missmatch von 5 aus 6 HL-Antigenen (Tab. 2).

4.2.2.2. Studienverlauf

Wie im Protokoll vorgesehen, erhielt die Patientin an Tag -5 vor Transplantation die vom Spender abgeleiteten TAIZ-Zellen. Die Operation konnte wie geplant an Tag 0 durchgeführt werden. Ohne intraoperative Komplikationen zeigte sich postoperativ eine gute Organfunktion. Bereits intraoperativ kam es nach Reperfusion zu Funktionsaufnahme des Transplantates. Die Ausscheidung des Transplantates war von Anfang an stabil, so dass es bereits in der ersten Woche zu einer Normalisierung des Serum-Kreatinins im Blut der Patientin kam.

Die ambulante Nachbehandlung zeigte einen weiteren unauffälligen Verlauf, so dass die Kortikosteroide zwischen der 8. und 10. Wochen vollständig ausgeschlichen und der Talspiegel für das Tacrolimus auf ein Serumspiegel um die 6-12 ng/ml angepasst werden konnten.

Bei subjektivem Wohlbefinden und konstanter Transplantatfunktion konnte im Verlauf der Tacrolimus Talspiegel bis auf < 4 ng/ml bis zur 26. Woche reduziert werden und bis zur 29. Woche an einen Talspiegel zwischen 2 – 4 nd/ml angepasst werden.

Für die nächsten 6 ½ Wochen in der Phase der reduzierten Monotherapie mit Tacrolimus zeigte sich der klinische Status der Patientin unverändert. Die Nierenfunktionsparameter waren dabei jederzeit im Normbereich, das Serum-Kreatinin um die 0,7- 1 ,1 mg/dl stabil.

Auf Grund des eigenmächtigen plötzlichen Absetzens der gesamten Immunsuppression durch den Patienten kam es im weiteren Verlauf nach 10 Tagen zu einer histologisch gesicherten akuten zellulären Abstoßungsreaktion.

Die Immunsuppression mit Tacrolimus wurde sofort wieder begonnen und die Abstoßungsreaktion mittels Kortisonstoßtherapie erfolgreich behandelt. Die Monotherapie (Tacrolimus 2,5 mg OM, 2 mg ON) wurde im Anschluß bis zum Ende des Beobachtungszeitraumes fortgeführt, worunter sich das Serumkreatinin um die 0,9 mg/dl stabilisierte.

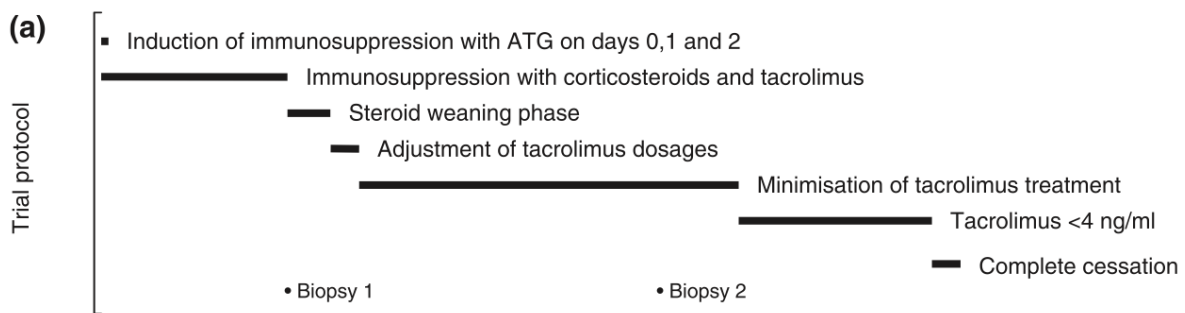


Abb. 11: Reduktionschema der Immunsuppression bei Patientin CFH

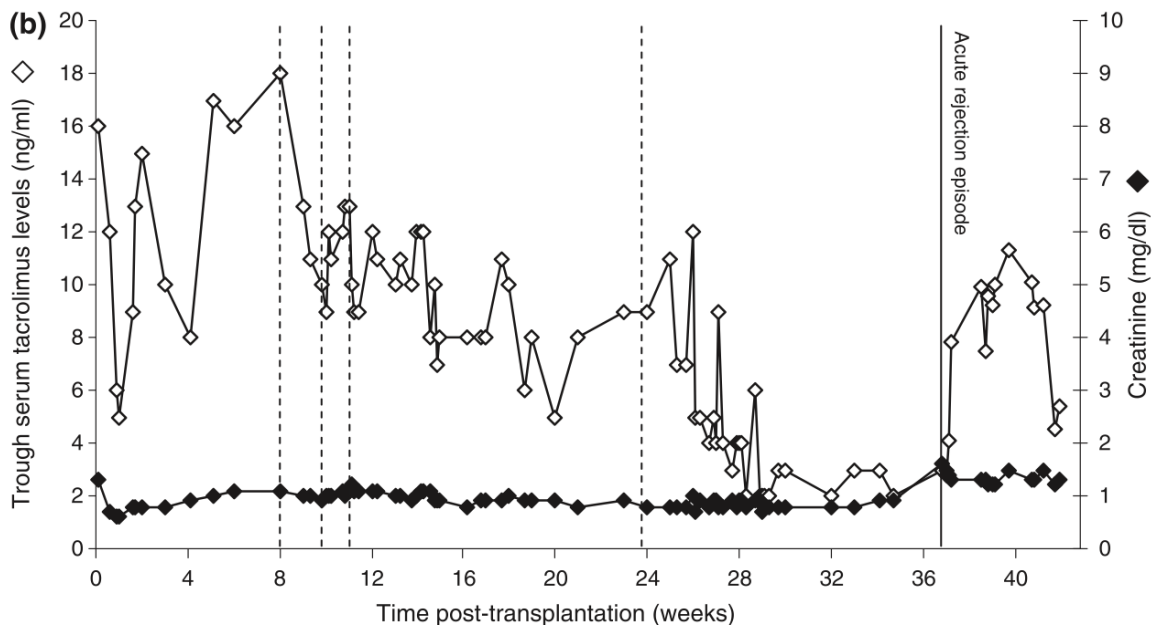


Abb. 12: Tacrolims-Talspiegel im Vergleich zum Kreatininspiegel bei Patientin CFH

Während des Beobachtungszeitraumes konnte zu keinem Zeitpunkt mittels ELISA oder CDC-Assay ein Nachweis von HLA-Antikörpern erzielt werden.

4.2.3. Studienpatient WG KI/T03/P04

4.2.3.1. Patienteninformation

Bei dem Patienten WG handelt es sich um einen 48-jährigen Mann mit einer dialysepflichtigen Niereninsuffizienz auf dem Boden einer polyzystischen Nierenerkrankung. Der Patient wurde unter der Nummer KI/T03/P04 in die Studie eingeschlossen.

Die Lebendnierenspende erfolgte durch den Bruder. Bei der HLA-Gewebetypisierung zeigte sich ein Klasse - I - Antigen Mismatch.

4.2.3.2. Studienverlauf

Die präoperative Vorbereitung konnte gemäß dem Studienprotokoll durchgeführt werden. Am Tag -5 erhielt der Patient eine Dosis an generierten vitalen TAIC/Treg-Zellen von $3,95 / \text{kg KG} \times 10^7$. Die Infusion der allogenen TAIC-Zellen, sowie die Transplantation erfolgten ohne Zwischenfall. Es zeigte sich von Anfang an eine adäquate und stabile Transplantfunktion. Die immunsuppressive Therapie wurde nach Protokoll begonnen und gut toleriert.

Wie im Studienprotokoll beschrieben erfolgte in der 8. postoperativen Woche vor dem Absetzen der Steroide und der Reduktion des Calcineurin-Inhibitors die erste postoperative Transplantatbiopsie. Die Retentionsparameter waren dabei bei normaler Diurese jederzeit im Bereich um die 1,0 bis 1,5 ng/ml. Anhand der Biopsie konnte ein histologischer Nachweis für eine subklinische Abstoßungsreaktion ausgeschlossen werden.

Entsprechend dem Protokoll erfolgten über einen Zeitraum von ca. einer Woche das Ausschleichen der Kortikosteroide und die Anpassung der täglichen Tacrolimusdosis.

Unter stabilen Nierenfunktionsparametern erfolgte im Verlauf über einen Zeitraum von 3 Monaten ein kontinuierliches Absenken des Tacrolimus-Talspiegels auf unter 4 ng/ml.

Innerhalb der gesamten Phase der Reduktion des immunsuppressiven Protokolls zeigte sich sowohl klinisch als auch laborchemisch zu jeder Zeit eine unauffällige Transplantatfunktion, so dass zu keinem Zeitpunkt der Hinweis auf eine mögliche Abstoßungsreaktion vorlag.

9 Wochen nach dem Erreichen eines Talspiegels von < 2 ng/ml unter Tacrolimusmonotherapie entwickelte sich eine akute Abstoßungsreaktion, einhergehend mit dem Anstieg der Retentionsparameter, sowie einer eingeschränkten Diurese. Auf Grund einer steroid-resistenten Abstoßungsreaktion erfolgte die Ausweitung der Rescue-Therapie mit ATG, Rituximab und Plasmapherese.

Nach Wiederherstellung der Nierenfunktion bei stabilen Funktionsparametern mit einem Serumkreatinin-Level um 2.0 mg/dl wurde entsprechend des Studienprotokolls die immunsuppressive Therapie mit Tacrolimus (Talspiegel 6 – 10 mg/dl), Prednisolon (10mg OM) und MMF (180 TDS) bis zum Ende des Beobachtungszeitraumes fortgeführt.

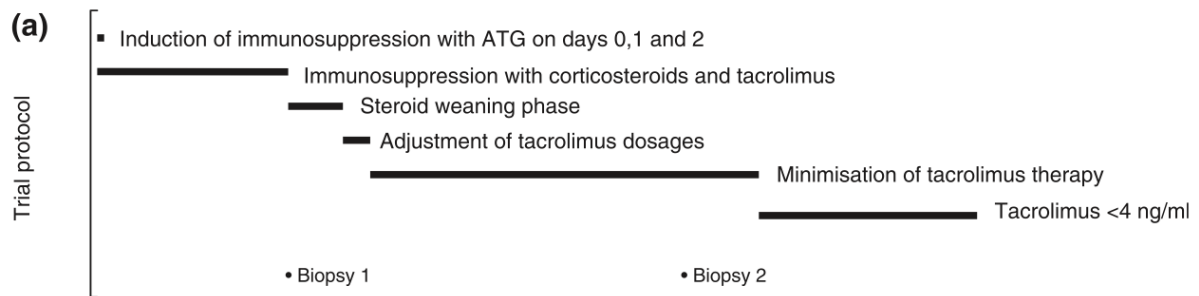


Abb. 13: Immunsuppressives Protokoll von Patient WG

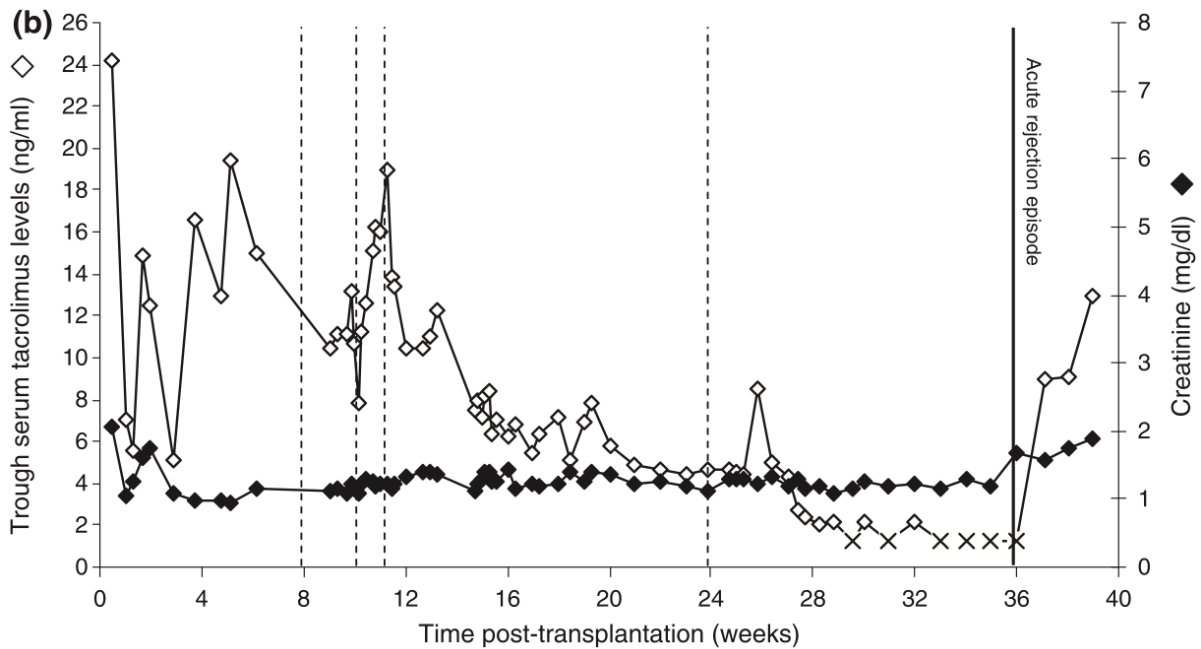


Abb. 14: Tacrolims-Talspiegel im Vergleich zum Kreatininspiegel bei Patient WG

Während des Beobachtungszeitraumes konnte zu keinem Zeitpunkt der Nachweis von HLA-Antikörpern mittels ELISA oder CDC-Assay bestimmt werden.

4.2.4. Studienpatient AG KI/T03/P05

4.2.4.1. Patientenanamnese

Bei dem Patienten AG handelte es sich um einen 59-jährigen Mann mit einer terminalen Niereninsuffizienz auf dem Boden einer chronischer Glomerulonephritis. Der Patient wurde unter der Nummer KI/T03/P05 in die Studie eingeschlossen.

Der Patient litt auch an einer rheumatoiden Arthritis, welche bis zu dem Zeitpunkt der Nierentransplantation ohne Behandlung von Immunsuppressiva unter Kontrolle war und daher nicht als Ausschlusskriterium gewertet wurde.

Die Lebendnierenspende erfolgte durch seine 24-jährige Tochter. In der HLA-Gewebetypisierung zeigte sich eine Übereinstimmung von 2 Klasse-I-AG und einem Klasse-II-Antigen.

4.2.4.2. Studienverlauf

Die Studienvorbereitung und Medikamentenapplikation erfolgte ohne unerwünschte Wirkungen. Nach erfolgreicher Transplantation und weiterem unauffälligen stationären Verlauf mit einer stabilen Diurese und einem Serumkreatininlevel bei 1,6 mg/dl erfolgte die ambulante Weiterbehandlung nach Protokoll.

Der klinische Verlauf und die erste Protokoll-Biopsie wiesen keine Anzeichen für eine Abstoßungsreaktion auf, woraufhin mit dem Ausschleichen der Kortikosteroide und dem Anpassen der Dosis für die Calcineurin-Inhibitoren begonnen wurde.

Darunter zeigte sich weiterhin eine gute Transplantatfunktion ohne signifikante Veränderungen des Serumkreatinins. Jedoch war es auf Grund der rheumatoiden Arthritis nicht vollständig möglich, die Immunsuppression auf das nach Protokoll vorgeschriebene Minimum zu reduzieren, da die bestehende rheumatoide Arthritis postoperativ eine Behandlung mit einer niedrig dosierten Therapie an Kortikosteroiden notwendig machte.

Der Tacrolimus-Talspiegel konnte jedoch nach Protokoll ab der 13. Woche auf < 3 - 4 ng/dl reduziert werden.

Zum Ende des Beobachtungszeitraumes zeigte sich unter einer Immunsuppressionstherapie mit Tacrolimus (Talspiegel: 4-8ng/ml) und Kortikosteroiden (2,5mg – 5 mg OD) eine stabile Transplantatfunktion mit einem Serum-Kreatinin um die 1,6 mg/dl.

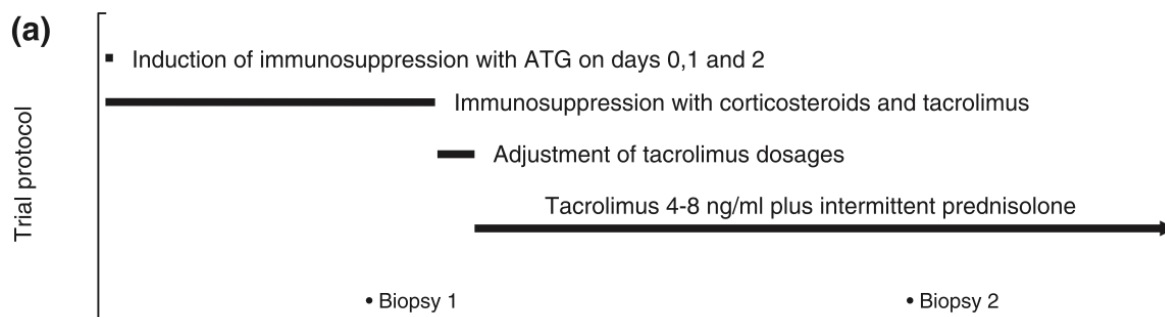


Abb. 15: Reduktionschema der Immunsuppression bei Patient AG

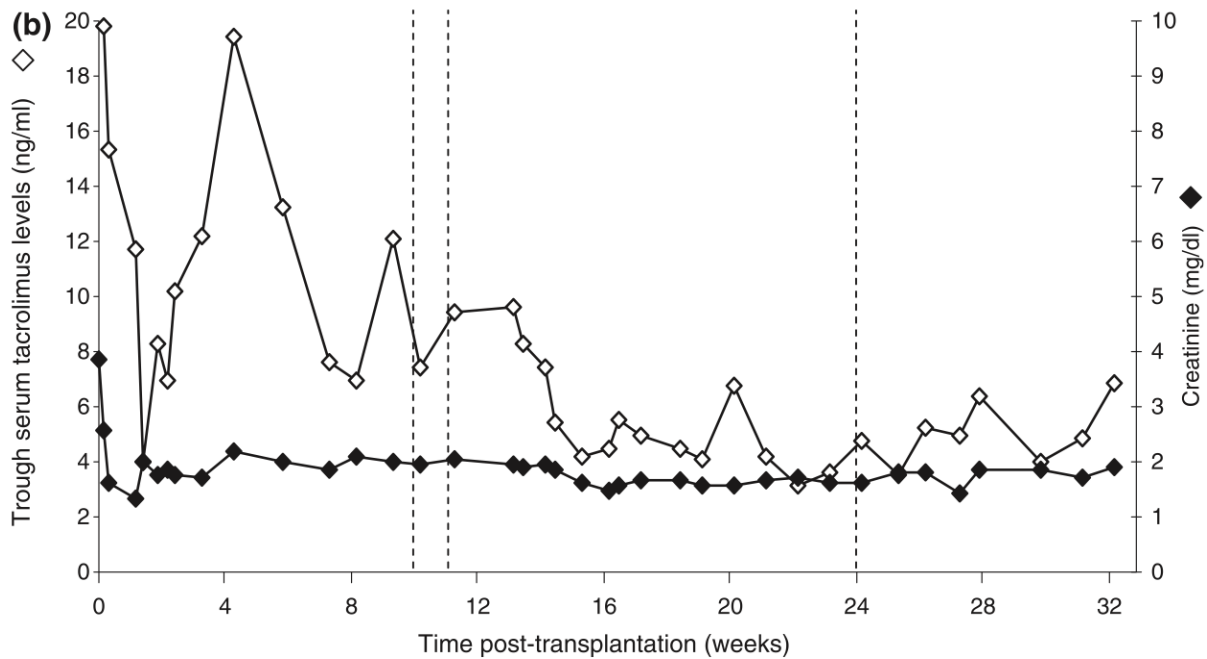


Abb. 16: Tacrolims-Talspiegel im Vergleich zum Kreatininspiegel bei Patient AG

4.2.5. Studienpatient FI KI/T03/P08

4.2.5.1. Patientenanamnese

Bei dem Patienten FI handelte es sich um einen 48 Jährige Patienten mit einer terminalen Niereninsuffizienz auf dem Boden einer adulten polyzystischen Nierenerkrankung. Der Patient wurde unter der Nummer KI/T03/P08 in die Studie eingeschlossen.

Die Nierenlebenspende erfolgte durch die langjährige Lebensgefährtin. In der HLA –Gewebetypisierung zeigte sich Mismatch aller 4 Klasse-I HL- Antigene.

4.2.5.2. Studienverlauf

Der Patient FI erhielt die Studiemedikation 5 Tage vor der geplanten Transplantation, in einer Dosis von $2,54 \text{ mg/kg KG} \times 10^7$.

Die Transplantation und der postoperative Verlauf gestalteten sich unauffällig. Das Serumkreatinin zeigte direkt nach Transplantation einen stetigen Abfall, hielt sich jedoch im weiteren Verlauf über 2 mg/dl . Zum Ausschluß einer subklinischen frühen

Abstoßungsreaktion wurde in der 9. Woche eine erste Transplantatbiopsie durchgeführt. Die ergab keinen histologischen Nachweis für eine Abstoßung des Transplantats. In Übereinstimmung mit dem Protokoll konnte ab Tag 56 mit dem Ausschleichen der Steroide unter Anpassung des Tacrolimusspiegel begonnen werden. Bis zur 11. Woche konnten die Steroide vollständig ausgeschlichen und der Proband auf eine Tacrolimus-Monotherapie mit Talspiegeln zwischen 6 ng/ml und 12 ng/ml eingestellt werden.

Die weiteren nach Protokoll durchgeführten Transplantatbiopsien wurden in den Wochen 8 und 24 entnommen. Histologisch zeigte sich dabei jeweils ein unauffälliges Nierenparenchym ohne pathologische Veränderungen oder Zeichen einer Abstoßungsreaktion. Eine weitere Biopsie zum Ende der Überwachungsphase in der 54. Woche zeigte ebenfalls einen Normalbefund.

Im weiteren Studienverlauf konnte die Tacrolimusdosis weiter reduziert und auf eine niedrig dosierte Monotherapie mit Talspiegeln um die 4-8ng/ml eingestellt werden. Unter der niedrig dosierten Monotherapie zeigte sich ein stabiler Verlauf der Serum-Kreatininwerte um 2mg/dl. Entsprechend den Reduktionskriterien des Protokolls ergab sich keine Indikation zur weiteren Reduktion der immunsuppressiven Therapie.

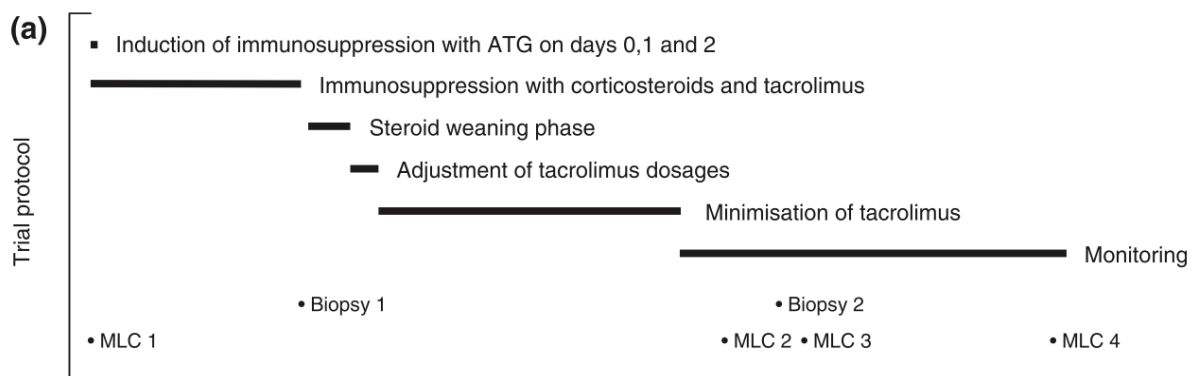


Abb. 17: Reduktionschema der Immunsuppression bei Patient FI

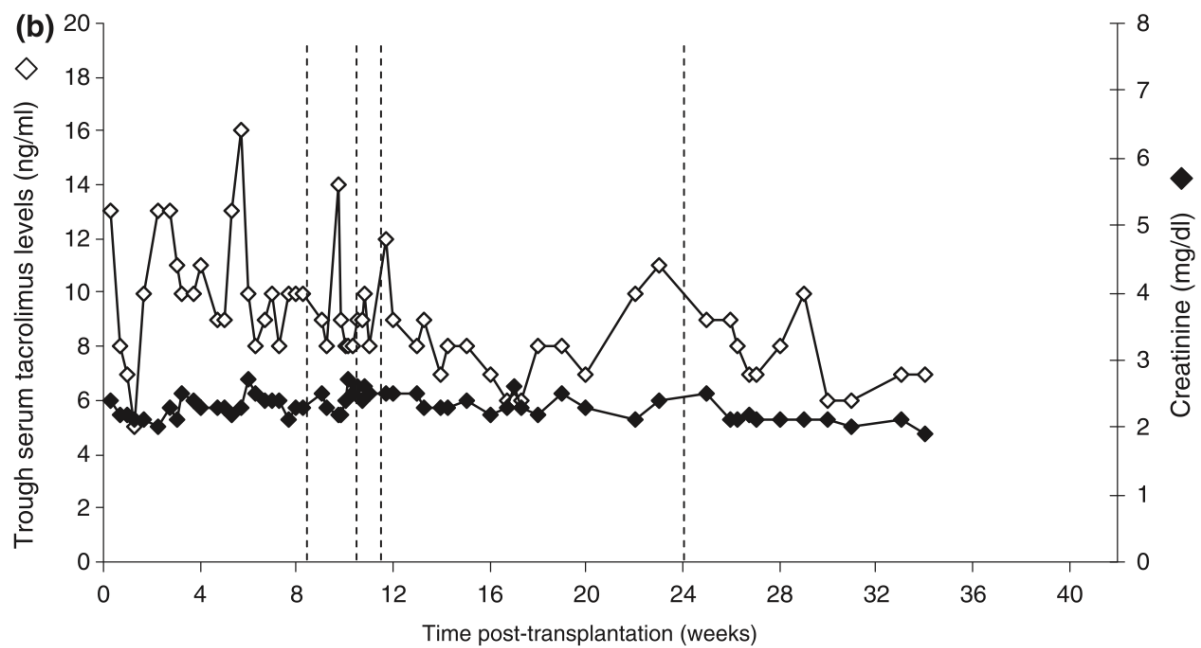


Abb. 18: Tacrolims-Talspiegel im Vergleich zum Kreatininspiegel bei Patient FI

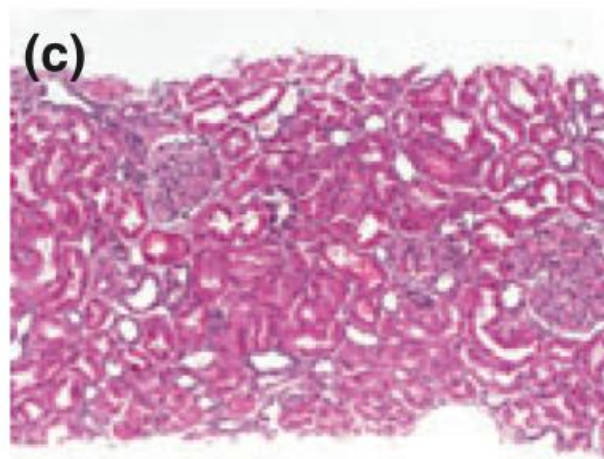


Abb. 19: Nierenbiopsie, PAS gefärbt, von Patient FI, 24 Woche, ohne Nachweis einer Abstoßungsreaktion, 100fach vergrößert

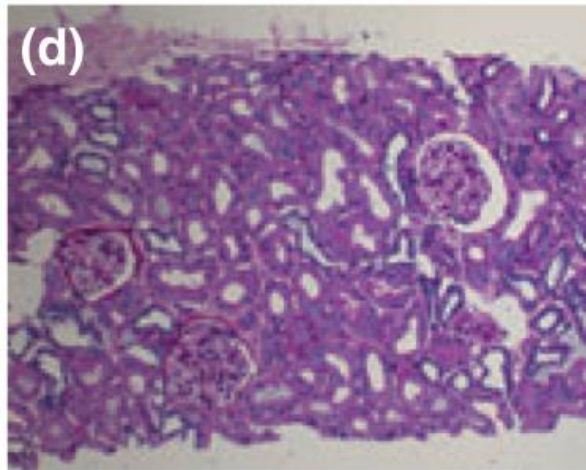


Abb. 20: Nierenbiopsie, PAS gefärbt, von Patient FI, 54 Woche, ohne Nachweis einer Abstoßungsreaktion, 100fach vergrößert

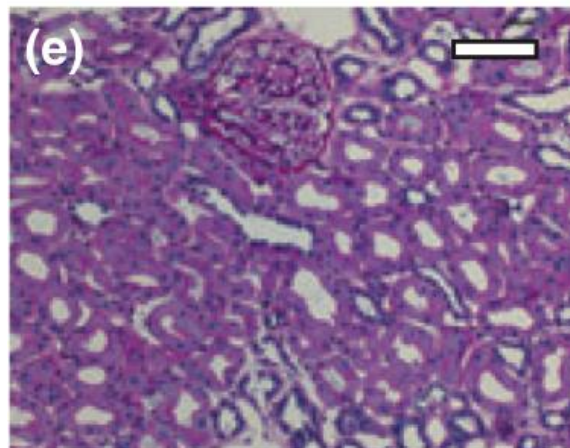


Abb. 21: Zielaufnahme, Nierenbiopsie, PAS gefärbt, von Patient FI, 54 Woche, Balken 300µm

Die Bestimmung des Stimulationsindex mittels gemischter Lymphozytenkultur (MLC) erfolgte zu den Zeitpunkten präoperativ und den Monaten 6, 7 und 9. Dabei wurde die Spender- induzierte Aktivität mit der Empfängeraktivität auf eine Lymphozytensuspension eines Kontrollmediums sowohl mit einem Klasse I Mismatch als auch mit einem kompletten Mismatch verglichen.

Dabei zeigte sich zu jedem Zeitpunkt eine vermehrte Reaktion gegenüber den Kontrollmedien im Vergleich zur Spenderreaktivität sowohl im Sinne der Zellproliferation als auch der IL-2 und IFN- γ Sekretion.

HLA-Antikörper konnten bei dem Patienten FI zu keinem Zeitpunkt nachgewiesen werden.

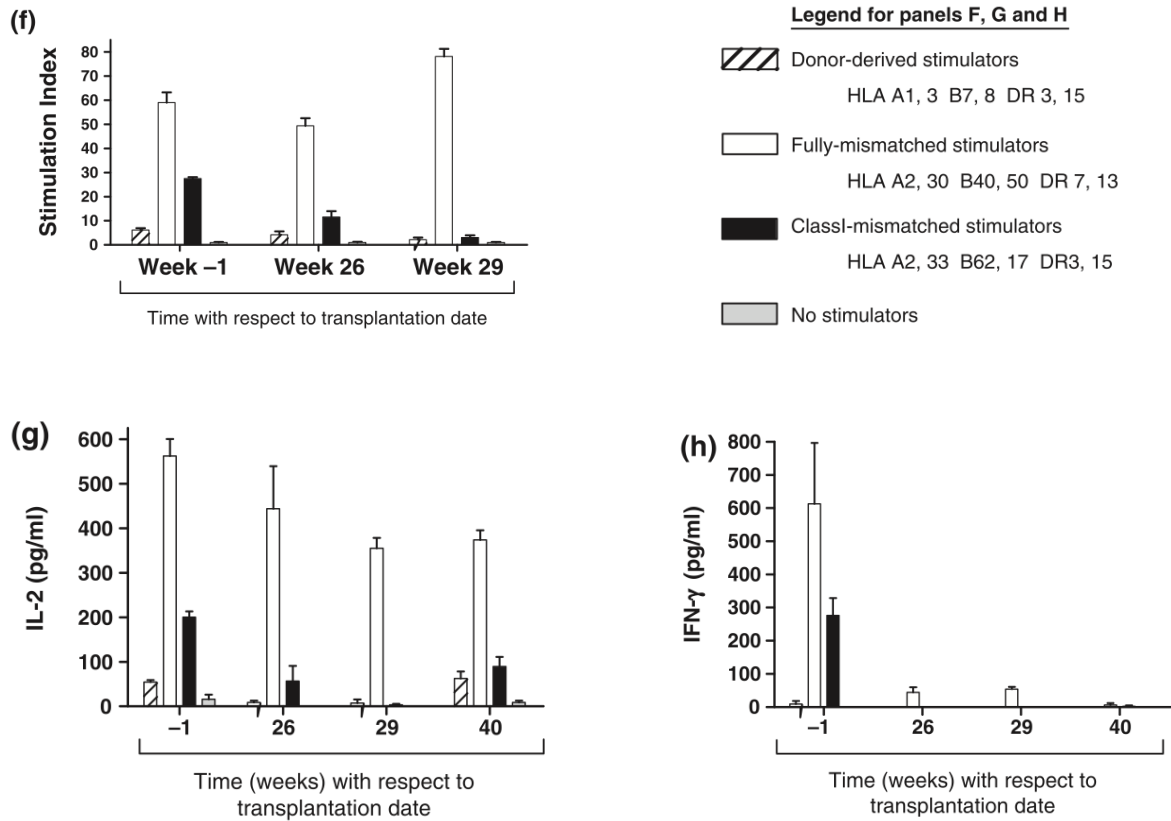


Abb. 22: Spezifische Anti-Spender-Reaktions-Bestimmung bei Patient FI mittels MLC, Woche 1, 26, 29 und 40, anhand des Proliferationsindex (f), der IL-2 Sekretion (g) und der IFN- γ -Produktion (h). Der Vergleich erfolgte gegen ein Full-Mismatch, Klasse-I Mismatch und ein neutrales Medium als Kontrollgruppen.

5. Diskussion

Die Fortschritte der konservativen klinischen Medizin, die Entwicklung und der Einsatz innovativer neuer Arzneimittel lässt die Zahl der terminal niereninsuffizienten Patienten steigen. Die Technik der Dialyse und deren weite Verbreitung bringt niereninsuffiziente Patienten über lange Zeit in ein gutes klinisches Stadium. Damit steigt auch die Zahl derjenigen, die zu einer Organspende gelistet sind.

Wurde ein Patient transplantiert, so sind wichtige klinische Ziele zum einen der lange Erhalt einer ausreichenden Organfunktion und zum anderen die Vermeidung unerwünschter Wirkungen durch eine hohe notwendige immunsuppressive Therapie.

Klinische Erfahrungen im Umgang mit transplantierten Patienten zeigt, das Transplantat-Empfänger nicht unbedingt eine Abstoßungsreaktion einerseits oder eine komplette Toleranz gegenüber dem transplantierten Organ zeigen müssen. Sie demonstrieren häufig auch den Status einer spenderspezifischen Hypo-Reaktivität, ein Zeitraum während dessen die übliche immunsuppressive Therapie deutlich reduziert sein kann.

Die immunologische Basis für einen solchen verminderten Reaktionsstatus ist bisher wenig untersucht. Es ist aber durchaus bekannt, dass eine Exposition gegenüber Spender-Alloantigenen und eine frühzeitige Reduktion der konventionellen immunsuppressiven Therapie hierzu beitragen.

Die vorgelegte Promotion ist Teil einer Reihe von klinischen Untersuchungen zur Minimierung der immunsuppressiven Therapie mittels Spender-spezifischer Toleranzinduktion nach Anwendung allogener und autologer Regulatorzellen.

Diese Untersuchung, im weiteren als TAIC- II Studie bezeichnet, wurde als Phase I Sicherheitsstudie durchgeführt. Die nach dem hier beschriebenen Protokoll produzierten und dem Empfänger eines Lebendtransplantates applizierten TAIC- Zellen zeigten keine akuten oder verzögerten Komplikationen im Verlauf des Beobachtungszeitraumes, weder eine Sensitivierung des Empfängers gegenüber den Spenderantigenen noch eine akzelerierte Abstoßungsreaktion.

Die TAIC- II Studie wurde nicht dafür konzipiert, die Effektivität von TAIC-Zellen bei der Etablierung eines immunsuppressiven Regimes mit niedrig dosierter Ta-

rolimus-Monotherapie bei der Lebendnierentransplantation zu testen. Aus diesem Grund wurde nur eine kleine Patientenkohorte ausgewählt und keine unbehandelte sowie hoch immunreaktive Kontrollgruppe aufgestellt. Gleichwohl zeigte sich, dass Patienten, welche in die TAIC- II Studie eingeschlossen wurden eine höhere Rate an frühen akuten Abstoßungsreaktionen im Vergleich zu konventionellen etablierten immunsuppressiven Regimen aufwiesen. Im Vergleich dazu ist insbesondere die Studie von Shapiro zu erwähnen, welche als eine der wichtigsten Vergleichstudien angesehen werden kann. In einem Kollektiv von 150 Patienten wurden diese zur Induktionstherapie mit 5mg ATG und einer Bolusgabe an Kortikosteroiden behandelt und unmittelbar auf eine Tacrolimus-Monotherapie eingestellt. Innerhalb von 4 Monaten konnte bei 37% der Patienten eine Abstoßungsreaktion nachgewiesen werden. Nach dem 4. Monat wurde die Monotherapie bei 113 Patienten schrittweise reduziert. In dem Überwachungszeitraum von $11 \pm 5,4$ Monate wiesen 23% eine akute Abstoßungsreaktion auf (Shapiro et al 2003). In der TAIC-II Studie kam es zu keinem Verlust des Transplantates, bei akuter Abstoßungsreaktion konnte die Funktion durch eine Rescuetherapie stabilisiert werden und unter Anpassung der immunsuppressiven Therapie eine stabile Transplantatfunktion gesichert werden.

Die präoperative Behandlung mit TAIC-Zellen, in der Art und Weise, wie sie im Rahmen dieser Studie durchgeführt wurde, ist daher sicherlich kein adäquates Protokoll in welcher Form eine funktionsfähige spenderspezifische Organtoleranz im Rahmen der Lebendniere spende induziert werden kann. Jedoch zeigt die Beobachtung, dass die Patienten durch die Behandlung mit spenderspezifischen TAIC-Zellen eine rasche und wesentliche Reduktion ihrer immunsuppressiven Therapie tolerieren, wenn auch nur temporär, einen gegensätzlichen Verlauf zu den üblichen klinischen Erwartungen. Allein diese Tatsache bedarf somit weiterer Beachtung.

Von den fünf in die TAIC-II Studie eingeschlossenen Patienten, konnten vier Patienten erfolgreich von einem immunsuppressiven Standardregime auf eine Monotherapie mit Tacrolimus umgestellt werden, wobei bei drei der Patienten einen Serum-Talspiegel zwischen 6 – 8 ng/ml bereits innerhalb von 24 Wochen nach Transplantation gemessen werden konnte. Im Vergleich zu vorhergegangenen Studien zur Etablierung einer Monotherapie mit Tacrolimus nach Nierentransplan-

tation (Starzl et al 2003, Coupes et al 2002, Shapiro et al 2003, Tan et al 2005, Krämer et al 2005, Bäckmann et al 2006, Thomas et al 2007), war ein deutlich beschleunigtes Absetzen der Immunsuppression und ein Umsetzen auf eine Tacrolimus-Monotherapie in der TAIC- II Studie möglich. Bei den Patienten der TAIC- II Studie wurde das Ausschleichen der Medikation gut vertragen. Nur nach dem vollständigen Absetzen der Immunsuppression bei dem Patienten CFH kam es zu einer akuten Abstoßungsreaktion und bei dem Patient WG war die Abstoßungsreaktion bedingt durch einen Tacrolimus- Talspiegel unter 4 ng/ml. Der Patient CRG konnte erfolgreich über 18 Wochen auf eine Tacrolimus- Monotherapie eingestellt werden und im Anschluß sogar über einen Zeitraum von 8 Monaten vollständig ohne Immunsuppression mit einer stabilen Transplantatfunktion beobachtet werden.

Klinischen Erfahrungen haben gezeigt, dass nach einer Nierentransplantation zum Erhalt der Organqualität die Häufigkeit an akuten Abstoßungsreaktionen auf ein Minimum reduziert beziehungsweise verhindert werden sollten. Jedoch muss auch kein Status der vollständigen spenderspezifischen funktionellen Toleranz erreicht werden. Es sollte eine Form von spender-spezifischer Hyposensitivität gegenüber dem Transplantat erzielt werden, mit dem Ziel eines niedrigen Bedarfs an immunsuppressiver Medikation, ohne den Ansatz des vollständigen Ausschleichens der immunsuppressiven Therapie (Calne 2004). Dabei ist das derzeitige Verständnis über die immunologische Grundlage eines zeitlich begrenzten Status von Nicht-Reaktivität noch nicht ausreichend. Jedoch hat sich gezeigt, dass der Kontakt mit spenderspezifischen Antigenen vor der Transplantation und ein rasches Ausschleichen der konventionellen immunsuppressiven Therapie zur Etablierung solch eines Immunstatus dazu beiträgt (Burlinham et al 1999, Ashton-Chees et al 2006 und 2007, Golshayan et al 2007). Es kann daher festgestellt belegen werden, dass die klinischen Ergebnisse der Patienten an der TAIC- II Sicherheitsstudie, insbesondere die der Patienten CRG und CFH, mit der Behandlung von spenderspezifischen Toleranz-induzierenden Zellen in Zusammenhang stehen. Es konnte in diesen Fällen ein klinisch relevanter Grad an Nicht-Reaktivität des Immunsystems gegenüber dem Spender induziert werden. Dabei kann die werden durch die Ergebnisse der Bestimmung des T-Zellen Proliferationindex und der Zytokinesekretion mittels MLC Hypothese gestützt.

Die Ergebnisse weisen nach, dass während des Zeitraumes der stabilen Transplantatfunktion, die Reaktivität des Immunsystems gegenüber dem Spenderorgan deutlich unterdrückt ist.

Zum jetzigen Zeitpunkt ist der zelluläre Mechanismus, durch welchen die TAIC-Zellen die Immunantwort des Transplantatempfängers beeinflussen noch nicht eindeutig interpretierbar. Es lassen sich jedoch Parallelen zwischen der Funktionsweise von TAIC-Zellen und bereits seit längerem etablierten Methoden, wie der spenderspezifischen Bluttransfusion oder der Knochenmarktransplantation, erkennen (Burlingham et al 2001, Kawai et al 2008, Kingsley et al 2007). In diesem Zusammenhang ist es wichtig anzumerken das die TAIC-Zelle ursprünglich als das Derivat aus einer embryogenen Zellstammlinie einer Ratte identifiziert wurde, welches im Wesentlichen für die Induktion von Toleranz bei allogener Herztransplantation verantwortlich war (Hutchinson et al 2008, Fändrich et al 2002 a, Fändrich et al 2002 b).

Erst vor kurzer Zeit wurde in bemerkenswerter Weise über das Potential sowohl der spenderspezifischen Bluttransfusion als auch der spenderspezifischen Knochenmarktransplantation zur Induktion von Immuntoleranz im Rahmen der Nieren- (Kawai et al 2008) und Dünndarmtransplantation (Pirenne et al 2007) berichtet, jedoch wurde bis jetzt in keiner Studie die Anwendbarkeit und Wirksamkeit von TAIC-Zellen überprüft.

Nichtsdestotrotz zeigt sich eine Vielzahl von theoretischen Vorteilen in der Verwendung von spezifischen TAIC-Zellen im Vergleich zu ganzheitlichen Blutprodukten oder der Knochenmarktransplantation als immunkonditionierende Therapie. Dabei ist im Wesentlichen die Möglichkeit der strengen Überwachung und Steuerung der Zusammensetzung, der Qualität sowie der zu verabreichenden Dosis zu nennen. Zudem, im Gegensatz zur Knochenmarktransplantation, weist die Anwendung von TAIC- Zellen einen wesentlichen Vorteil in der klinischen Anwendung auf. Es besteht nicht die Notwendigkeit, dass zum vollständigen Einnisten der Toleranz induzierenden Zellen im Transplantatempfänger ein lymphozytopener Status für einen bestimmten Zeitraum geschaffen werden muss (Brem-Exner et al 2004, Kawai et al 2008). Gleichzeitig erscheint die Anwendung von TAIC- Zellen sicherer im Vergleich zur Bluttransfusion oder Knochenmarktransplantation, denn sowohl in der TAIC-I als auch der TAIC- II Studie, die immerhin ein Kollektiv von 16

Patienten beinhalten, konnte nachgewiesen werden, dass keiner der Patienten durch die Applikation von TAIC- Zellen gegen Spenderantigene sensibilisiert wurde (Hutchinson et al 2008 a, Hutchinson et al 2008 b). Im Vergleich dazu zeigt sich bei der spenderspezifischen Bluttransfusion bei fast 7% der Patienten unter der Anwendung von Azathioprin die Sensibilisierung gegen Spenderantigene (Opelz et al 1973, Anderson et al 1982). Sogar einer von fünf Patienten erleidet eine nicht reversible humorale Abstoßungsreaktion in Verbindung von einer Knochenmarkstransplantation mit anschließender Nierentransplantation (Kawai et al 2004).

Um den Status der reduzierten Immunantwort oder den Status der kompletten Toleranz besser überwachen zu können und damit die Anwendung einer Immuntherapie sicher anzuwenden, bedarf es jedoch auch der Bestimmung spezifischer Biomarker, welche das Erreichen solch eines Toleranz- Status oder dessen Verlust bestimmen und kontrollieren lassen (Land 2004, Fuchs 2014). Im Rahmen des “Indices of Tolerance (IOT)- Projekt“ wurde dabei an Patienten, welche eine natürliche Immunität gegenüber ihrem Transplantat nach vollständigem Absetzen der immunsuppressiven Medikamente entwickelt haben, versucht, spezifische Biomarker zur Toleranzinduktion zu beschreiben. Im Rahmen eines individuellen Heilungsversuches mit TAIC- Zellen bei zwei Patientinnen mit immunologischer Hochrisikokonstellation auf Grund eines bei einer Patientin vorliegenden Full- Mismatch und von präformierten Antikörpern bei der anderen Patientin, zeigte sich in wiederholten Erhebungen des immunologischen Status eine Veränderung der im Rahmen des IOT- RISET Projektes definierten Genmuster (Sagoo et al 2010). Dabei kam es zu einer Verschiebung in Richtung der Oberflächenrezeptoren, die bei Patienten mit natürlicher Toleranz beschrieben worden sind.

Bei beiden Patienten konnte die immunsuppressive Therapie anhand eines modifizierten TAIC-II Protokolls reduziert und innerhalb von 24 Wochen auf eine Monotherapie mit Tacrolimus eingestellt werden. Seit nunmehr 3 Jahren weisen die Patientinnen eine stabile Transplantatfunktion mit konstanten Kreatininwerten auf.

Vergleicht man dabei die Ergebnisse mit den Daten des IOT-RISET Projekts muss man jedoch beachten, dass die ausgewählten Patienten alle 6 – 9 Jahre nach Transplantation einen stabilen Status aufweisen konnten (Hutchinson et al 2011).

Ein besseres Verständnis der zellulären und molekularen Mechanismen in der Entwicklung und Funktion dieser Toleranz induzierenden Zellen, sowie die weitere und genauere Charakterisierung dieser Zellen in Form von Oberflächenmarkern und funktionellen Eigenschaften, wird weitere Möglichkeiten in der gezielten Herstellung und klinischen Anwendung von TAIC- Zellen aufzeigen. Dies wiederum ermöglicht eine einheitliche und eindeutig definierte Zell- basierte Therapie zur Minimierung der Immunsuppression bei der Lebendnierentransplantation.

Diese ermutigenden Ergebnisse und Aspekte der TAIC- I und TAIC- II Studien zeigen deutlich auf, dass die Anwendung dieser sogenannten "Toleranz- Akzeptierenden induzierenden Zellen" (TAIC) in der humanen soliden Organtransplantation weiterer klinische Untersuchungen bedarf.

6. Zusammenfassung

In der Transplantationsmedizin sind die großen Herausforderungen heute die Zahl der zur Verfügung stehenden Organe und die Kontrolle der Abstoßungsreaktion durch das Immunsystem des Empfängers. Alle immunsuppressiven medikamentösen Therapieansätze sind mit erheblichen unerwünschten Wirkungen assoziiert.

Der Einsatz von Immuntoleranz-modulierenden Zellen bei Transplantatempfängern vor der Operation zur Konditionierung der Immunreaktion und damit zur Optimierung der Organakzeptanz ist ein naheliegender Ansatz der bisher bereits tierexperimentell untersucht wurde.

Die vorliegende Arbeit beschreibt eine Untersuchung zur Minimierung der immunsuppressiven Therapie bei Patienten, die sich zu einer Lebendnierentransplantation zur Therapie der terminalen Niereninsuffizienz entschieden haben.

In dieser von der Ethikkommission aller beteiligten Studienzentren genehmigten Untersuchung wurden fünf Patienten die ein Lebendnierenorgan erhalten sollten präoperativ mit allogenen und autologen Regulatorzellen behandelt, sogenannten „Transplantat-Akzeptanz-induzierenden Zellen (TAIZ)“. Diese Therapie wurde in Kombination mit einer klassischen immunsuppressiven Therapie durchgeführt (Anti-Thymozyten-Globulin (ATG) – Induktion in Kombination mit Tacrolimus und Steroid Immunsuppression).

Die Untersuchungen wurden im Rahmen einer Phase –I Sicherheitsstudie durchgeführt.

Über einen Zeitraum von 14 Tagen wurden nach 12 Wochen bei erfolgreich transplantierten Patienten die Steroide abgesetzt und die Tacrolimus-Therapie im Anschluß reduziert.

Drei der fünf Patienten haben die niedrigdosierte Tacrolimus - Monotherapie toleriert, bei einem Patienten konnten alle immunsuppressiven Medikamente über 8 Monate abgesetzt werden.

Die Infusion von TAIZ-Zellen zeigte bei allen Patienten keine akute oder verzögerte unerwünschte Reaktion.

Eine Überwachung der Immunreaktion des Transplantat-Empfängers nach Behandlung mit TAIZ-Zellen in gemischter Lymphozytenkultur zeigte eine supprimierte T-Zell Proliferation und Cytokine-Sekretion nach Stimulation mit Spender-Alloantigenen während der klinisch stabilen Transplantatfunktion im Untersuchungszeitraum.

Die vorliegende Untersuchung zeigt einen vielversprechenden Ansatz zur möglichen Reduktion einer pharmakologischen immunsuppressiven Therapie bei Transplantatempfängern auf.

7. Studienzentren

7.1. Versuchszentren

Universitätsklinikum Schleswig – Holstein (UK S-H)
Arnold-Heller-Strasse 7
24105 Kiel

Universitätsklinikum Düsseldorf
Moorenstrasse 5
40225 Düsseldorf

Universitätsklinikum Essen
Hufelandstrasse 55
45122 Essen

7.2. Unterstützende Zentren

Kantonspital Bern
Institut für Pathologie
Schönbeinstrasse 40
CH – 4003 - Basel

Begutachtung und Auswertung der
Transplantatbiopsien

8. Anhang der verwendeten Materialien

AB serum, human, 10% hitze - inaktiviert ATG (ATG- FreseniusS [®])	Cambrex Bioscience Verviers Verviers, Belgien Fresenius AG, Bad Homburg, Germany
7-AAD	Becton Dickinson (BD), Heidelberg, Germany, #559925
Bio-Plex Human Th1/Th2 Assay	Bio-Rad, München, Germany # 171-A11081
CD13	BD, # 555394
CD14	BD, # 555399
CD80	BD, # 557227
CD86	BD, # 555658
FcR Block	Miltenyi, Bergisch Gladbach, Germany
GM-7	Uniklinik Kiel, Kiel, Germany
INF- γ (Imukin [®])	Boehringer Ingelheim, Ingelheim am Rhein, Germany
Intratec [®]	Biotest AG, Dreieich, Germany
L- Glutamin	Cambrex Bioscience Verviers Verviers, Belgien
rhM-CSF	R&D Systems, Wiesbaden- Nordenstadt, Germany
Natrium-Zitrat	Baxter, Unterschleißheim, Germany
Normosol [®]	Abbott GmbH & Co. KG, Wiesbaden, Germany
DPBS	Cambrex Bioscience Verviers Verviers, Belgien
Prednisolon (Solu- Decortin [®] -H, Decortin H [®])	Merck Pharma GmbH, Darmstadt, Germany

Rituximab (Mabthera®)

Hoffmann LaRoche AG,
Basel, Schweiz

RPMI ohne Glutamin und Phenol Red

Cambrex Bioscience Verviers,
Verviers, Belgien

Streptomycin

Cambrex Bioscience Verviers
Verviers, Belgien

Tacrolimus (Prograf®)

Astellas Pharma AG,
München, Germany

9. Literaturverzeichnis

Ahuja SS, Shrivastav S, Danielpour D, Balow JE, Boumpas DT (1995) Regulation of transforming growth-factor beta 1 and its receptor by cyclosporine in human T lymphocytes Transplantation Oct; 60(7): 718 - 723

Ali J, Bolton EM, Bradley A, Pettigrew GJ (2013) Allorecognition Pathways in transplant rejection and tolerance Transplantation Oct; 96(8): 681- 688

Anderson CB, Sicard GA, Etheredge EE (1982) Pretreatment of renal allograft recipients with azathioprine and donor-specific blood products Surgery Aug; 92(2): 315 - 321

Ansari MJ, Sayegh MH (2004) Clinical transplantation tolerance: the promise and challenges Kidney Internat. May; 65(5): 1560 -1563

Ashton-Chess J, Brouard S, Souillou JP (2006) Is clinical tolerance realistic in the next decade? Transpl Int Jul; 19(7); 539 - 548

Ashton-Chees J, Giral M, Brouard S, Souillou JP (2007) Spontaneous operational tolerance after immunosuppressive drug withdrawal in clinical renal allotransplantation Transplantation Nov ; 84(10): 1215 - 1219

Bäckman L, Aselius H, Lindberger K, Svensson L, Strömbom U, Olausson E, Hadimeri H, Deurell SI, Norrby J, Gäbel M, Ebermark A, Olausson M (2006) Steroid-free immunosuppression in kidney transplant recipients and prograf monotherapy: an interim analysis of a prospective multicenter trial Transplant Proc. Oct; 38(8): 2654 - 2656

Banasik M, Klinger M (2006) Chronic allograft nephropathy--immunologic and nonimmunologic factors Ann Transplant. 11(1): 7 - 10

Barik S (2006) Immunophilins: for the love of proteins Cell Mol Life Sci. Dec; 63(24): 2889 - 2900

Barth C, Stachowski J, Von Menges A, Lammerding P, Baldamus CA (1998) Immunologische, alloantigenabhängige Faktoren in der chronischen Transplantatabstoßung Medizinische Klinik Jan; 93(1): 1 - 5

Bennett WM, De Mattes A, Meyer MM, Andoh T, Barry JM (1996) Chronic cyclosporine nephropathy: the Achilles' heel of immunosuppressive therapy
Kidney Int.; 50: 1089 - 1100

Blaha P, Bigenzahn S, Koporc Z, Sykes M, Muehlbacher F, Wekerle T (2005) Short-term immunosuppression facilitates induction of mixed chimerism and tolerance after bone marrow transplantation without cytoreductive conditioning.
Transplantation. Jul; 80(2): 237 - 243

Brem-Exner BG, Sattler C, Hutchinson JA, Koehl GE, Kronenberg K, Farkas S, Inoue S, Blank C, Knechtle SJ, Schlitt HJ, Fändrich F, Geissler EK (2008) Macrophages driven to a novel state of activation have anti-inflammatory properties in mice J Immunol. Jan; 180(1): 335 - 349

Brem-Exner BG, Scherer MN, Koehl GE, Frank E, Sattler C, Schlitt HJ, Fändrich F, Geissler EK (2004) Hyperacute rejection of transplanted rat hearts is abrogated by the use of in vitro generated donor-derived transplant- acceptance-inducing cells (Taic) Transplantation July;78 (2): 530

Billingham RE, Brent L, Medawar PB (1953) Actively acquired tolerance of foreign cells Nature Oct 3; 172(4379): 603 - 606

Bluestone JA, Thomson AW, Shevach EM, Weiner HL (2007) What does the future hold for cell- based tolerogenic therapy?
Nat Rev Immunol Aug; 7(4): 650 - 654

Bonifaz L, Bonnyay D, Mahnke K, Rivera M, Nussenzweig MC, Steinman RM (2002) Efficient targeting of protein antigen to the dendritic cell receptor DEC-205 in the steady state leads to antigen presentation on major histocompatibility complex class I products and peripheral CD8+ T cell tolerance
J. Exp. Med. Dec; 196(12): 1627 - 1638

Borel JF, Feurer C, Gubler HU, Stähelin H (1979) Biological effects of cyclosporin A: a new antilymphocytic agent. Agents Actions Jul; 6(4): 468 - 475

Burlingham WJ (2001) The blood transfusion effect. In: Thiru S, Waldmann H, Pathology and Immunology of Transplantation and Rejection
Oxford Blackwell Sciences: 92 - 115

Burlingham WJ, Grailer AP, Fechner JH (1995) Microchimerism linked to cytotoxic T lymphocyte functional unresponsiveness (clonal anergy) in a tolerant renal transplant recipient *Transplantation* Apr; 59(8): 1147 – 1155

Burlingham WJ, Kuska S, Chin L (1999) Focal infiltrates in kidney allografts – developing a model for clinical transplant peripheral tolerance *Graft*; 2: 253 - 260

Calne RY (1976) Mechanisms in the acceptance of organ grafts *Br Med Bull* May; 32(2): 107 - 112

Calne RY (2004) Proper tolerance – the future of organ transplantation from laboratory to the clinic *Transpl Immunol*; 13: 83 - 86

Coresh J, Selvin E, Stevens LA, Manzi J, Kusek JW, Eggers P, Van Lente F, Levey AS (2008) Prevalence of chronic kidney disease in the United States *Jama* Feb; 299(6): 631

Couper BM, Speake M, Johnson RWG, Roberts ISD, Campbell B, Short CD (2002) Tacrolimus monotherapy in renal transplantation: four-year data *Transpl Proc* Aug; 34(5): 1612 - 1613

Croxson BE, Ashton T (1990) A cost effectiveness analysis of the treatment of end stage renal failure. *N Z Med J*; 103(888): 171 - 174

Dai Z, Li Q, Wang Y, Gao G, Diggs LS, Tellides G, Lakkis FG (2004) CD4+CD25+ regulatory T cells suppress allograft rejection mediated by memory CD8+ T cells via a CD30 – dependent mechanism *J Clin Invest*. Jan; 113(2): 310 - 317

Dey B, Sykes M, Spitzer TR (1998) Outcomes of recipients of both bone marrow and solid organ transplants *Medicine* Sep; 77(5): 355 - 369

Dupont E, Schandene L, Denys C, Wybran J (1986) Differential in vitro actions of cyclosporin, methylprednisolone, and 6-mercaptopurine: implications for drugs influence on lymphocyte activation mechanisms *Clin Immunol Immunopathol*. Sep; 40(3): 422 - 428

Eiseman B, Housbrough J, Weil R (1980) New approaches for immunosuppression *Am Surg*. Jan; 46(1): 24 - 27

Europien best practise guidelines for renal transplantation (Part 1). II. 3 Living kidney donors.(2000) Nephrol Dial Transplant; 15 (7): 47 - 50

Fändrich F, Lin X, Chai GX, Schulze M, Ganten D, Bader M, Holle J, Huang DS, Parwaresch R, Zavazava N, Binas B (2002 a) Preimplantation- stage stem cells induce long-term allogeneic graft acceptance without supplementary host conditioning Nat Med. Feb; 8(2): 171 – 178

Fändrich F, Zhou X, Schlemminger M, Lin X, Dresske B (2002 b) Future strategies for tolerance induction: a comparative study between hematopoietic stem cells and macrophages Hum Immunol. Oct; 63(10): 805 - 812

Fändrich F, Schulze M, Zehle G, Lange H, Ungefroren H (2004) Stem cell mediated tolerance inducing strategies in organ transplantation
Kidney Int; 65: 1548 - 1550

Fuchs EJ (2014) Transplantation tolerance: from theory to clinic
Immunological Reviews Mar; 258(1): 64 - 79

Green CJ (1981) Immunsuppression with cyclosporine A: a review
Diagn. Histopathol. Apr-Jun; 4(2): 157 - 174

Golshayan D, BuhlerL, Lechler RI, Pascual M (2007) From current immunosuppressive strategies to clinical tolerance of allografts
Transpl Int Jan; 20(1): 12 - 24

Gordon S, Taylor PR (2005) Monocyte and macrophage heterogeneity
Nat Rev Immunol. Dec; 5(12): 953 - 964

Hamburger J, Grosnier J, Dormont J (1965) Experience with 45 Homotransplantations in men Lancet May;1(7393): 985 - 992

Hasek M (1965) Immuntoleranz, Immunchemie Volume 15, 268 - 283

Heumann A, Ungefroren H, Ruhnke M, Sotnikova A, Lange H, Burdelski M, Kremer B, Fändrich F (2000) Charakterisierung nicht- dendritischer monozytärer Zellen mit immunregulatorischen Eigenschaften
Deutsche Gesellschaft für Chirurgie. Chir. Forum; 34: 271 - 273

Hörl WH, de Alvaro F, Williams PF (1999) Healthcare systems and end-stage renal disease (ESRD) therapies- an international review: access to ESRD treatments
Nephrol Dial Transplant; 14(6): 10 - 15

Hultsch T, Kapp A, Spergel J (2005) Immunomodulation and safety of topical calcineurin inhibitors for the treatment of atopic dermatitis
Dermatology; 211(2):174 - 187

Hutchinson JA, Riquelme P, Brem-Exner BG, Schulze M, Matthäi M, Renders L, Kunzendorf U, Geissler EK, Fändrich F (2008a) Transplant acceptance-inducing cells as an immune-conditioning therapy in renal transplantation.
Transpl Int. Aug; 21(8): 728 - 741

Hutchinson JA, Roelen D, Riquelme P, Brem-Exner BG, Witzke O, Philipp T, Matthäi M, Gövert F, Claas FH, Westphal E, Kunzendorf U, Geissler EK, Fändrich F (2008b) Preoperative treatment of a presensitized kidney transplant recipient with donor-derived transplant acceptance-inducing cells
Transpl Int. Aug; 21(8): 808 - 813

Hutchinson JA, Riquelme P, Sawitzki B, Tomiuk S, Miqueu P, Zuhayra M, Oberg HH, Pascher A, Lützen U, Janssen U, Broichhausen C, Renders L, Thaïss F, Scheuermann E, Henze E, Volk HD, Chatenoud L, Lechler RI, Wood KJ, Kabelitz D, Schlitt HJ, Geissler EK, Fändrich F (2011) Cutting Edge: Immunological consequences and trafficking of human regulatory macrophages administered to renal transplant recipients
J Immunol. Sep; 187(5): 2072 - 2078

Iellem A, Mariani M, Lang R, Recalde H, Panina-Bordignon P, Sinigaglia F, D'Ambrosio D (2001) Unique chemotactic response profile and specific expression of chemokine receptors CCR4 and CCR8 by CD4(+)CD25(+) regulatory T cells
J Exp Med. Sep; 194(6): 847 - 853

Jäger MD, Timrott K, Wonigreit K, Schlitt HJ (2002) Immunogenetische Voraussetzungen bei der Toleranzinduktion für solide Organtransplantate durch stabilen gemischten Chimerismus in der Ratte
Deut Gesell für Chir; 416 - 417

Kawai T, Cosimi AB, Spitzer TR, Tolkoff-Rubin N, Suthanthiran M, Saidman SL, Shaffer J, Preffer FI, Ding R, Sharma V, Fishman JA, Dey B, Ko DS, Hertl M, Goes NB, Wong W, Williams WW Jr, Colvin RB, Sykes M, Sachs DH (2008) HLA- mismatched renal transplantation without maintenance immunosuppression N Engl J Med. Jan; 358(4): 353 - 361

Kesiraju S, Paritala P, Rao Ch UM, Sahariah S (2014) New onset of diabetes after transplantation - An overview of epidemiology, mechanism of development and diagnosis Transpl Immunol. Jan; 30(1): 52 - 58

Kingsley CI, Nadig SN, Wood KJ (2007) Transplantation tolerance: lessons from experimental rodent models Transplant Int Oct; 20(10): 828 - 841

Kirk AD, Burkly LC, Batty DS, Baumgartner RE, Berning JD, Buchanan K, Fechner JH Jr, Germond RL, Kampen RL, Patterson NB, Swanson SJ, Tadaki DK, Ten-Hoor CN, White L, Knechtle SJ, Harlan DM (1999) Treatment with humanized monoclonal antibody against CD154 prevents acute renal allograft rejection in nonhuman primates Nat Med. Jun; 5(6): 686 - 693

Knechtle SJ (2000) Knowledge about transplantation tolerance gained in primates Curr Opin Immunol Oct 1: 12(5); 552 - 556

Knechtle SJ (2005) Development of tolerogenic strategies in the clinic Phil Trans R Soc B Lond B Biol Sci Sep 29: 360(1461); 1739 - 1746

Krämer BK, Krüger B, Mack M, Obed A, Banas B, Paczek L, Schlitt HJ (2005) Steroid withdrawal or steroid avoidance in renal transplant recipients: focus on tacrolimus-based immunosuppressive regimens. Transplant Proc. May; 37(4): 1789 - 1791

Land W.G.: Immunsuppressive Therapie Band 2. Konventionelle immnsuppressive Medikamente – Calcineurin-hemmende Mediakmente – Polyklonale und monoklonale Anti-Pan-T-Zell-Antikörper, Sonderausgabe in 4 Bänden. Georg Thieme Verlag Stuttgart (2004)

Lechler RI, Sykes M, Thomson AW, Turka LA (2005) Organ transplantation: how much promise has been realized? Nat Med Jun; 11(6): 605 - 613

Legendre Ch, Kreis H (2010) A tribute to Jean Hamburger's contribution to organ transplantation *Am J Transpl. Nov*; 10(11): 2392 - 2395

Li C, Yang CW (2009) The pathogenesis and treatment of chronic allograft nephropathy *Nat Rev Nephrol. Sep*; 5(9): 513 - 519

Macian F (2005) NFAT proteins, key regulators of T-cell development and function *Nat Rev Immunol. Jun*; 5(6): 472 - 484

Mahnke K, Qian Y, Knop J, Enk AH (2003) Induction of CD4+/CD25+ regulatory T-cells by targeting of antigens to immature dendritic cells. *Blood.*;101:4862 - 4869

Matevossian E, Kern H, Hüser N, Doll D, Snopok Y, Nährig J, Altomonte J, Sinicina I, Friess H, Thorban S (2009) Surgeon Yuriy Voronoy (1895–1961) – a pioneer in the history of clinical transplantation: in Memoriam at the 75th Anniversary of the First Human Kidney Transplantation *Transplant Int Dec*; 22(12): 1132 - 1139

Mc Curry KR, Colvin BL, Zahorchak AF, Thomson AW (2006) Regulatory dendritic cell therapy in organ transplantation *Transplantation Int Jul*; 19(7): 525 - 538

Mihatsch MJ, Kyo M, Morozumi K, Yamaguchi Y, Nickeleit V, Ryffel B (1998) The side-effects of ciclosporine-A and tacrolimus *Clin Nephrol Jun*; 49(6): 356 - 363

Molkentin JD, Lu JR, Antos CL, Markham B, Richardson J, Robbins J, Grant SR, Olson EN (1998) A calcineurin- dependent transcriptional pathway for cardiac hypertrophy *Cell Apr 17*; 93(2): 215 - 228

Møller HJ (2012) Soluble CD163 *Scand J Clin Lab Invest. Feb*; 72(1): 1 - 13

Mosmann TR, Cherwinski H, Bond MW, Giedlin MA, Coffman RL (1986) Two types of murine helper T cell clone. I. Definition according to profiles of lymphokine activities and secreted proteins *J Immunol. Apr 1*; 136(7): 2348 - 2357

O'Keefe SJ, Tamura J, Kincaid RL, Tocci MJ, O'Neill EA (1992) FK-506- and CsA-sensitive activation of the interleukin-2 promoter by calcineurin

Nature Jun 25; 357 (6380): 692 - 694

Opelz G, Sengar GPS, Mickey MR, Terasaki PI (1973) Effect of blood transfusion on subsequent kidney transplants Transplant Proc Mar; 5(1): 253 - 259

Pascual M, Theruvath T, Kawai T, Tolkoff-Rubin N, Cosimi AB, Strategien zur Verbesserung der Langzeitergebnisse nach Nierentransplantation

J Nephrol. 2003; 1-2003: 53 - 63

Pharmaceutical Inspection Convention Pic/s GMP guide for blood establishments. 1-7-2004

Pirenne J, Kawai M, Kitade H, Koshihara T, Takahashi K, Aerts R, Monbaliu D, Coosemans W, Waer M (2008) Intestinal transplantation: from the laboratory to the clinics Acta Chir Belg. Jan-Feb; 108(1): 52 - 57

Quasi – Homepage Bundesverband Niere 2004 – Bericht über Dialysebehandlung und Nierentransplantation in Deutschland 2003/2004

Quinn RR, Manns BJ, McLaughlin KM (2007) Restricting cadaveric kidney transplantation based on age: the impact on efficiency and equity

Transplant Proc Jun; 39 (5):1362 - 1367

RISSET – Homepage www.risetfp6.org

Roelen D, Brand A, Claas FJ (2004) Pretransplant blood transfusion revisited: a role for CD4⁺ regulatory cells? Transplantation Jan; 77(1): 26 - 28

Rush D (2013) The impact of calcineurin inhibitors on graft survival

Transplant Rev Jul; 27(3): 93 - 95

Rutella S, Lemoli RM (2004) Regulatory T cells and tolerogenic dendritic cells: from basic biology to clinical application Immunol Lett Jun; 94(1-2): 11 - 26

Sachs DH, Kawai T, Sykes M (2014) Induction of tolerance through mixed chimerism CSH Perspect Med Jan 1; 4(1): 1 - 19

Salvatierra Jr, Vincenti F, Amend W, Potter D, Iwaki Y, Opelz G, Terasaki P, Duca R, Cochrum K, Hanes D, Stoney RJ, Feduska NJ (1980) Deliberate donor-specific blood transfusions prior to living related renal transplantation. A new approach *Ann Surg.* Oct; 192(4): 543 - 552

Sagoo P, Perucha E, Sawitzki B, Tomiuk S, Stephens DA Miqueu P, Chapman S, Craciun L, Sergeant R, Brouard S, Rovis F, Jimenez E, Ballow A, Giral M, Rebollo-Mesa I, Le Moine A, Braudeau C, Hilton R, Gerstmayer B, Bourcier K, Sharif A, Krajewska M, Lord GM, Roberts I, Goldman M, Wood KJ, Newell K, Seyfert-Margolis V, Warrens AN, Janssen U, Volk HD, Souillou JP, Hernandez-Fuentes MP, Lechler RI (2010) Development of a cross-platform biomarker signature to detect renal transplant tolerance in humans *J Clin Invest.* Jun; 120(6): 1848 - 1861

Sayegh MH, Watschinger B, Carpenter CB (1994) Mechanisms of T-cell recognition of alloantigen . The role of peptides *Transplantation* May 15; 57 (9): 1295 - 1302

Shapiro R, Jordan ML, Basu A, Scantlebury V, Potdar S, Tan HP, Gray EA, Randhawa PS, Murase N, Zeevi A, Demetris AJ, Woodward J, Marcos A, Fung JJ, Starzl TE (2003) Kidney transplantation under a tolerogenic regimen of recipient pretreatment and low-dose postoperative immunosuppression with subsequent weaning *Ann Surg.* Oct; 238(4): 520 - 525

Sola E, Gonzalez-Molina M, Cabello M, Burgos D, Ramos J, Gutierrez C, Lopez V, Soler J, de la Vega E, Hernandez D (2010) Long-term improvement of deceased donor renal allograft survival since 1996: a single transplant center study *Transplantation* Mar 27; 89(6): 714 - 720

Solez K, Colvin RB, Racusen LC, Haas M, Sis B, Mengel M, Halloran PF, Baldwin W, Banfi G, Collins AB, Cosio F, David DS, Drachenberg C, Einecke G, Fogo AB, Gibson IW, Glotz D, Iskandar SS, Kraus E, Lerut E, Mannon RB, Mihatsch M, Nankivell BJ, Nicleleit V, Papadimitriou JC, Randhawa P, Regele H, Renaudin K, Roberts I, Seron D, Smith RN, Valente M (2008) Banff 07 classification of renal allograft pathology: updates and future directions *Am J Transplant.* Apr; 8(4): 753 - 760

Starzl TE, Murase N, Abu-Elmagd K, Gray EA, Shapiro R, Eghtesad B, Corry RJ, Jordan ML, Fontes P, Gayowski T, Bond G, Scantlebury VP, Potdar S, Randhawa P, Wu T, Zeevi A, Nalesnik MA, Woodward J, Marcos A, Trucco M, Demetris AJ, Fung JJ (2003) Tolerogenic immunosuppression for organ transplantation
Lancet May 3; 361(9368): 1502 -1510

Starzl TE, Zinkernagel RM (2001) Transplantation tolerance from historical perspective Nat rev Immunol. Dec; 1(3): 233 - 239

Stengel B, Billon S, Van Dijk PCW, Jager KJ, Friedo, Dekker W, Simpson K Briggs JD on behalf of the ERA–EDTA Registry Committee (2003) Trends in the incidence of renal replacement therapy for end-stage renal disease in Europe, 1990–1999 Nephrol Dial Transplant Sep; 18(9): 1824 - 1833

Strauss-Ayali D, Conrad SM, Mosser DM (2007) Monocyte subpopulations and their differentiation patterns during infection
J Leukoc Biol. Aug; 82(2): 244 - 252

Strober S, Benike C, Krishnaswamy S, Engleman EG, Grumet FC (2000) Clinical transplantation tolerance twelve years after prospective withdrawal of immunosuppressive drugs: studies of chimerism and anti-donor reactivity
Transplantation Apr 27; 69(8): 1549 - 1554

Sykes M (2009) Mechanisms of transplantation tolerance in animals and humans
Transplantation May; 87(9): 67 - 69

Szabolcs P, Burlingham WJ, Thomson AW (2012) Tolerance after Solid Organ and Hematopoietic Cell Transplantation
Biol Blood marrow Transplant Jan; 18(1): 193 - 200

Tan HP, Kaczorowski D, Basu A, McCauley J, Marcos A, Donaldson J, Unruh M, Randhawa P, Zeevi A, Shapiro R (2005) Steroid-free tacrolimus monotherapy after pretransplantation thymoglobulin or Campath and laparoscopy in living donor renal transplantation Transplant Proc. Dec; 37(10): 4235 - 4420

Tan HP, Kaczorowski DJ, Basu A, Unruh M, McCauley J, Wu C, Donaldson J, Dvorchik I, Kayler L, Marcos A, Randhawa P, Smetanka C, Starzl TE, Shapiro R (2006) Living donor renal transplantation using alemtuzumab induction and tacrolimus monotherapy Am J Transplant. Oct; 6(10): 2409 - 2417

Thomas B, Taber DJ, Srinivas (2013) TR Hypertension after kidney transplantation: a pathophysiologic approach Curr Hypertens Rep. Oct; 15(5): 458 - 469

Thomas PG, Woodside KJ, Lappin JA, Vaidya S, Rajaraman S, Gugliuzza KK (2007) Alemtuzumab (Campath 1H) induction with tacrolimus monotherapy is safe for high immunological risk renal transplantation Transplantation Jun 15; 83(11): 1509 - 1512

Thompson AG, O'Sullivan BJ, Beamish H, Thomas R (2004) T cells signaled by NF- κ B dendritic cells are sensitized not anergic to subsequent activation J Immunol Aug 1; 173(3): 1671 - 1680

Tiemessen MM, Jagger AL, Evans HG, van Herwijnen MJ, John S, Taams LS CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ regulatory T cells induce alternative activation of human monocytes/macrophages Proc Natl Acad Sci U S A. 2007 Dec 4; 104(49): 19446 - 19451

Vanhove B, Laflamme G, Coulun F (2003) Selective blockade of CD28 and not CTLA4 with single-chain Fv- α 1-antitrypsin fusion body Blood Jul 15; 102(2): 564 - 570

Vasilevko V, Ghochikyan A, Holterman MJ, Agadjanyan MG (2002) CD80 (B7-1) and CD86 (B7-2) are functionally equivalent in the initiation and maintenance of CD4⁺ T-cell proliferation after activation with suboptimal doses of PHA DNA Cell Biol. Mar; 21(3): 137 - 149

Waldmann H (1999) Transplantation tolerance – where do we stand? Nature Medicine Nov; 11(5): 1245 - 1248

Wali RK, Weir MR (2008) Chronic allograft dysfunction: can we use mammalian target of rapamycin inhibitors to replace calcineurin inhibitors to preserve graft function? Curr Opin Organ Transplant. Dec; 13(6): 614 - 621

Waiser J, Dell K, Böhler T, Dogu E, Gaedeke J, Budde K, Neumayer HH (2002) Cyclosporine A up-regulates the expression of TGF- β 1 and its receptors type I and type II in rat mesangial cells

Nephrol Dial Transplant Sep; 17(9): 1568 - 1571

Whitelegg A, Barber LD (2004) The structural basis of T-cell allorecognition
Tissue Antigens. Feb; 63(2): 101 - 108

Winkelmayer WC, Weinstein MC, Mittleman MA, Glynn RJ, Pliskin JS (2002)
Health economic evaluations: the special case of end-stage renal disease treatment
Med Decis Making Sep-Oct ; 22(5): 417 - 430

Zhang W, Victor RG (2000) Calcineurin inhibitors cause renal afferent activation in rats: a novel mechanism of cyclosporine-induced hypertension
Am J Hypertens. Sep; 13(9): 999 - 1004

10. Danksagungen

Herrn Professor Dr. med. Fred Fändrich danke ich für die Überlassung des Themas, die Zeit für die Einarbeitung und Diskussion der Ergebnisse sowie die Möglichkeit zur Teilnahme an dieser internationalen Studie.

Frau Dr. Beate Brem Exner danke ich für die Betreuung und Unterstützung bei der Auswahl der Patienten und deren Betreuung im Verlauf, sowie die Unterstützung und Einarbeitung ins Labor.

Frau Martina Marthäi danke ich für die großzügige Bereitstellung Ihres Büro und die tatkräftige Unterstützung in der Dokumentation.

Ich danke allen Mitarbeitern im Labor, die mir jederzeit mit Rat und Tat praktisch zur Seite gestanden haben.

Ein herzliches Dankeschön gehen an meine Mutter und meinen Vater, die mich stets in meinem Studium ermuntert haben. Der gleiche Dank gilt meinen Geschwistern, sowie der ganzen Familie.

Ein ganz besonderer Dank gilt meiner Frau Jördis für Ihre Unterstützung, Motivation und die viele Geduld in all der Zeit.

11. Curriculum vitae

THILO MARIA SCHULTE

Geboren: 10. Februar 1981 in Essen

Schulbildung:

1987-1991	Kath. Grundschule St. Barbara, Bochum
1991-1997	Gymnasium am Ostring, Bochum
1997-1998	Abingdon School, Abingdon, England
1998-2000	Gymnasium am Ostring, Bochum

Wehrdienst

2000-2001 Grundwehrdienst im Sanitätswesen der Bundeswehr

Studium

2001-2007	Studium der Humanmedizin an der Christian-Albrechts-Universität Kiel, Schleswig-Holstein
11/2007	Ärztliche Prüfung
12/2007	Approbation
2006-2007	Praktisches Jahr
	1. Tertial: Medizinische Klinik Christian-Albrechts-Universität Kiel, Schleswig-Holstein
	2. Tertial: Chirurgische Abteilung Krankenhaus Rendsburg und Universitätskrankenhaus Madison, Abteilung für Transplantations- und Kinderchirurgie Wisconsin USA
	3. Tertial: Abteilung für Kinder- und Jugendmedizin, Städt. Krankenhaus Kiel

Beruflicher Werdegang

Seit 04/2008 Assistenzarzt an der Chirurgischen Universitätsklinik Heidelberg

12. Publikationen

James A. Hutchinson, Beate G. Brem-Exner, Paloma Riquelme, Dave Roelen, Maren Schulze, Katrin Ivens, Bernd Grabensee, Oliver Witzke, Thomas Philip, Lutz Renders, Andreas Humpe, Anna Sotnikova, Martina Matthäi, Asmus Heumann, Felix Gövert, **Thilo Schulte**, Dieter Kabelitz, Frans H.J. Claas, Edward K. Geissler, Ulrich Kunzendorf and Fred Fändrich (2008)

A Cell-based Approach to the Minimisation of Immunosuppression in Kidney Transplantation

Transplant International Aug;21(8):742-54.