

ATG-Induktion bei Nierentransplantatempfängern

Immunologische Langzeiteffekte einer ATG-Induktionstherapie - 5-Jahresergebnisse einer prospektiven Nierentransplantationsstudie

Inauguraldissertation zur Erlangung des akademischen Grades Dr. med. des Fachbereiches Medizin der Justus-Liebig-Universität Giessen

eingereicht von:

Maryam Ettrich

Leipzig, Oktober 2019

Aus dem Transplantationszentrum Gießen, Schwerpunkt Nierentransplantation am Universitätsklinikum Gießen Marburg

Sprecher: Professor Dr. R. Weimer

Betreuer: Prof. Dr. Rolf Weimer, Transplantationszentrum Gießen, Schwerpunkt Nierentransplantation am Universitätsklinikum Gießen Marburg

Gutachter: Prof. Dr. Gregor Bein, Institut für Klinische Immunologie und Transfusionsmedizin , Universitätsklinikum Gießen Marburg

Gutachter: Prof. Dr. Heinrich Sauer, Institut für Physiologie, Justus-Liebig-Universität Gießen

Tag der Disputation: 09.06.2020

1.	Einleitung	1
1.1.	Langzeiterfolge der Nierentransplantation	1
1.2.	Akute Rejektion	4
1.3.	Chronische Transplantatdysfunktion	5
1.4.	ATG-Induktionstherapie	8
1.5.	Immunsuppressive Erhaltungstherapie	11
1.5.1.	Ciclosporin A (Sandimmun optoral® und Generika)	11
1.5.2.	Tacrolimus (Prograf® und Generika)	12
1.5.3.	Mycophenolat-Mofetil (MMF)	13
1.5.4.	Azathioprin (Imurek® und Generika)	14
1.5.5.	Sirolimus (Rapamune®)	15
1.5.6.	Steroide	15
1.6.	Vorstellung der vorliegenden Studie	16
1.7.	Untersuchte Parameter	17
1.7.1.	Immunparameter	17
1.7.1.1.	CD4+ T-Zellen	18
1.7.1.2.	CD8+ T-Zellen	18
1.7.1.3.	CD19+ B-Zellen	19
1.7.1.4.	CD69-Expression auf T-Zellen (T-Zell-Proliferationskapazität)	20
1.7.1.5.	Interleukin-2 (IL-2)	21
1.7.1.6.	Interleukin-4 (IL-4)	22
1.7.1.7.	Interleukin-10 (IL-10)	22
1.7.1.8.	Kostimulatorische Liganden, Adhäsionsmoleküle und IL-10R	23
1.7.1.9.	Neopterin	24
1.7.1.10.	sCD30	25
1.7.1.11.	CD4-Helferfunktion	26
1.7.1.12.	HLA-Antikörper	26
1.7.1.13.	IgA-anti-Fab	27

1.7.2.	Untersuchte Klinische Parameter	27
1.7.2.1.	Infektionen	27
1.7.2.2.	Tumore	28
1.7.2.3.	Transplantatfunktion	28
1.8.	Bisherige Studienergebnisse (bis 2 Jahre nach Transplantation)	28
1.9.	Studienziele	30
2.	Patienten, Material und Methoden	31
2.1.	Patienten	31
2.2.	Material und Methoden	35
2.2.1.	Mononukleäre Zellen	35
2.2.2.	Bestimmung intrazellulärer Zytokine	35
2.2.3.	T-Zellproliferationskapazität	35
2.2.4.	CD4+T-Zell-Helferfunktion, sCD30, Neopterin, IgA-anti-Fab, kostimulatorische Liganden, Adhäsionsmoleküle und IL-10R	36
2.2.5.	Protokoll	37
2.3.	Klinische Daten	44
2.4.	Statistik	44
3.	Ergebnisse	45
3.1.	Klinische Daten	45
3.1.1.	Transplantationsergebnisse 5 Jahre nach Nierentransplantation	45
3.1.2.	Infektionen und maligne Tumore	48
3.2.	Immunparameter	50
3.2.1.	T-Zellproliferation und intrazelluläre Zytokin- produktion	50

3.2.2.	Subpopulationen mononukleärer Zellen und Expression kostimulatorischer Liganden, von Adhäsionsmolekülen sowie IL-10R	55
3.2.3.	sCD30, Neopterin und IgA-anti-Fab	60
3.2.4.	HLA-Antikörper	64
3.2.5.	CD4+T-Zellen: Zellzahl im peripheren Blut und Zellfunktionen; CD4-Helferfunktion	65
4.	Diskussion	72
5.	Zusammenfassung	80
6.	Tabellenverzeichnis	82
7.	Abbildungsverzeichnis	84
8.	Literaturverzeichnis	85
9.	Publikationen	104
10.	Ehrenwörtliche Erklärung	105
11.	Danksagung	106

Bibliographie

Die vorliegende Promotionsschrift beschäftigt sich mit der Frage des Langzeitriskos für schwere Infektionen bei Nierentransplantatempfängern nach ATG-Induktion. Nach einer kurzen Einleitung geht es im ersten Teil der Arbeit um die theoretischen Grundlagen anhand der verfügbaren Literatur.

Der zweite Teil nimmt Bezug auf die untersuchten Patientenkollektive und die dazu verwendeten Methoden. Ein wesentlicher Bestandteil ist die akribische Darstellung der von der Promovendin durchgeführten Untersuchung.

Daran anschliessend werden die vielfältigen und aussagekräftigen Ergebnisse referiert. Die Hauptidee besteht darin, dass die immunologischen Langzeiteffekte der ATG-Induktion sowohl einen starken Abfall von T-Zellen und CD4⁺T-Zellen hervorruft sowie funktionelle Veränderungen dieser Zellen bedingen. Das gesteigerte Risiko für schwere Infektionen nach ATG-Induktion bestand in den ersten zwei Jahren nach Transplantation in Zusammenhang mit eingeschränkter Zellproliferationskapazität aber nicht über dieses Zeitfenster hinaus. In der anschliessenden Diskussion geht es darum, die Ergebnisse in ein Verhältnis zur Literatur zu setzen und die eingangs gestellten Fragen zu verifizieren oder falsifizieren. Abschliessend werden die wichtigsten Ergebnisse zusammengefasst und die verwendete Literatur aufgelistet.

Seiten: 106

Tabellen: 20

Abbildungen: 7

1. Einleitung

1.1. Langzeiterfolge der Nierentransplantation

Die Organtransplantation ist ein vergleichsweise junges Feld der medizinischen Forschung und Therapie. Die erste Nierentransplantation in Deutschland wurde 1963 durchgeführt. Seitdem sind in den vergangenen Jahrzehnten rasante Fortschritte in der operativen und medikamentösen Therapie erzielt worden.

Die Nierentransplantation ist die effektivste Therapie der terminalen Niereninsuffizienz. Sie geht mit einer deutlichen Verbesserung der Lebensqualität sowie einer erhöhten Gesamtüberlebensrate im Vergleich zu einer Dialysetherapie bei Patienten auf der Warteliste zur Nierentransplantation einher (Morath, C. et al. 2010/1).

Im Jahr 2017 wurden im Eurotransplantbereich mit 81 Transplantationszentren 2909 Nierentransplantationen mit Transplantaten von verstorbenen Spendern durchgeführt, davon 1276 in Deutschland. 7620 Patienten standen in Deutschland in diesem Jahr auf der Warteliste für eine isolierte Nierentransplantation (www.statistics.eurotransplant.org).

Im Transplantationszentrum des Universitätsklinikums Giessen Marburg (UKGM) wurden am Standort Giessen von 1993 (Start des Nierentransplantationsprogrammes) bis Ende 2018 923 Nieren transplantiert, davon 308 Lebendspenden. Im Jahr 2017 wurden 26 Transplantationen durchgeführt, davon 7 Lebend-Transplantationen. 1 dieser 26 Transplantationen konnte blutgruppeninkompatibel (AB0i) übertragen werden. Im Jahr 2018 wurden insgesamt 28 Nierentransplantationen durchgeführt, wobei 13 davon als Lebend-Transplantation durchgeführt wurden und 5 als AB0i-Transplantationen.

Im Januar 2019 warteten 132 Patienten auf ein Transplantat. Die durchschnittliche Wartezeit auf eine Nierentransplantation nach postmortaler Spende beträgt aktuell im Mittel 7 - 9 Jahre.

Im Langzeitverlauf nach Nierentransplantation stellt die chronische Transplantat-dysfunktion (CTD = chronic transplant dysfunction (s. Kapitel 1.3.), ursprünglich bekannt als chronic allograft nephropathy = CAN), die Hauptursache von spätem Transplantatversagen dar (Nankivell et al. 2005).

1978 wurde mit Ciclosporin A zum ersten Mal ein Medikament zur selektiven Immunsuppression in der Transplantationsmedizin eingesetzt. Tacrolimus wurde 1994 zugelass-

sen. 1995 kam Mycophenolat-Mofetil für die Immunsuppression nach Transplantationen dazu. Diese Medikamente bestimmten weitestgehend die Therapiemöglichkeiten zur Vermeidung von Abstoßungsreaktionen. In den nachfolgenden Jahren wurden trotz vieler Forschungsvorhaben nur noch wenige Medikamente zur Immunsuppression nach Transplantation zugelassen. So kamen lediglich 2001 Sirolimus und 2011 Belatacept hinzu.

Mittels dieser Immunsuppressiva ist es gelungen, die Inzidenz akuter Abstoßungen zu verringern. Es konnte so insbesondere die Kurzzeitüberlebensrate verbessert werden. Es steht aber weiterhin keine etablierte Therapie der chronischen Transplantatdysfunktion zur Verfügung, durch die eine deutliche Verbesserung der Langzeitüberlebensrate erreicht werden könnte.

Grundsätzlich ist die Indikation für eine Nierentransplantation die dialysepflichtige chronische Niereninsuffizienz.

Die chronische Niereninsuffizienz wird nach DOQI Guidelines von 2003 (www.kidney.org, Morath et al. 2010) in 5 Stadien unterteilt. Dabei findet man im Stadium 1 einen Nierenschaden bei normaler GFR. Im Stadium 2 findet sich eine milde Reduktion der GFR (60 -89 ml/min). Im Stadium 3 ist die GFR auf 30 -59 ml/min reduziert. Im Stadium 4 findet sich eine schwere Reduktion der GFR (auf 15-29 ml/min), welche die Vorbereitung zur Nierenersatztherapie notwendig macht. Im Stadium 5 schließlich ist die GFR auf <15 ml/min reduziert, und es muss ein Nieren-ersatzverfahren angewandt werden.

Eine Aktualisierung der Einteilung der chronischen Niereninsuffizienz, in der neben der GFR auch die Albuminurie sowie die Grunderkrankung Berücksichtigung finden, stellte Vassalotti 2016 vor.

Unter chronischer Niereninsuffizienz versteht man also die zunehmende Verminderung der glomerulären, tubulären und endokrinen Funktionen beider Nieren, messbar an der eingeschränkten GFR, die näherungsweise durch die Kreatinin-Clearance bestimmt werden kann. Die Elimination harnpflichtiger Substanzen ist eingeschränkt, es tritt eine Albuminurie auf (gemessen wird die Albuminurie/Kreatinin-Ratio).

In der Folge entwickelt sich in der Regel ein renaler Hypertonus, renale Osteopathie und Anämien sowie ein sekundärer Hyperparathyreoidismus.

Erkrankungen wie Diabetes mellitus Typ I und II, arterieller Hypertonus, chronische Glomerulonephritiden u.v.m. können eine chronische Niereninsuffizienz verursachen. Häufigste Ursachen in der Patientengruppe der vorliegenden Arbeit sind die chronische Glomerulonephritis und die diabetische Nephropathie.

Auch nach Vassalotti et al. (2016) stellen Diabetes und arterieller Hypertonus die häufigsten Ursachen für eine chronische Niereninsuffizienz dar. Sie schlagen deshalb zur Vermeidung des Fortschreitens der chronischen Niereninsuffizienz Interventionen wie Blutdruckeinstellung $< 140/90$ mmHg, Einstellung des Diabetes, Korrektur der metabolischen Azidose und den Einsatz von ACE-Hemmern oder AT-I-Blockern zur Verbesserung von Albuminurie und Hypertonus vor.

Ist die Niereninsuffizienz nur noch mit Nierenersatzverfahren (Dialyse) zu behandeln, kann die Nierentransplantation für die Patienten eine Option darstellen.

Die Bundesärztekammer gibt in ihren Richtlinien für die Wartelistenführung und Organvermittlung zur Nierentransplantation Kontraindikationen für eine Transplantation an. Diese bestehen in nicht-kurativ behandelbaren bösartigen Erkrankungen (sofern sie nicht der Grund für die Transplantation sind), in klinisch manifesten Infektionen oder Infektionserkrankungen, welche sich durch Immunsuppression verschlimmern, in schwerwiegenden Erkrankungen anderer Organe sowie in vorhersehbaren operativ-technischen Problemen. Weitere Kontraindikationen bestehen in mangelnder Compliance des Patienten und Drogenabusus.

Generell kann man sagen, dass man unter Transplantation die Übertragung von Organen, Gewebe bzw. Zellen eines Spenders (Donor) auf einen Empfänger (Rezipienten) versteht. Im vorliegenden Fall der Nierentransplantation handelt es sich um eine allogene, heterotope Transplantation, da das Organ nicht in seine ursprüngliche Position eingepflanzt wird im Gegensatz zur orthotopen Transplantation, bei welcher das Organ an die anatomisch korrekte Position eingepflanzt wird. Unter allogener Transplantation versteht man die Übertragung von Organen (Gewebe, Zellen) zwischen Individuen derselben Spezies. Würde man Gewebe zwischen Individuen verschiedener Spezies über-

tragen, spricht man von xenogener Transplantation (Beispiel: kardialer Klappenersatz von Schweinen bei Menschen).

Es gibt Patienten mit einer terminalen Niereninsuffizienz, welche immunisiert sind und somit ein höheres Abstoßungsrisiko nach Transplantation aufweisen. Dies bedeutet, dass bei diesen Patienten Panel-reaktive Antikörper (PRA) > 5% vorlagen. Panel-reaktive Antikörper sind Anti-HLA-Antikörper, die gegen „fremde“ HLA-Klasse-I und/oder HLA-Klasse-II-Antigene gebildet werden und somit zur Abstoßung eines Transplantates führen können. PRA entstehen durch vorangegangene Transplantation sowie durch Transfusionen oder Schwangerschaften.

Patienten mit einer simultanen Inselzell-Nierentransplantation (SIK) gehören nicht zur immunologischen Risikogruppe. Bei einer Rejektion droht diesen Patienten jedoch der sofortige und endgültige Verlust der Inselzellfunktion, so dass eine intensivierete Immunsuppression verwendet wird.

Diese Patienten mit erhöhtem immunologischem Risiko müssen zum Transplantationszeitpunkt und im postoperativen Verlauf eine stärkere immunsuppressive Behandlung erfahren (z.B. eine ATG-Induktionstherapie). Die Langzeiteffekte dieser ATG-Induktionstherapie wurden in der vorliegenden prospektiven Studie untersucht.

1.2. Akute Rejektion

Man unterscheidet bei der Abstoßungsreaktion die T-Zell-vermittelte Transplantatabstoßung (zelluläre Immunantwort) von der Antikörper-vermittelten (humoralen) Transplantatabstoßung. Bei erstgenannter Möglichkeit werden T-Helferzellen und zytotoxische T-Zellen nach Erkennung von Fremd-MHC-Molekülen aktiviert. Bei der antikörpervermittelten Abstoßungsreaktion lösen Antikörper insbesondere eine Komplementaktivierung aus (humorale Immunantwort), was zur Lyse der antikörpermarkierten Zellen führt.

Man unterscheidet die akute Rejektion von der hyperakuten und der akzelerierten Rejektion.

Bei der hyperakuten Abstoßung handelt es sich um eine binnen Minuten nach Anastomoseneröffnung ablaufende Abstoßungsreaktion, ausgelöst durch präformierte, d.h. zum Zeitpunkt der Transplantation im Serum des Empfängers zirkulierende Antikörper ge-

gen Antigene auf den Endothelzellen des Transplantates, z.B. Blutgruppenantigene oder HLA-Antigene. Es resultiert eine Komplementaktivierung und Endothelschädigung im Transplantat mit Thrombosierung der Transplantatgefäße.

Die akzelerierte Rejektion tritt 2-5 Tage nach Transplantation auf, basiert auf einer zellulären und humoralen Immunantwort und wird durch bereits zum Transplantationszeitpunkt vorhandene Memory-Zellen (aus B- und T-Lymphozyten) hervorgerufen, welche die Spenderantigene erkennen.

Unter einer akuten Abstoßungsreaktion versteht man einen Prozeß, der frühestens 10-14 Tage nach Transplantation auftritt, bei dem es sich um eine allogene Primärreaktion gegen Spenderantigene handelt. Dabei unterscheidet man die akute zelluläre Rejektion als häufigste Form, bei der mononukleäre Zellen, insbesondere zytotoxische CD8⁺T-Zellen auf Antigene des Transplantates reagieren, so dass eine Zerstörung von Spenderzellen, Gewebszerfall und interstitielle Entzündungen hervorgerufen werden. Die akute humorale Rejektion wird definiert durch Funktionsminderung des Transplantates, histologisch gesicherte Parenchymschädigung, klassischerweise durch den linearen C4d-Nachweis in peritubulären Kapillaren (häufig jedoch nicht vorliegend) sowie durch den Nachweis donorspezifischer Antikörper.

Die Therapie der zellulären akuten Abstoßung besteht primär in der Steroidstoßtherapie (z.B. 6 Tage je 250 mg Methylprednisolon i. v.)

Im Gegensatz dazu steht die sowohl immunologisch als auch nicht-immunologisch bedingte chronische Transplantatdysfunktion, welche sich Monate bis Jahre nach Transplantation entwickelt. Während die akute Rejektion mittlerweile gut behandelt werden kann, stellt die chronische Transplantatdysfunktion weiterhin ein großes Problem dar.

1.3. Chronische Transplantatdysfunktion

Die chronische Transplantatdysfunktion (früher bezeichnet als „chronic allograft nephropathy“=CAN, heute auch als interstitielle Fibrose/Tubulusatrophie (IF/TA), bezeichnet) wird definiert als eine fortschreitende renale Dysfunktion, die klinisch meist mit arteriellem Hypertonus und Proteinurie sowie mit histologischen Veränderungen einhergeht. Auch okklusive Gefäßveränderungen durch Transplantatvaskulopathie kön-

nen auftreten. Andere Ursachen einer Funktionsverschlechterung wie Nierenarterienstenose des Transplantates oder Calcineurininhibitor-Nephrotoxizität (welche charakterisiert ist durch arterioläre Hyalinose und zunehmende ischämische Glomerulosklerose) sind auszuschließen (Weimer et al. 2003, Nankivell et al. 2003, Frimat et al. 2006).

Die chronische Transplantatdysfunktion ist eine Veränderung multifaktorieller Genese, welche durch immunologische und nicht-immunologische Faktoren bedingt wird (Kermmann et al. 1997, Meier et al. 2006). Ihre Entwicklung setzt frühestens 3 – 6 Monate nach Transplantation ein und nimmt mehrere Monate bis Jahre bis zum Eintreten des Transplantatverlustes in Anspruch.

Zu den immunologischen Faktoren gehören hauptsächlich die Bildung donorpezifischer Antikörper, sekundär immunologische Aktivierung nach Infektion mit dem Cytomegalie-Virus oder die Reduktion der Immunsuppression im Rahmen einer BK-Virus-Nephropathie (Matas et al. 1994, Chapman et al. 2005), akute Abstoßungen (Meier-Kriesche et al. 2004, Kandaswamy et al. 2005) sowie immunologisch ausgelöste Fibrose und Transplantatvaskulopathie (Hack et al. 2008). Die Hauptursache der chronischen Transplantatdysfunktion stellt dabei die chronisch humorale (antikörperabhängige) Rejektion dar. Zusätzlich besteht in der mangelnden Compliance der Patienten eine wesentliche Ursache für die Entstehung chronisch humoraler Rejektionen.

Zu den nicht-immunologischen Faktoren gehören in erster Linie der arterielle Hypertonus (Opelz et al. 1998). Trotz des Einsatzes von Antihypertensiva lagen demnach etwa 55% aller Transplantatempfänger 1 Jahr nach Transplantation über einem Wert von 140/90 mmHg. Weitere nicht-immunologische Faktoren sind Geschlecht, Diabetes, Körpergewicht sowie verringerte Primärfunktion des Spenderorgans (Blume et al. 2006). Ausserdem beeinflussen das Vorliegen eines Diabetes mellitus Typ II, Empfängeralter (Woo et al. 1999), Spenderalter (Cosio et al. 2003), Kalt-/Warmischämiezeit, Hirntod des Spenders, verzögerter Funktionsbeginn des Transplantates (Racusen et al. 2004, Merville et al. 2004, Kamar et al. 2006), Glomerulonephritiden (de-novo-Glomerulonephritis bzw. Rezidiv der renalen Grunderkrankung), renale Kalzinose sowie präexistente Donorerkrankungen (Nankivell et al. 2003, Chapman et al. 2005) als nicht-immunologische Faktoren das Auftreten einer chronischen Transplantatdysfunktion.

Die Diagnose der chronischen Transplantatdysfunktion wird durch Klinik, Biopsie und gegebenenfalls durch Ausschluss einer Transplantat-Nierenarterienstenose gestellt.

Klinisch finden sich bei chronischer Transplantatdysfunktion eine Proteinurie (Mas et al. 2007), in der Regel ein Hypertonus sowie ein allmählicher Anstieg des Serumkreatinins bzw. eine Abnahme der glomerulären Filtrationsrate (GFR). Es treten eine verminderte tubuläre Funktion (was sich in Veränderungen des Elektrolythaushaltes zeigt), verminderter Blutfluss in den renalen Gefäßen (was zum renalen Hypertonus führt) und auch eine verminderte glomeruläre Funktion auf.

Biopsisch finden sich die o.g. Veränderungen (interstitielle Fibrose und tubuläre Atrophie, z.T. okklusive Gefäßveränderungen und Glomerulosklerose). Es ist aber bekannt, dass eine IF/TA einer Verschlechterung der Transplantatfunktion vorausgehen kann und umgekehrt eine Transplantatfunktionsverschlechterung auch ohne den Nachweis einer IF/TA eintreten kann (Mengel 2010). Die histologischen Veränderungen werden nach der BANFF 07 classification of renal allograft pathology (Halloran et al. 2004, Solez et al. 2008) oder nach dem CADI-Score (chronic allograft disease index) eingeteilt (Yilmaz et al. 2003). Im CADI-Score werden 6 verschiedene histopathologische Läsionen unterschieden, die mit der Transplantatfunktion korrelieren. Dazu gehören: interstitielle und inflammatorische Läsionen, tubuläre Atrophie, interstitielle Fibrose, Verdickung der arteriellen Intima sowie glomeruläre mesangiale Matrixzunahme.

In der GoCar-Studie (O'Connell et al. 2016) wurden Genexpressionsanalysen durchgeführt, um Gene zu identifizieren, die 12 Monate nach Transplantation mit einem erhöhten CADI-Score einhergehen, obwohl eine interstitielle Fibrose zu diesem Zeitpunkt noch nicht nachweisbar ist. Ziel war es, eine Transplantatfibrose vorauszusagen und die medikamentöse Therapie anzupassen. Dabei konnten 13 Gene identifiziert werden, welche mit einem höheren Risiko der Entwicklung einer Transplantatfibrose 1 Jahr nach Transplantation einhergehen.

Unter Glomerulosklerose versteht man die Vernarbung der Kapillaren im Glomerulus. Dies kann beispielsweise immunologisch ausgelöst werden durch anti-HLA-Antikörpervermittelte Endothelschädigung oder nicht-immunologisch durch Einlagerung von Hyalin oder Bindung von Glukose an Matrix-Proteine der Glomeruli, wie es beim Diabetes mellitus vorkommt. Der histopathologische Nachweis einer antikörpervermittelten Ab-

stoßungsreaktion gelingt durch die klassischerweise lineare C4d-Färbung entlang des Endothels peritubulärer Kapillaren. Bei einem Großteil chronisch-humoraler Rejektionen fehlt jedoch ein linearer C4d-Nachweis in peritubulären Kapillaren.

In der Vergangenheit wurde für die Symptome, die eine chronische Transplantatdysfunktion ausmachen, oft die Begriffe „chronische Abstoßung“ (chronic rejection=CR), später abgelöst durch den Begriff „chronic allograft nephropathy“ = CAN gebraucht. CAN wurde zunächst durch die BANFF-Arbeitsgruppe als deskriptiver Begriff eingeführt. Da die Ursachen aber nicht immer immunologischer Natur und damit auf einen Abstoßungsprozess zurückzuführen sind, sondern viele weitere Ursachen nicht-immunologisch bedingt sind, spricht man nun vielmehr von der chronischen Transplantatdysfunktion (Chapman et al. 2005).

Heute wissen wir, dass die Hauptursache der chronischen Transplantatdysfunktion und somit des späten Transplantatverlustes die chronisch-humorale Rejektion ist (Legris et al. 2016).

1.4. ATG-Induktionstherapie

Der Transplantation schließt sich die medikamentöse immunsuppressive Erhaltungstherapie an. Diese kann akute Abstoßungen abwenden und soll chronische Transplantatfunktionsverluste vermeiden.

In einigen Fällen kann zusätzlich eine Induktionstherapie zum Zeitpunkt der Transplantation erforderlich sein.

Die perioperative ATG-Induktionstherapie hat sich als sinnvoll für immunologische Risikopatienten erwiesen, da sie die Rate an akuten Abstoßungen und die Inzidenz an verzögerter Transplantatfunktion (delayed graft function) vermindert (Yussim et al. 2000, Djamali et al. 2000, Weimer et al. 2005, Sheashaa et al. 2008).

ATG (=Anti-Thymozyten-Globulin) ist ein polyklonaler Antikörper gegen humane Lymphozyten. Die Herstellung erfolgt unterschiedlich: ATG-Fresenius® bzw. mit durch Firmenwechsel neuem Namen Grafalon® wird aus dem Serum von zuvor mit menschlichen T-Lymphoblasten (Jurkat-Zelllinie, eine Leukämiezelllinie) immunisierten Kaninchen gewonnen. Thymoglobulin® dagegen wird aus dem Serum von zuvor mit mensch-

lichen Thymozyten immunisierten Kaninchen hergestellt. Diese Thymozyten werden aus OP-Präparaten von Kindern im Rahmen von Thoraxeingriffen rekrutiert. Davon unterscheidet man Anti-Lymphozyten-Globulin (ALG), welches durch die Immunisierung von Kaninchen oder Pferden mit menschlichen Lymphozyten gewonnen wird.

ATG hat verschiedene immunologische, insbesondere transplantatprotektive Effekte. Diese Effekte beruhen auf einem Abbau von T-Zellen im Blut und lymphatischen Gewebe, in der Veränderung von Oberflächenmolekülen, welche die Interaktion zwischen Leukozyten und Endothel bzw. T-Zellen und Antigenpräsentierenden Zellen regulieren. Zusätzlich bewirkt ATG eine Apoptose in mononukleären Zellen (auch von B-Zellen und Plasmazellen) sowie die Induktion von Treg-Zellen (regulatorischen T-Zellen) und NK-T-Zellen (Natürliche-Killer-T-Zellen) (Tang et al. 2012).

Diese immunregulierenden Effekte erklären möglicherweise das erhöhte Infektionsrisiko der Transplantatempfänger nach Transplantation (Müller et al. 1997, Weimer et al. 2005). Sie wurden als *in vitro*- bzw. *in vivo*-Effekte nach frühzeitiger ATG-Induktion beschrieben.

ATG bewirkt im Transplantatempfänger eine ADCC (antibody dependent cellular cytotoxicity = Antikörperabhängige, zellvermittelte Zytotoxizität) und eine Komplementlyse. ATG führt zur ausgeprägten Immunsuppression (Thibaudin et al. 2008), indem es an eine Vielzahl von T-Zell-Oberflächen-Antigenen bindet, aber auch an NK-Zellen und B-Zellen. Daraus resultiert ein schneller Abbau von T-Zellen mit Lymphozytopenie. Weitere Nebenwirkungen von ATG bestehen in Leuko- und Thrombozytopenie mit erhöhtem Risiko an Infektionen und Fieber, Anämie und Serumkrankheit. Zusätzlich konnte beobachtet werden (Tian et al. 2009), dass bei Patienten nach ATG-Induktionstherapie signifikant häufiger eine CMV-Infektion zu beobachten ist.

Die ATG-Induktionstherapie wird aufgrund der o.g. Nebenwirkungen durchaus kontrovers diskutiert, da das erhöhte Risiko an Infektionen und Malignomen erneut Risiken für Transplantat und Transplantatempfänger aufweist.

Thibaudin et al. (1998), Meier-Kriesche et al. (2002), Weimer et al. (2005), Kim et al. (2008), Liu et al. (2010) sowie Tang et al. (2012) hatten bereits gezeigt, dass Kaninchen ATG eine ausgeprägte Verminderung der CD4⁺-Zellzahl induziert, die Jahre nach der

Applikation nachweisbar ist. Außerdem führt es zu einer funktionellen Beeinträchtigung der Th1-Antwort aus CD4+-T-Zellen (also der IL-2-Antwort aus CD4-Zellen, CD28-Expression), jedoch nicht zu einer Beeinflussung der Th2-Antwort aus CD4+-T-Zellen. Dies konnte bis zu 1 Jahr nach Transplantation beobachtet werden. Daraus ließ sich vermuten, dass diese inadäquate T-Zell-Kontrolle Ursache für das Auftreten von Infektionen und Posttransplantationslymphomen (PTLD) sein könnte. Im Gegensatz dazu zeigt die Th2-Antwort (CD4-Helferzell-Antwort, IL-4 und IL-10-Produktion von CD4+-Zellen, sCD30) keine Veränderung.

Was sind aber die Langzeit-Effekte? Welche langwirkenden immunologischen Eigenschaften der ATG-Induktion sind verantwortlich für die Transplantatprotektion oder - im Gegensatz dazu - für die schädliche Wirkung wie das erhöhte Infektionsrisiko oder die Entstehung von Malignomen?

Unsere Annahme besteht darin, dass die dauerhaft verminderte Funktion von CD4+T-Zellen eine größere Rolle spielen könnte als die durch ATG-Induktion numerisch verminderte Anzahl der CD4-Zellen im peripheren Blut.

ATG wird in der Nierentransplantation insbesondere Patienten verabreicht, welche einer immunologischen Risikogruppe angehören (Thibaudin et al. 1998, Weimer et al. 2005). Dabei ist es nicht auf den Bereich der Nierentransplantationen beschränkt, sondern findet im gesamten Gebiet der Transplantationsmedizin Anwendung.

Weitere Möglichkeiten der Induktionstherapie bestehen in der Gabe von Alemtuzumab (monoklonaler Antikörper, der spezifisch an CD52 bindet, welches auf der Zelloberfläche von B- und T-Lymphozyten sowie von Monozyten und dendritischen Zellen vorkommt), Basiliximab bzw. Daclizumab (monoklonale Antikörper gegen die alpha-Kette des IL-2-Rezeptors = CD25).

Um die Langzeiteffekte der ATG-Induktion zum Zeitpunkt 2 Jahre und 5 Jahre nach Transplantation zu analysieren wurde vorliegende Studie durchgeführt. Dabei wurden sensitive intrazelluläre Zytokinanalysen anstatt des weniger sensitiven ELISA-Messverfahrens für Zytokinbestimmungen in Zellkulturüberständen (Weimer et al. 2005) eingesetzt. Es wurde dieselbe prospektive Studie mit 84 Nierentransplantatempfängern bis 5

Jahre nach Transplantation fortgesetzt. 44 dieser Transplantatempfänger erhielten eine ATG-Induktionstherapie.

1.5. Immunsuppressive Erhaltungstherapie

Für die immunsuppressive Erhaltungstherapie standen Ciclosporin A, Tacrolimus, Mycophenolat-Mofetil, Azathioprin und Sirolimus zur Verfügung.

1.5.1. Ciclosporin A (Sandimmun optoral® und Generika)

Ciclosporin A (CsA) ist ein Calcineurininhibitor, ein Protein, welches aus dem Pilz *Trochoderma inflatum* isoliert und 1978 zum ersten Mal in der Transplantationsmedizin eingesetzt wurde. Hierdurch wurde diese weitreichend revolutioniert. Seine Wirkung besteht hauptsächlich in der Hemmung der IL-2-Sekretion. Die Hemmung der IL-2-Produktion korreliert signifikant mit der Wirkstoffkonzentration von CsA. Der größte immunsuppressive Effekt wird ca. 2 h nach der oralen Medikamenteneinnahme erreicht.

CsA bindet an den Rezeptor Cyclophilin. Dieser Komplex hemmt Calcineurin, welches eine Proteinphosphatase ist und die Aktivierung von T-Zellen (insbesondere von TH1-Zellen) durch den Transkriptionsfaktor NFAT (nukleärer Faktor aktivierter T-Zellen) vermittelt.

CsA hat die Inzidenz akuter Abstoßungen reduziert und damit auch die Langzeitergebnisse der Nierentransplantation verbessert, allerdings besteht in der Calcineurininhibitortoxizität auch ein funktionslimitierender Faktor.

Die Calcineurininhibitortoxizität entsteht durch Tubulusschaden, interstitielle Fibrose und Konstriktion von Arteriolen (Guerra et al. 2007), was die GFR senkt und das Plasma-Kreatinin steigen lässt. Heute ist bekannt (Chapman et al. 2005), dass der Einsatz von CsA in der initialen Immunsuppression von großem Wert ist, um Episoden der akuten Abstoßung abzuwenden, jedoch im Langzeitverlauf ein Wechsel auf andere Immunsuppressiva diskutiert werden könnte, um den Effekt der Calcineurininhibitor-Toxizität zu vermeiden. Dabei ist jedoch zu bedenken, dass die ersten Läsionen durch diese Ne-

phrotoxizität bereits nach sechsmonatiger Gabe von CsA nachweisbar sein können (Ekberg et al. 2007).

Weitere unerwünschte Wirkungen des CsA sind arterieller Hypertonus, Hyperglykämie und Hyperlipidämie, was wiederum das Risiko einer chronischen Transplantat-dysfunktion erhöht sowie Neurotoxizität, Hyperurikämie, Hypertrichose und Gingivahyperplasie (Chang et al. 2007).

1.5.2. Tacrolimus (Prograf® und Generika)

Tacrolimus ist ebenfalls ein Calcineurininhibitor. Es handelt sich hierbei um ein makrozyklisches Lakton, welches aus dem Bakterium *Streptomyces tsukubaensis* isoliert wurde. Es weicht in seiner chemischen Struktur sehr von der des CsA ab, wirkt aber ähnlich wie CsA. Es kann jedoch in geringeren Dosen eingesetzt werden, da es einen höheren immunsuppressiven Effekt hat (10-bis 100fache Potenz des CsA).

Durch die Bindung an ein Immunophilin FKBP-12 hemmt der Komplex aus Immunsuppressivum und Immunophilin die Phosphataseaktivität von Calcineurin. So kann wie beim CsA kein Transkriptionsfaktor NFAT mehr in den Zellkern translokalisiert werden. Somit kommt es zur Suppression der Bildung von IL-2 oder IFN- γ .

Bekanntermaßen stimuliert IL-2 die TH1-Aktivität und die Aktivität von NK-Zellen. Tacrolimus hemmt außerdem die Expression des IL-2-Rezeptors und führt zur Downregulation von sCD30 und Neopterin (Weimer et al. 2006). Tacrolimus wirkt im Rahmen der Calcineurininhibitortoxizität nephrotoxisch und neurotoxisch. Es kann zur Hypertonie, Diabetes mellitus, Alopezie und Hypomagnesiämie kommen.

Tacrolimus wird in der Literatur (Webster et al. 2005, Meier-Kriesche et al. 2006, Guerra et al. 2007) gegenüber CsA favorisiert, da es Hinweise für eine geringere Nephrotoxizität gibt (Chang et al. 2007) und akute Abstoßungen unter Tacrolimus seltener auftreten (Gonzalez et al. 2007). Dagegen ist jedoch das Auftreten eines Posttransplantationsdiabetes häufiger.

Ähnlich wie bei CsA ist eine regelmäßige Talspiegelkontrolle des Tacrolimus notwendig, da die therapeutische Breite sehr gering ist und es Schwankungen in der Bioverfüg-

barkeit durch zusätzlich aufgenommene Nahrung oder Wechselwirkungen mit anderen Medikamenten geben kann.

1.5.3. Mycophenolat-Mofetil (MMF)

Man unterscheidet bei diesem Antimetaboliten zwei zugelassene Medikamente: EC-MPS=enteric-coated Mycophenolat-Na (Myfortic® und Generika) und MMF=Mycophenolat-Mofetil (CellCept® und Generika). Dabei wird im Körper das Prodrug Mycophenolat-Mofetil in die aktive Substanz MPA (Mycophenolat) umgewandelt.

MMF hemmt B- und T-Zell-Funktionen durch Inhibition der de-novo Purinsynthese. Der Salvage Pathway zur Purinsynthese, über den ca. 90% des Purinstoffwechsels läuft, wird nicht blockiert. Dies geschieht durch Hemmung der Inosin-Monophosphat-Dehydrogenase (IMPDH). Dadurch wird die DNA-Synthese durch Blockierung der Synthese des Purins als Nukleotid-Baustein gehemmt, was sich in einer Hemmung der Proliferation von B- und T-Lymphozyten äußert (Merville et al. 2004), da T- und B-Zellen im Gegensatz zu anderen Zellarten auf den de-novo-Pathway angewiesen sind. Weiterhin hemmt es die Glykosylierung von Adhäsionsmolekülen und die Bildung von zytotoxischen T-Lymphozyten sowie die Antikörperproduktion. Insgesamt hemmt es die Bildung aller weißen Blutkörperchen (Borrows et al. 2006). Zusätzlich weiß man, dass MMF die Proliferation von glatten Muskelzellen und Fibroblasten hemmt (Nankivell et al. 2007), was die Entwicklung einer chronischen Transplantatdysfunktion verringern kann. MMF hat also keinen direkten Effekt auf die Zytokinsekretion, es hemmt vielmehr die Anzahl der zytokinproduzierenden Zellen und wird als Alternative zu Azathioprin eingesetzt (Guerra et al. 2007). Die Kombination von EC-MPS bzw. MMF mit Ciclosporin A senkt die erforderliche Ciclosporin-Dosis und somit das Risiko einer calcineurininhibitorbedingten Transplantatverschlechterung.

Das magensaftresistente EC-MPS (Myfortic®) wurde aufgrund der gastrointestinalen Nebenwirkungen (Übelkeit, Erbrechen, Durchfall, Sodbrennen, Blähungen) von MMF entwickelt. Dabei muss der Körper die Umwandlung in Mycophenolsäure nicht mehr selbst vornehmen. EC-MPS und MMF werden an unterschiedlichen Stellen des Gastrointestinaltraktes resorbiert.

Die weiteren Nebenwirkungen der beiden Substanzen sind vergleichbar, deshalb wird in der vorliegenden Arbeit hauptsächlich von MMF gesprochen. Weitere Nebenwirkungen sind vor allem Anämie und Leukopenie.

Mycophenolat ist stark teratogen. In einem Rote-Hand-Brief von 02/2016 wird noch einmal ausdrücklich auf die hohe Teratogenität hingewiesen. Eine Therapie mit Mycophenolat sollte demnach erst nach Ausschluss einer Schwangerschaft begonnen werden, und es sollte unbedingt auf die Schwangerschaftsverhütung hingewiesen werden.

1.5.4. Azathioprin (Imurek® und Generika)

Azathioprin ist ein Prodrug, welches in der Leber zum eigentlichen Wirkstoff 6-Mercaptopurin metabolisiert wird. Dieses wirkt intrazellulär antiproliferativ als relativ unspezifischer Inhibitor der Zellproliferation. Es führt zur Alkylierung von DNA-Vorstufen und zur Hemmung von Enzymen (z.B. bei der Umwandlung von IMP zu AMP). Als wichtige Nebenwirkungen sind hier vor allem Blutbildveränderungen (Leukopenie, Thrombozytopenie) und Hepatotoxizität zu nennen. Bislang wurde ein Zusammenhang zwischen ultravioletter Strahlung und dem Azathioprin-Abbauprodukt 6-Thioguanin vermutet, welcher einen erhöhten Anteil an Hauttumoren unter Azathioprin-Einnahme erklärt. Jiyad et al. (2016) konnten jedoch in einer Metaanalyse mit 27 Studien keinen direkten Zusammenhang zwischen der Einnahme von Azathioprin und dem Auftreten von Hautmalignomen nachweisen.

Azathioprin ist auch in der Therapie von chronisch entzündlichen Darmerkrankungen, rheumatoider Arthritis oder des systemischen Lupus erythematodes bekannt. Azathioprin gehört zusammen mit den Steroiden zu den Immunsuppressiva, welche schon angewandt wurden, als CsA noch nicht zur Verfügung stand.

1.5.5. Sirolimus (Rapamune®)

In 2 Fällen wurden in der vorliegenden Studie Patienten auf Sirolimus (Rapamune®, Rapamycin) umgestellt.

Sirolimus ist wie Tacrolimus ein Makrolid, welches von Bakterien der Streptomyces-Gruppe (*Streptomyces hygroscopicus*) produziert wird. Es hemmt ebenfalls v.a. die Funktion von IL-2, jedoch nicht durch Hemmung von Calcineurin, sondern es bindet an einen anderen zytoplasmatischen Rezeptor (FK-binding protein 12), hemmt die Serin/Threonin-Kinase mTOR (mammalian Target of Rapamycin) und greift so später in den Effektormechanismus von IL-2 ein. Es hemmt somit die intrazelluläre Signaltransduktion nach Bindung von IL-2 an den IL-2-Rezeptor.

Unerwünschte Nebenwirkungen unter Rapamycin sind z.B. Lungentoxizität, Thrombozytopenie, Anämie, Hyperlipidämie, Hypokaliämie, Leukopenie, Arthralgien, Wundheilungsstörungen (Kandaswamy et al. 2005) und Lymphozelen (aus diesem Grund wird Rapamycin selten direkt postoperativ als Initialtherapie eingesetzt).

1.5.6. Steroide

Steroide sind in einem breiten Spektrum eingesetzte Antiphlogistika und Immunsuppressiva. Sie hemmen die antigenpräsentierende Aktivität der Monozyten, Makrophagen und B-Zellen und supprimieren die Präsentation von MHC-Molekülen an der Oberfläche. Dabei wird vor allem die Expression von IL-1, TNF-alpha und IFN-gamma gehemmt. Steroide binden im Zytoplasma an Glukokortikoidrezeptoren, werden prozessiert und in den Zellkern transloziert, wo sie an DNA-Sequenzen binden, welche dann zur Aktivierung oder Inhibition einer Genexpression führen.

Steroide werden nicht nur in der Organtransplantation verwendet, sondern auch in der Behandlung von Autoimmunerkrankungen und rheumatischen Erkrankungen u.v.m. In der Transplantationsmedizin finden Steroide sowohl in der Erhaltungstherapie als auch in der Stoßtherapie bei akuten Abstoßungsreaktionen Anwendung.

Die hemmende Wirkung von Steroiden ist reversibel, kann sich bei abruptem Absetzen aber sogar in Form eines immunologischen Rebound-Phänomens äußern, weshalb die Steroide ausgeschlichen werden müssen.

Zu beachten ist das ausgeprägte Nebenwirkungsprofil bei Steroiden, insbesondere bei hohen Dosen und langer Einnahmezeit. Es sind dabei die Hyperlipidämie, Hyperglykämie, arterieller Hypertonus, Störung der Hypothalamus-Hypophysen-Nebennieren-Achse, Osteoporose, Katarakt, Hüftkopfnekrose und die erhöhte Infektanfälligkeit zu erwähnen (Kandaswamy et al. 2005).

1.6. Vorstellung der vorliegenden Studie

Primär wurde eine randomisiert prospektive Studie durchgeführt, die die immunologischen Langzeiteffekte dreier verschiedener immunsuppressiver Erhaltungstherapien untersucht. Die Zuteilung zur immunsuppressiven Erhaltungstherapie erfolgte in drei Therapieregimen. Der Beobachtungszeitraum der Studie betrug 5 Jahre. Es wurden immunologische Untersuchungen zum Zeitpunkt 4 Monate nach Transplantation, 1 Jahr, 2 Jahre und 5 Jahre nach Transplantation durchgeführt. Die untersuchten Immunparameter und klinischen Parameter werden im Kapitel 1.7. besprochen.

Die vorliegende Untersuchung analysiert im Rahmen derselben Patientenpopulation die immunologischen Langzeiteffekte nach ATG-Induktionstherapie. Hierzu findet ein Vergleich immunologischer Parameter nach einer ATG-Induktionstherapie in einer immunologischen Risikogruppe (Definition Kapitel 1) mit einer Gruppe mit niedrigem immunologischen Risiko (welche keine ATG-Induktionstherapie erhalten hat) statt. Dabei wurde eine Gruppe von n=84 Patienten, welche sich einer Nierentransplantation oder simultanen Insel-Nierentransplantation (SIK) unterzogen hatten, untersucht. In der immunologischen Risikogruppe wurden immunisierte Patienten (d.h. PRA > 5%), Patienten mit Re-Transplantation, Patienten mit akutem Nierenversagen nach Transplantation und Patienten mit SIK zusammengefasst. Diese Patienten erhielten die ATG-Induktionstherapie mit vom Kaninchen stammendem ATG-Fresenius. Einem immunologischen Risikopatienten kein ATG zu verabreichen bedeutet ein erhöhtes Risiko für akute, insbesondere humorale Abstoßungen und somit eine erhöhte Gefahr des Transplantatverlustes. Es ist also ethisch nicht vertretbar, einem solchen Risikopatienten die ATG-Induktionstherapie vorzuenthalten. Damit war eine randomisiert prospektive Studie be-

züglich des Einsatzes von ATG nicht möglich. Mittels einer multivariaten Analyse wurden die Unterschiede zwischen diesen beiden Gruppen untersucht, um zu erfassen, mit welchen immunologischen Langzeiteffekten ATG als unabhängiger Faktor assoziiert ist. SIK-Patienten erhielten aus den oben dargestellten Gründen ebenfalls ATG und wurden daher ebenfalls in der ATG-Gruppe erfasst.

1.7. Untersuchte Parameter

1.7.1. Immunparameter

Im Folgenden sollen die klinisch relevanten Immunparameter vorgestellt werden, die in vorliegender Arbeit untersucht wurden.

Es wurde die Ausschüttung von Zytokinen, die Konzentration von Zellpopulationen und die Expression von Oberflächenmolekülen sowie die Bildung von Adhäsionsmolekülen betrachtet.

Zytokine sind Mediatorproteine sowohl der angeborenen unspezifischen Immunantwort als auch der antigenspezifischen humoralen und zellulären Immunantwort, die als Botenstoffe in immunologischen und entzündlichen Prozessen dienen. Zytokinbildung und -freisetzung ist zeitlich und räumlich begrenzt, d. h. Zytokine können in einem kurzen Zeitraum freigesetzt werden, wobei es zu einem steilen Zytokinanstieg im Gewebe bzw. im Plasma kommen kann. Zytokine sind Peptide und werden immer wieder neu gebildet. Das gleiche Zytokin kann von verschiedenen Zelltypen sezerniert werden und beeinflusst auch wiederum meist verschiedene Zelltypen (Pleiotropismus), genauso wie ein Zytokin verschiedene Aufgaben erfüllen kann, aber gleiche Effekte durch verschiedene Zytokine erreicht werden können. Sie können sich über positive oder negative Rückkopplung gegenseitig beeinflussen und wirken in der Zielzelle auf der Ebene der Transkription.

In der vorliegenden Arbeit wurden IL-2, IL-4 und IL-10 sowie die T-Zell-Proliferationskapazität bestimmt. In Zusammenarbeit mit dem Institut für Transplantationsimmunologie Heidelberg wurden in den gewonnenen Serum-Proben zusätzlich Neopterin und sCD30 sowie aus Heparinblut die CD4-Helferfunktion bestimmt. Des Weiteren wurden

aus diesen Proben die CD4⁺- und CD8⁺T-Zell-Subpopulationen sowie die Expression von Adhäsionsmolekülen, des IL-10-Rezeptors, CD28, HLA-Antikörper und IgA-anti-Fab bestimmt.

1.7.1.1. CD4⁺ T-Zellen

Unter CD4⁺T-Zellen versteht man T-Lymphozyten, welche das CD4-Antigen auf ihrer Oberfläche tragen. Sie werden auch als T-Helferzellen bezeichnet und vor allem in TH1-Zellen und TH2-Zellen unterteilt, daneben in TH9, TH17 und folliculäre T-Helferzellen (T_{fh}).

Die TH1-Zellen sind wesentlich an der zellulären Immunantwort beteiligt. Ihre Aufgabe besteht darin, durch die Freisetzung der Zytokine IL-2, IFN-gamma und TNF-alpha auch Makrophagen und deren antigenpräsentierende Funktion zu stimulieren. Weiterhin bewirken die TH1-Zellen eine gesteigerte CD28-Expression, eine Hochregulation von MHC-II-Molekülen sowie eine Steigerung der Expression der kostimulatorischen Liganden CD40, CD80 und CD86.

Die TH2-Zellen sind durch ihre Interaktion mit B-Zellen an der humoralen Immunantwort beteiligt. Sie setzen unter anderem IL-4 und IL-10 frei und beeinflussen die CD4-Helferfunktion (Raphael et al. 2015).

Die TH1- und TH2-Antwort beeinflussen und regulieren sich gegenseitig. Durch Immunsuppressiva kann das Gleichgewicht zwischen diesen beiden Gegenspielern verschoben werden (Wood et al. 2012).

Eine weitere Population CD4⁺T-Zellen besteht in den CD4⁺CD25⁺ regulatorischen T-Zellen, welche IL-4, IL-10 und TGF- β sezernieren.

1.7.1.2. CD8⁺T-Zellen

CD8⁺T-Zellen sind als T-Suppressorzellen oder zytotoxische T-Zellen bekannt. Die Aufgabe zytotoxischer T-Zellen besteht darin, im Rahmen der zellulären Immunantwort mit ihrem T-Zell-Rezeptor an die Antigene des MHC-I-Komplexes körpereigener Zellen zu binden und die Apoptose in dieser Zelle einzuleiten. Wenn die zytotoxischen T-Zel-

len ihre „Zielzelle“ erkannt haben, setzen sie zytotoxische Moleküle wie Perforin und Granzyme B frei. Perforin führt zur Porenbildung auf der „Zielzelle“ und erleichtert so das Eindringen von Granzyme B. Granzyme B ist eine Protease und kann Apoptose auf verschiedenen Wegen einleiten, so auch durch Aktivierung der Caspasen-Kaskade (Wood et al. 2012).

Zusätzlich steigern sie die Expression des Fas-Liganden an der Zelloberfläche. Dies bedeutet die Aktivierung des CD95 Pathways; alle Zellen, die auf ihrer Oberfläche den sogenannten „Todesrezeptor“ CD95 (Fas) haben und Kontakt mit dem membranständigen Oberflächenprotein CD95L (Fas-Ligand) auf z.B. zytotoxischen T-Zellen haben, lösen so intrazellulär die Caspasen-Kaskade aus, die zum Abbau der intrazellulären Strukturen und Zerteilung der Zelle führt. Dies betrifft auch körpereigene Zellen, die viral befallen sind.

Bei Nierentransplantatempfängern, die eine Abstoßung durchmachen, können erhöhte Werte von Perforin und Granzyme B im Urin nachgewiesen werden.

CD8+T-Zellen setzen IL-2 und IFN-gamma frei und stimulieren so weitere zytotoxische T-Zellen und T-Suppressorzellen sowie Natürliche Killerzellen.

Weitere CD8+T-Zellen sind die CD8+regulatorischen T-Zellen (früher T-Suppressorzellen). Diese inhibieren unter anderem die Hochregulation von Adhäsionsmolekülen in antigenpräsentierenden Zellen.

1.7.1.3. CD19+B-Zellen

CD19 ist als Oberflächenmerkmal auf allen B-Lymphozyten zu finden und Bestandteil der humoralen Immunantwort. Es wird durch Antigene aktiviert und kann zur Ausreifung von antikörperproduzierenden Plasmazellen oder Gedächtniszellen führen. Das Oberflächenmerkmal CD19 geht bei der Ausreifung verloren.

Die CD19+B-Zellen binden mit ihrem B-Zell-Rezeptor Antigene. Wenn sie vollständig aktiviert wurden durch kostimulatorische Signale von T-Helferzellen (die ebenfalls das entsprechende Antigen erkannt haben müssen), differenzieren sie zu Plasmazellen aus und bilden Antikörper gegen das Antigen (Wood et al. 2012).

Die „Zielantigene“ im Rahmen von Abstoßungsreaktionen sind nicht übereinstimmende MHC-Moleküle, Endothelzellen, Blutgruppen-Antigene sowie Autoantigene. Antikörpervermittelte Abstoßung kann wenige Tage nach Transplantation beginnen, aber gleichermaßen zu spätem Transplantatverlust beitragen, wobei der Hauptmechanismus der antikörpervermittelten Immunabwehr in der Aktivierung der Komplement-Kaskade besteht (histologisch nachweisbar durch C4d-Komplement in peritubulären Kapillaren von Biopsaten). Aber auch Rezeptoren der NK-Zellen und Makrophagen binden an die Fc-Region von Antikörpern und können so eine zelluläre Toxizität auslösen (Wood et al. 2012).

B-Zellen können ausserdem als Antigen-präsentierende Zellen fungieren. Dabei findet eine Interaktion mit dem TCR (T cell receptor) der T-Zellen und kostimulatorischen Molekülen statt.

B-Zellen sind in der Lage, zu einem Abstoßungsprozess beizutragen, wie man am Nachweis von B-Zellen und B-Zell-Gruppen feststellen konnte. Dabei ist der alleinige Nachweis des Vorliegens von B-Zellen im Transplantat nicht zwingend schädlich, da B-Zellen auch die Möglichkeit haben, regulatorischen Einfluss auf die Immunantwort zu nehmen. Le Texier et al. (2011) beschreiben, dass im Tiermodell (Ratten) auch in tolerierten Transplantaten große Mengen an B-Zellen nachweisbar waren, ähnlich wie in abgestoßenen Transplantaten, diese B-Zellen jedoch in der Ig-Klassenbildung von IgM zu IgG gehemmt werden. Dabei fiel auf, dass in den Transplantaten, die abgestoßen wurden, CD27 (ein Marker für die Aktivierung von Memory B-Zellen) deutlich erhöht war. Die IgG/IgM-Ratio war in abgestoßenen Transplantaten deutlich höher als in Transplantaten mit stabiler Funktion.

Ausserdem werden regulatorische B-Zellen beschrieben, welche eine Freisetzung von IL-10 induzieren und somit inhibierend oder aktivierend wirken (Lindner 2015).

1.7.1.4. CD69-Expression auf T-Zellen (T-Zell-Proliferationskapazität)

CD69 ist ein Molekül, welches an der Oberfläche von allen aktivierten T- und B-Lymphozyten exprimiert wird sowie auch von NK-Zellen, neutrophilen und eosinophilen Granulozyten, ebenso von Thrombozyten und Langerhans-Zellen. Es ist eines der ersten

Oberflächenmoleküle, die den Zustand von T-Lymphozyten als „aktiviert“ kennzeichnen. Innerhalb von Stunden nach Stimulation des Immunsystems wird dieses Glykoprotein exprimiert. Es wurde in der vorliegenden Arbeit bestimmt, weil CD69 als Proliferationsmarker gilt und so eine Aussage über die T-Zellproliferationskapazität zulässt (Mardiney et al. 1996, Crispin et al. 1998). Die Proliferationskapazität wird bestimmt durch die CD69-Expression in PMA/Ionomycin-stimulierten Kulturen.

Ausserdem wird die Proliferationskapazität durch die Markierung von ³H-Thymidin gemessen (Holdsworth et al. 1999).

Eine gesteigerte CD69-Expression auf CD3⁺ und CD4⁺-Zellen korreliert mit einer erhöhten Inzidenz akuter Abstoßungen. Daher ist es auch überexprimiert auf den T-Lymphozyten zu finden, welche im Rahmen einer akuten Abstoßung das Transplantat infiltrieren (Posselt et al. 2003).

1.7.1.5. Interleukin-2 (IL-2)

Interleukin-2 (IL-2) ist ein Interleukin, welches sowohl für die Induktion als auch die Regulation der T-Zell-vermittelten Immunantwort verantwortlich ist. Es wird von TH1-Zellen gebildet und stimuliert die Proliferation weiterer aktivierter T-Lymphozyten (sowie auch die Proliferation von B-Lymphozyten, NK-Zellen und Makrophagen) und nimmt gleichzeitig Einfluss auf den apoptotischen Zelltod von T-Lymphozyten. Man nimmt nach dem TH1/TH2-Modell an, dass die TH1-Synthese-Produkte mit einem verstärkten Risiko für akute Abstoßungen einhergehen (Weimer et al. 2000).

IL-2 ist ein Schlüsselmolekül der T-Zellaktivierung. Für die IL-2-Transkription ist die Phosphorylierung des Transkriptionsfaktors „nukleärer Faktor aktivierter T-Zelle“ (NFAT) aus dessen Vorstufe notwendig.

Eine Verminderung an IL-2 führt zur Verminderung der Expression des kostimulatorischen Liganden CD28, welcher eine wichtige Rolle in der Aktivierung naiver T-Zellen spielt.

T-Zellen können Antigene nur mit Hilfe von kostimulatorischen Liganden erkennen. Sind zu wenig kostimulatorische Liganden vorhanden, wechselt die T-Zelle in einen sogenannten „anergen“ Zustand und kann nicht mehr auf ein Antigen reagieren.

In der vorliegenden Arbeit wurde IL-2 bestimmt, da IL-2 als der stärkste autokrine Wachstumsfaktor für T-Zellen gilt. Dessen Sezernierung wird beispielsweise von Calcineurininhibitoren direkt gehemmt, was eine zentrale Rolle in der Vermeidung akuter Abstoßungen spielte.

1.7.1.6. Interleukin-4 (IL-4)

Dieses Interleukin wird hauptsächlich von TH2-Zellen, Mastzellen sowie CD8+T-Zellen gebildet. Es bewirkt wiederum eine Proliferation und Differenzierung weiterer CD4+T-Zellen zu TH2-Zellen und nimmt damit eine Schlüsselrolle in der humoralen Immunantwort ein. Eine gesteigerte IL-4 Sekretion von CD4+ T-Zellen geht mit einem niedrigeren Risiko für akute Abstoßungen einher (Weimer et al. 2008), insbesondere eine gesteigerte IL-4 Sekretion vor Transplantation (Weimer et al. 2011).

IL-4 ist ein wichtiges Zytokin für die B-Zell-Aktivierung und TH2-Antwort. Zusätzlich hat es antiinflammatorische Eigenschaften und hemmt initiale Schritte der B-Zell-Aktivierung (Merville et al. 1993).

Tacrolimus steigert STAT6 (signal transducer and activator of transcription 6) in Anwesenheit von IL-4, welches wahrscheinlich eine Rolle für die Tacrolimus-vermittelte Protektion vor Abstoßungsreaktionen spielt (Moffatt et al. 2000).

1.7.1.7. Interleukin-10 (IL-10)

Interleukin-10 wird von aktivierten Makrophagen, B-Zellen und CD4+T-Zellen gebildet und führt unter anderem zur Hemmung aktivierter Makrophagen (negative Rückkopplung) und der TH1-Antwort (und damit der Sekretion von IL-2) (Breulmann et al. 2007). IL-10 ist damit eines der wenigen inhibierenden Interleukine. Es ist Bestandteil der IL-10-Zytokin-Familie, welche auch IL-19, IL-20 und IL-22 einschließt. Zusammen mit Interferonen bilden sie die Klasse-2-Zytokin-Familie. Die Gemeinsamkeit besteht in der Position des Cysteins. Weiterhin dient IL-10 als potenter B-Zell-Wachstums- und Differenzierungsfaktor, der vor allem die humorale Immunantwort gegen ein Transplan-

tat aktiviert. Es spielt eine wichtige Rolle in der Bildung von donorspezifischen Antikörpern und in der Entwicklung einer chronischen Transplantatdysfunktion (Shiu et al. 2015).

Man hat festgestellt (Kobayashi et al. 1999), dass es unterschiedliche Promotor-Gen-Polymorphismen für die Regulation der IL-10-Sekretion gibt, so dass man den IL-10-high-producer vom IL-10-low-producer unterscheidet. Weimer et al. (2003) fanden heraus, dass die IL-10-high-producer unter den Transplantat-Empfängern möglicherweise ein höheres Risiko haben, eine chronische Transplantatdysfunktion zu entwickeln. Es wurde nachgewiesen, dass eine niedrige IL-10 Sekretion durch CD4+T-Zellen vor Transplantation mit einem verminderten Risiko für akute Abstoßungen und guter Transplantatfunktion 3 Jahre nach Transplantation einhergeht und IL-10 somit auch prädiktiven Charakter aufweist (Weimer et al. 1998).

Bedenkt man, dass IL-10 die Produktion von IL-2 hemmt, könnte man vermuten, dass bei erhöhter IL-10-Sekretion eine Verringerung der Gefahr von zellulären Abstoßungsreaktionen resultieren könnte. Allerdings wird die Antigenpräsentation am effektivsten von dendritischen Zellen gewährleistet, und diese werden von IL-10 nicht supprimiert (Macatonia et al. 1993, Weimer et al. 1998).

1.7.1.8. Kostimulatorische Liganden, Adhäsionsmoleküle und IL-10R

Sogenannte Adhäsionsmoleküle dienen der Bindung zwischen T-Helferzelle und Antigen-präsentierender Zelle.

Das Oberflächenprotein CD18 kommt auf allen Leukozyten vor und bildet mit CD11a (=Integrin, ein Transmembranprotein) einen Komplex (CD18/CD11a-Komplex), der das vor allem auf T-Zellen vorkommende LFA-1 (lymphocyte function associated antigen – 1) bildet und damit die Adhäsion von Leukozyten an endotheliale Zellen und nachfolgend die Leukozytendiapedese fördert.

Das Protein CD54 (=ICAM-1 = intercellular adhesion molecule) bindet diesen CD18/CD11a-Komplex und aktiviert ihn.

Das Adhäsionsmolekül CD58 (=LFA-3) wird auf antigenpräsentierenden Zellen, insbesondere den Makrophagen, exprimiert und dient der Bindung dieser an T-Zellen.

Als kostimulatorischer Ligand wurde in vorliegender Arbeit das Oberflächenprotein CD28 untersucht. Es kommt auf CD4+ und CD8+T-Zellen vor und dient durch Bindung an B7 auf antigen-präsentierenden Zellen der Bildung eines kostimulatorischen Signals, welches T-Zellen aktiviert sowie die Bildung von Interleukinen (IL-2 und IL-6) und durch IL-10 gehemmt wird.

Der IL-10-Rezeptor, bestehend aus IL-10-Rezeptor-1- und IL-10-Rezeptor-2-Ketten, kommt auf den mononukleären Zellen vor und ist Voraussetzung für die Bindung von IL-10 (Moore et al. 2001).

1.7.1.9. Neopterin

Neopterin ist ein Marker für den Aktivierungszustand des Monozyten-T-Zell-Systems und dient der Früherkennung von Abstoßungsreaktionen (Margreiter et al. 1983), aber auch von Infektionen bei HIV-Erkrankten (Fuchs et al. 1988). Durchschnittlich 2 Tage vor dem Auftreten klinischer Komplikationen steigen die Neopterin-Werte im peripheren Blut an. Zusätzlich wird es als Verlaufsparemeter bei Auto-immunerkrankungen, aber auch bei Borreliose genutzt und gilt als Risikofaktor in der Erkennung koronarer Herzerkrankungen (Firoz et al. 2015).

Der Mechanismus der Neopterin-Bildung ist folgender: T-Lymphozyten (des TH1-Typs) bilden Interferon-gamma, welches Makrophagen und dendritische Zellen zur Freisetzung von Neopterin anregt. Je mehr die TH1-Lymphozyten Interferon-gamma bilden, umso mehr Neopterin wird freigesetzt. In der Population der Patienten mit chronischer Transplantatdysfunktion wurde Neopterin (Weimer et al. 1990) erhöht gemessen.

Weimer et al. (1998, 2005) fanden weiterhin heraus, dass Neopterin 4 Monate nach Transplantation (und auch das später erläuterte lösliche CD30 (sCD30)) keinen Zusammenhang mit dem Auftreten von akuten Abstoßungsreaktionen hat und auch von einer ATG-Induktionstherapie unbeeinflusst war. Weiterhin wurde festgestellt, dass CMV-Infektionen vier Monate nach Transplantation sowohl mit einem erhöhtem Spiegel an Neopterin als auch mit einem gesteigerten Level an sCD30 einhergehen. Neopterin und

sCD30 – gemessen 1 Jahr nach Transplantation - stellen prädiktive Parameter für das Auftreten von chronischer Transplantationsfunktionsverschlechterung infolge IF/TA dar, ohne dass sCD30 mit klassischen immunologischen Risikofaktoren assoziiert werden kann (Weimer et al. 2006).

1.7.1.10. sCD30

CD30 gehört zur Familie der Tumornekrosefaktoren und wird auf T-Zellen exprimiert. Lösliches CD30 (sCD30) wird abgegeben und zirkuliert nach der Aktivierung von CD30+T-Zellen. Verschiedene Studien haben einen Zusammenhang zwischen erhöhten sCD30-Werten und erhöhten Raten an akuten Abstoßungen und Transplantatverlust gezeigt, so dass man diskutiert, ob sCD30 als prädiktiver Marker für Transplantatverlust genutzt werden kann (Süsal et al 2003, 2007).

Süsal et al. (2002) und Weimer et al. (2005,2006), haben gezeigt, dass erhöhte präoperative sCD30-Level mit einer niedrigeren 5-Jahres-Überlebensrate einhergehen. Dabei handelte es sich vorwiegend um Patienten, welche mit Ciclosporin A behandelt wurden. Es wurde in der vorliegenden Arbeit zugrundeliegenden Patientengruppe von Weimer et al. (2006) weiter gefunden, dass weder Panel-reaktive Antikörper, ATG-Induktionstherapie, die HLA-Übereinstimmung zwischen Empfänger und Transplantat noch akute Abstoßungen den sCD30 Spiegel beeinflussen. Dagegen wird sCD30 jedoch im Rahmen von CMV-Infektionen hochreguliert.

Man konnte beobachten, dass eine chronische Transplantatdysfunktion 2 Jahre nach Transplantation durch erhöhte sCD30- und Neopterin-Spiegel 1 Jahr zuvor vorhergesagt werden konnte (Weimer et al. 2006). Somit könnte ein Therapieziel in der Langzeitimmunsuppression nach Transplantation die Downregulation von sCD30 und Neopterin sein. Unter Therapie mit Tacrolimus wurden im Vergleich zu Ciclosporin A die sCD30-Spiegel signifikant downreguliert.

1.7.1.11. CD4-Helferfunktion

Die CD4-Helferfunktion gibt Auskunft über die Aktivität von bestimmten CD4+T-Zellen. Erst nachdem reife CD4+T-Zellen aktiviert worden sind, können sie sich in Effektorzellen differenzieren und eine Helferaktivität ausüben.

Die CD4-Helferfunktion wird bestimmt, indem man die Bildung Immunglobulin-sezierender Zellen (gemessen mittels eines Protein-A-Plaque Assays) in PWM (Pokeweed Mitogen) stimulierten Zellkulturen der Patienten mit der Bildung Immunglobulin-sezierender Zellen in PWM-stimulierten Zellkulturen einer Kontrollgruppe (die Bildung immunglobulin-sezierender Zellen in unstimulierten Kulturen wird jeweils subtrahiert) vergleicht (Formel siehe Kapitel 2.2.4).

Eine niedrige CD4-Helferfunktion (und niedrige IL-10-Produktion durch CD4+T-Zellen) vor Transplantation gehen mit einer niedrigen Rate an akuten Abstoßungen und besserer Transplantatfunktion einher, wie Weimer et al. (2003, 2005) feststellen konnten.

Weiter wurde dabei festgestellt, dass die CD4-Helferfunktion durch Tacrolimus herunterreguliert wurde. Gleichzeitig wurde aber bei der Behandlung mit Tacrolimus eine gesteigerte IL-10-Sekretion aus CD4+T-Zellen beobachtet. In der Kombination von Tacrolimus mit MMF allerdings blieb diese gesteigerte IL-10-Sekretion aus, so dass dabei zwei günstigere Parameterkonstellationen (erniedrigte CD4-Helferfunktion und erniedrigte CD4-Zell-Sekretion an IL-10) in Bezug auf das Risiko einer akuten Abstoßung erzielt werden konnten.

1.7.1.12. HLA-Antikörper

Das HLA-System (HLA=humane Leukozytenantigene) wird beim Menschen durch die MHC-Moleküle (Haupthistokompatibilitätsantigene) dargestellt, welche ursächlich für zelluläre und humorale Abstoßungsreaktionen sind. Eine hohe Anzahl an donorspezifischen HLA-Antikörpern könnte somit einen Risikofaktor für eine Abstoßungsreaktion darstellen. Daneben gibt es eine Reihe weiterer möglicher Histokompatibilitätsantigene (Minorantigene), welche jedoch eine nur schwache Immunreaktion auslösen können (Heinold et al. 2008). Die Funktion der MHC-Antigene besteht darin, Teile von anderen

Antigenen zu binden und an der Zelloberfläche zu präsentieren. Die genetische Kodierung für die MHC-Moleküle findet sich auf dem Chromosom 6. Man unterscheidet zwischen MHC-I-Molekülen (HLA-A, HLA-B und HLA-C) und MHC-II-Molekülen (HLA-DR, HLA-DP und HLA-DQ). Für die Verteilung der Spendernieren bei Eurotransplant waren zum Zeitpunkt unserer Studie nur HLA-A/B/DR relevant.

1.7.1.13. IgA-anti-Fab

Dabei handelt es sich um regulatorisch wirksame IgA-Autoantikörper, welche gegen die Fab-Region menschlicher Immunglobuline gerichtet sind. Ein hoher präoperativer Wert (vor Transplantation) an IgA-anti-Fab geht mit einer niedrigeren Rate an akuten Abstoßungen und einer besseren Langzeit-Transplantatfunktion einher (Süsal et al. 1997, 2000).

1.7.2. Untersuchte klinische Parameter

An klinischen Parametern wurden neben den unten aufgeführten Parametern außerdem noch die Patientenüberlebensrate, Transplantatüberlebensrate und funktionelle Transplantatüberlebensrate, chronische Transplantatdysfunktion und Proteinurie untersucht.

1.7.2.1. Infektionen

In der vorliegenden Arbeit wurde das Auftreten schwerer Infektionen bis 5 Jahre nach Transplantation untersucht. Als schwere Infektion wurde eine Infektion definiert, die eine Behandlung unter stationären Bedingungen erforderlich machte. Die Arten der Infektionen sind im Kapitel 3.1.2. unter Ergebnisse aufgeführt.

1.7.2.2. Tumore

Das vermehrte Auftreten maligner Tumoren unter Langzeitimmunsuppression hat uns veranlasst, die Anzahl maligner Tumoren im Zeitraum bis 5 Jahre nach Transplantation zu untersuchen. Dabei kommt eine besondere Bedeutung den Malignomen der Haut zu, da diese am häufigsten vorkommen. Insbesondere unter Azathioprin scheint es durch die kanzerogene Wirkung der UV-Strahlung und die abgeschwächte Immunfunktion der Hautzellen zu einem gehäuften Auftreten an Hautmalignomen zu kommen (Robbins et al. 2015). Es wird ein Zusammenhang zwischen der Entstehung maligner Tumore und dem Abfall der CD4+T-Zellzahl vermutet (Thibaudin 2005), wie sie unter der Induktionstherapie mit ATG zu beobachten ist.

1.7.2.3. Transplantatfunktion

Um die Funktion des Transplantates zu beurteilen, wurden Serumkreatinin und die gemessene Kreatininclearance bestimmt. Die Kreatininclearance ist die sensiblere Methode, um frühzeitig Nierenfunktionseinschränkungen zu erkennen. Die Plasmakonzentration im Serum steigt erst bei einem fortgeschrittenem Schaden der Nephrone an, so dass erst bei 50% Einschränkung der glomerulären Filtrationsrate ein Anstieg des Serumkreatinins zu verzeichnen ist.

1.8. Bisherige Studienergebnisse (bis 2 Jahre nach Transplantation)

Anhand der bisherigen Studienergebnisse konnte bereits gezeigt werden, dass die Induktionstherapie mit Kaninchen ATG bis 1 Jahr nach Transplantation einen starken Abfall der CD4+T-Zellen induziert und dabei insbesondere die TH1-Antwort beeinflusst (CD28-Expression und in-vitro IL-2-Sekretion) (Weimer et al. 2005).

2 Jahre nach Transplantation war die ATG-Induktion mit einer gesteigerten Anzahl schwerer Infektionen (20/44 (46%) versus 9/40 (23%) Patienten, $P = 0,027$) assoziiert. Dabei war das Auftreten schwerer Infektionen nicht auf eine verminderte CD4+T-Zell-

zahl oder verringerte IL-2-Sekretion zurückzuführen, sondern mit einer erniedrigten CD4/CD8-Ratio assoziiert (9/12 (75%) versus 16/62 (26%), $P = 0,002$). Weiterhin ging es mit einer gesteigerten Anzahl CD8+T-Zellen ($P = 0,01$) und vermehrter IL-2-Sekretion aus CD8+T-Zellen ($P = 0,02$) einher.

Die immunologischen Langzeit-Effekte einer ATG-Induktion 2 Jahre nach Transplantation beinhalteten eine signifikant verminderte T-Zell-Proliferation (CD69-Expression, $P = 0,011$) und eine verminderte intrazelluläre Zytokin-Antwort der CD4+ T-Zellen (IL-2, $P = 0,036$ und IL-10, $P = 0,004$). Dies wurde auch in einer multivariaten Analyse bestätigt. Während die verminderte IL-10-Antwort zum Teil gegenreguliert wurde (signifikanter Anstieg der IL-10R-Expression von CD4+T-Zellen, $P = 0,002$; keine Hochregulation durch CD8+T-Zellen, B-Zellen und Monozyten), fand sich keinen Anstieg der IL-2R (CD25) Expression.

Die Expression kostimulatorischer Liganden (CD28, CD40, CD40L, CD80, CD86) auf mononukleären Zellen war 2 Jahre nach Transplantation nicht beeinflusst von der ATG-Induktionstherapie.

Zusätzlich konnte mit der von Weimer et al. 2005 vorgelegten Studie herausgefunden werden, dass erhöhte sCD30-Werte (≥ 60 U/ml) und gesteigerte Neopterinpiegel (korrigiert für Transplantat-Funktion; Neo/Cr ≥ 2000 nmol/g CR) 1 Jahr nach Transplantation eine Transplantatverschlechterung durch chronische Transplantat-Dysfunktion 2 Jahre nach Transplantation vorhersagen ließen.

1.9. Studienziele

Für die vorliegende Arbeit ergaben sich folgende Fragestellungen:

- 1. Hat die ATG-Induktionstherapie bei Nierentransplantatempfängern Langzeiteffekte auf transplantatprotektive Parameter? Zu diesen protektiven Parametern zählen nachgewiesenermaßen die CD4-Helferfunktion, IL-4 und IL-10-Antwort aus CD4+T-Zellen, sCD30 und Neopterin.**
- 2. Sind die Langzeiteffekte der ATG-Induktionstherapie auf die CD4+T-Zellkonzentration relevant für diese transplantatprotektiven Effekte? Geht eine Reduktion der CD4+T-Zellzahl mit funktionellen Störungen der CD4+T-Zellen einher?**
- 3. Hat die ATG-Induktionstherapie Langzeiteffekte auf andere Lymphozytenpopulationen, Zytokinrezeptoren, kostimulatorische Liganden, Adhäsionsmoleküle oder IgA-anti-Fab?**

2. Patienten, Material und Methoden

2.1. Patienten

84 Patienten wurden vor Nierentransplantation bzw. einer kombinierten Nieren/Inselzell-Transplantation (1998 - 2000), prospektiv in die einzelnen Gruppen der Immunsuppression (Ciclosporin A/Azathioprin, Ciclosporin A/Mycophenolat-Mofetil und Tacrolimus/Azathioprin) randomisiert. Prednisolon wurde allen Patienten zu Beginn verabreicht und frühestens nach 6 Monaten begonnen auszuschleichen. Das Follow-up betrug 5 Jahre.

Bei n = 44 Patienten wurde aufgrund einer immunologischen Risikokonstellation (Re-Transplantation, PRA > 5%, akutes Nierenversagen nach Transplantation) bzw. wegen simultaner Nieren/Inselzelltransplantation (n=8) eine ATG-Induktionstherapie durchgeführt. Bei n = 40 Patienten fand diese Induktionstherapie nicht statt (Non-ATG-Gruppe). In der Gruppe der ATG-Patienten konnten bei 30 Patienten die 5-Jahres-Untersuchungen der vorliegenden Studie bei funktionierendem Transplantat durchgeführt werden, 2 Patienten verweigerten die Blutentnahme zur Durchführung der Untersuchung, 4 waren verstorben und 8 Patienten hatten einen Transplantat-Verlust erlitten.

In der Non-ATG-Gruppe konnten diese Untersuchungen bei 34 Patienten mit funktionierendem Transplantat durchgeführt werden. Ebenfalls 2 Patienten hatten die Studienteilnahme verweigert, 4 Patienten hatten einen Transplantatverlust erlitten, verstorben war in dieser Gruppe keiner.

Keiner der Patienten erhielt eine andere Induktionstherapie (wie z.B. CD25-Antikörper). ATG wurde auch bei keinem Patienten im Verlauf nach Transplantation verabreicht.

Tabelle 1: Klinische Daten und Transplantationsdaten der Patienten in der ATG-Gruppe bzw. in der Non-ATG-Gruppe

	ATG	Non-ATG	p
n	44	40	
Alter des Empfängers (in Jahren)	48±2	44±2	0,223
Nierenersatzverfahren ¹	86% - 9% - 5%	85% - 13% -3%	0,893
Wartezeit in Monaten	56±7	63±15	0,632
Lebendspende ²	14% (6)	38% (15)	0,012
SIK ²	18% (8)	0% (0)	0,006
Anzahl der Re-Transplantationen	27% (12)	0% (0)	0,002
PRA max ³	11±2 %	4±1 %	0,007
Bluttransfusionen	6,3±2,0	1,8±0,6	0,008
Schwangerschaften	36% (16)	18% (7)	0,053
Spenderalter (in Jahren)	47±2	47±2	0,921
HLA-A, B, DR Mismatches	3,0±0,2	2,0±0,2	0,031
HLA-B, DR Mismatches	2,1±0,2	1,4±0,2	0,004
Kaltischämiezeit (in Stunden)	15,2±1,0	8,9±1,0	<0,001
Initiale Immunsuppression CsA/Aza – CsA/MMF – Tacr/Aza ⁴	34% - 34% - 32%	25% - 40% -35%	0,656
5-Jahres-Immunsuppression CsA/Aza - CsA/MMF - Tacr/Aza - Tacr/MMF - CsA - Tacr - Aza - Tacr/MMF/SRL	6% - 28% - 25% - 13% - 16% - 9% - 0% - 3%	11% - 22% - 28% - 25% - 3% - 8% - 3% - 0%	0,403
CsA-Dosis (mg/Tag)	173±14	206±18	0,230
CsA-Talspiegel (ng/ml)	140±16	139±12	0,976
Tacr-Dosis (mg/Tag)	3,7±0,8	2,9±0,3	0,784
Tacr-Talspiegel (ng/ml)	6,0±0,5	6,5±0,5	0,604
MMF-Dosis (mg/Tag)	1018±140	850±116	0,367
Azathioprin-Dosis (mg/Tag)	42±5	70±7	0,020
Prednisolon-Dosis (mg/Tag)	2,7±0,6	2,0±0,6	0,176
steroidfrei	44% (14/32)	61% (22/36)	0,152

¹ Hämodialyse-Peritonealdialyse-Präemptive Transplantation (preemptive transplantation)

² Prozentzahl der Patienten, welche eine Lebendspende (n = 27) bzw. eine simultane Insel- /Nierentransplantation (SIK; n = 8) erhielten

³ PRA max = maximale Panel-reaktive Antikörper vor Transplantation

⁴ initiale immunsuppressive Therapie; die immunsuppressive Therapie 2 Jahre nach Transplantation ergab keine signifikanten Unterschiede zwischen der ATG- und der Non-ATG-Gruppe

Es handelt sich hierbei um eine prospektive, randomisierte Studie. Die Patienten wurden für eine der drei Gruppen der Basis-Immunsuppression randomisiert. Für die ATG-Induktion fand aus ethischen Gründen keine Randomisierung statt. Eine ATG-Induktionstherapie senkt das Risiko von akuten Abstoßungen bei immunologischen Risikopatienten. Eine Randomisierung könnte das Vorenthalten einer solchen Therapie für einen immunologischen Risikopatienten bedeuten und mit einem höheren Risiko des Transplantatverlustes einhergehen.

Für die ATG-Induktionstherapie wurde Kaninchen ATG von Fresenius® eingesetzt. Es wurde jenen Patienten verabreicht, die immunisiert waren (PRA > 5% sowie bei Re-Transplantationen, akutem Nierenversagen nach Transplantation, ausserdem bei 8 Patienten, welche eine SIK bekamen). Demzufolge war die Gruppe der Patienten, welche ATG bekamen, eine immunologische Risikogruppe.

ATG wurde nur als Induktionstherapie eingesetzt, nicht als Abstoßungstherapie.

Die ATG-Dosis betrug 4 mg/kg und wurde 8,6±0,4 Tage verabreicht. Es wurde von Kaninchen gewonnen, welche mit Zellen der Jurkat-Linie immunisiert wurden. Dies kann dazu führen, dass sich die ATG-abhängigen Ergebnisse der vorliegenden Studie von denen anderer ATG-Zubereitungen unterscheiden (z.B. wenn Kaninchen mit menschlichen Thymuszellen immunisiert wurden). Anti-CD25-Antikörper (Antikörper gegen die Alpha-Kette des IL-2-Rezeptors) wurden in der vorliegenden Studie nicht eingesetzt.

Die Basis-Immunsuppressionen und die Medikamentenlevel im Serum waren ebenso wie die Steroid-Dosierungen zwischen ATG-Gruppe und Non-ATG-Gruppe vergleichbar (Tabelle 1).

Bei den Patienten, welche in die vorliegende Studie eingeschlossen wurden, waren folgende Erkrankungen Ursachen der terminalen Niereninsuffizienz: Verdacht auf chronische Glomerulonephritis (bioptisch nicht bestätigt; n=27), Diabetes mellitus Typ I (n=13), ADPKD (autosomal dominante polyzystische Nierenerkrankung; n=5), IgA-Nephropathie (n=17), Diabetes mellitus Typ II (n=4), MELAS-Syndrom (mitochondriale Enzephalomyopathie mit Myopathie, Enzephalopathie, Laktatazidose und Schlaganfälle; n=2, Geschwister), chronische Pyelonephritis (n=2), SLE (systemischer Lupus erythematodes; n=2), RPGN (rasch progrediente Glomerulonephritis; n=2), GPA (Granulomatose mit Polyangiitis, früher Mb. Wegener) (n=1), Goodpasture-Syndrom (n=1), Maligne/benigne Nephrosklerose (n=5), Alport-Syndrom (n=1), Balkan-Nephritis (n=1), kongenitale Megaureteren (n=1).

Die Transplantatniere wurde meist in die kontralaterale Fossa iliaca extraperitoneal eingepflanzt. Arteria und Vena renalis wurden dabei End-zu-Seit mit Arteria und Vena iliaca externa bzw. Arteria und Vena iliaca communis anastomosiert. Der Ureter wurde im Verfahren nach Gregoir (extravesikale Ureterimplantation) implantiert. Gleichzeitig erfolgte die intraoperative Schienung des Ureters mittels Doppel-J-Katheter.

Protokollbiopsien wurden nicht durchgeführt.

Alle Patienten wurden eingehend über eine Teilnahme an der Studie informiert und haben schriftlich eingewilligt. Die Ethikkommission der Universität Giessen stimmte vor Beginn der Studie zu.

Die immunologischen Untersuchungen wurden 2 und 5 Jahre nach Transplantation durchgeführt. Die Gruppen ATG und Non-ATG waren vergleichbar in Bezug auf immunsuppressive Erhaltungstherapie, Spender- und Empfängeralter, Nierenersatzverfahren, präoperativen CMV-Status (CMV-IgG-negative Empfänger von CMV-IgG-positiven Spendern erhielten CMV-Prophylaxe mit CMV-Hyperimmunglobulin= Cytoglobin® präoperativ und 6x im wöchentlichen Intervall postoperativ). 27 der 28 akuten Abstoßungsreaktionen (96%) die in diesen 5 Jahren bei 24 Patienten auftraten, ereigneten

sich während der ersten beiden Jahre. 17 der 28 akuten Abstoßungsreaktionen (61%) wurden durch Nierenbiopsie bestätigt.

Chronische Transplantatdysfunktion, synonym für interstitielle Fibrose/Tubulusatrophie IF/TA wurde klinisch anhand der allmählich abfallenden Transplantatfunktion definiert, wobei die renale Nierenarterienstenose ausgeschlossen wurde. Die IF/TA wurde durch Nierenbiopsie bestätigt.

2.2. Material und Methoden

2.2.1. Mononukleäre Zellen

Mononukleäre Zellen aus peripherem Blut wurden mittels Durchflusszytometrie bestimmt (Weimer et al. 2011).

2.2.2. Bestimmung intrazellulärer Zytokine

Die Bestimmung der intrazellulären Zytokine IL-2, IL-4 und IL-10 wurde mittels Doppelfluoreszenz-Laser-Durchflusszytometrie durchgeführt. Die Untersuchungsschritte sind im Kapitel 2.2.5. ausführlich aufgeführt.

2.2.3. T-Zellproliferationskapazität

Die T-Zellproliferationskapazität wurde erfasst durch die CD69-Expression auf T-Zellen in PMA/Ionomycin-stimulierten Zellkulturen. Auch hierfür sind die Untersuchungsschritte Kapitel 2.2.5. zu entnehmen.

2.2.4. CD4+T-Zell-Helferfunktion, sCD30, Neopterin, IgA-anti-Fab, kostimulatorische Liganden, Adhäsionsmoleküle und IL-10R

Lösliches CD30 (sCD30), Neopterin, die CD4-Helferfunktion, IgA-anti-Fab, kostimulatorische Liganden (CD28), die Adhäsionsmoleküle (CD54, CD58 und CD18/CD11a-Komplex) sowie der IL-10-Rezeptor auf CD4+ und CD8+T-Zellen wurden im Serum in der Abteilung für Transplantationsimmunologie des Institutes für Immunologie der Universität Heidelberg bestimmt.

Die Expression des IL-10-Rezeptors auf CD4+ und CD8+T-Zellen wurde durchflusszytometrisch bestimmt.

Für die Bestimmung von sCD30 und IgA-anti-Fab wurde ein ELISA der Fa. Biotest, Dreieich angewandt.

Neopterin aus Serum wurde mit einem ELISA der Fa. Brahms, Berlin bestimmt.

Die Bildung Immunglobulin-sezernierender Zellen wurde mittels eines Protein-A-Plaque-Assays bestimmt.

Die CD4-Helferfunktion wurde mit einer Zellkultur und anschließendem Reverse Hemolytic Plaque Assay bestimmt.

Die CD4-Helferfunktion wird bestimmt, indem man die Bildung Immunglobulin-sezernierender Zellen in PWM-stimulierten Kulturen von Patienten mit der Bildung Immunglobulin-sezernierender Zellen in PWM-stimulierten Kulturen einer Kontrollgruppe nach unten stehender Formel vergleicht. Dabei wird die Bildung Immunglobulin-sezernierender Zellen aus unstimulierten Kulturen jeweils subtrahiert.

Folgende Formel wurde dabei angewandt:

$$\frac{[B(C) + T(P) + PWM] - [B(C) + T(P) + M]}{[B(C) + T(C) + PWM] - [B(C) + T(C) + M]}$$

$$[B(C) + T(C) + PWM] - [B(C) + T(C) + M]$$

B(C), T (C) = B- und T-Zellen der Kontrollgruppe

T(P) = T-Zellen bzw. CD4+ T-Zellen der Patientengruppe

M = Kulturmedium

Folgende Materialien wurden dabei verwendet: ME-Agarose und Seaplaque-Agarose der Fa. Biozym, Hess. Oldendorf; Schafsblut der Fa. Virion, Würzburg; Protein A der Fa. Calbiochem über Merck, Darmstadt; Polyclonal rabbit anti-human IgA, IgG, IgM der Fa. Dako über Biozol, München; Meerschweinchen-Komplement der Fa. Virion, Würzburg.

2.2.5. Protokoll

Zur Analyse der immunologischen Langzeiteffekte wurden in vorliegender Arbeit die sensibleren intrazellulären Zytokinanalysen anstelle des ELISA-Testverfahrens (Weimer et al. 2005) angewandt. Die Zytokinanalysen wurden von der Promovendin selbst mittels Durchflusszytometrie durchgeführt.

Dabei wurden den Patienten 15-20 ml Blut entnommen, welches in Ammonium-Heparinat-Blutentnahmesystemen bis zur Verarbeitung bei Dunkelheit und Zimmertemperatur maximal 6h aufbewahrt wurde.

8 Röhrchen wurden mit Ficoll (polymeres Erythrozytenaggregationsreagenz, Pharmacia Biotech, Dübendorf) beschickt, anschließend wurde das 1:2 mit HBSS (Fa. Gibco, Life Technologies GmbH, Darmstadt) verdünnte Vollblut vorsichtig überschichtet.

Daraufhin erfolgte eine 7-minütige Zentrifugation bei 2250 g (Zentrifuge Heraeus, Hanau, $g = 9,81 \text{ m/s}^2$). Durch die Zentrifugation trennten sich die Zellen auf, die Erythrozyten aggregierten und sammelten sich am Boden des Röhrchens, Granulozyten verloren Flüssigkeit und bekamen durch den osmotischen Druck eine hohe Dichte und lagerten sich auf den Erythrozyten ab. Darüber fand sich die FICOLL-Lösung, über welcher sich ein Monolayer aus Lymphozyten und Monozyten bildete. Oberhalb dieses Monolayers befanden sich Plasma und Thrombozyten.

Anschließend wurde der Lymphozytenring mittels einer gestopften Glaspipette (Pasteurpipette, Fa. Kalensee, Giessen) entnommen, mit 6 ml HBSS gemischt und auf vier Röhrchen verteilt. Danach erfolgte die Zentrifugation bei 440 g. Anschließend fanden sich die Lymphozyten als Pellet am Grund des Falcon-Röhrchens. Es erfolgte das Absaugen des Überstandes mittels ungestopfter Glaspipetten (Pasteurpipette lang, Fa. Kalensee, Giessen) und Lösen des Pellets von der Gefäßwand durch Spülung mit Mediumlösung (bestehend aus RPMI mit L-Glutamin, Natriumpyruvat, Penicillin/Strepto-

mycin (alles Fa. Gibco, Life Technologies GmbH, Darmstadt), β -Mercaptoethanol (Fa. Bio-Rad Laboratories, München) sowie AB-Serum von freiwilligen Blutspendern. Anschließend wurden alle Zellen in einem Röhrchen vereinigt, mit Mediumlösung versetzt, auf zwei Falcon-Röhrchen aufgeteilt und erneut 15 min bei 400 g zentrifugiert. Es erfolgte das erneute Absaugen des Überstandes und Waschen der Zellpellets von der Gefäßwand mit Mediumlösung. Insgesamt wurde die Gesamtzellzahl auf 10 ml Mediumlösung verteilt, und es erfolgte die mikroskopische Zählung in der Neubauerkammer. Die Zellzahl wurde durch Zugabe von weiterer Mediumlösung auf 10^6 Zellen/ml verdünnt (um Messbedingungen reproduzierbar zu halten).

Anschließend wurde o.g. Zellsuspension auf zwei Kulturflaschen (Fa. Costa, Wiesbaden) aufgeteilt. In der einen wurde ein unstimulierter Zellansatz kultiviert, indem diesem lediglich GOLGI-Plug zugesetzt wurde (Endkonzentration $1\mu\text{l}$ Brefeldin A/ ml Zellkulturmedium, Fa. BD).

In der zweiten Flasche wurde der stimulierte Zellansatz kultiviert. Dazu wurde diese Zellsuspension mit GOLGI-Plug (Endkonzentration $1\mu\text{l}$ Brefeldin A/ml Zellkulturmedium Fa. BD), PMA-Gebrauchslösung (10 ng/ml Zellkulturlösung) und $0,75\mu\text{g/ml}$ Ionomycin- Gebrauchslösung (beides Fa. Sigma, Gelenau) versetzt. Brefeldin A wurde beiden Ansätzen in gleicher Endkonzentration zugefügt, weil dieses den Proteintransport im GOLGI-Apparat inhibiert, so dass die Zytokine akkumulieren. Dies verhindert, dass alle Interleukine schon an die Zelloberfläche transportiert werden. Erst in einem späteren Vorgang wird die Zellmembran permeabel gemacht, damit die Färbung der intrazellulären Zytokine erfolgen kann.

Dieser Vorgang wurde unter sterilen Bedingungen durchgeführt.

Die Zellansätze wurden 4h bei 37°C und 5% CO_2 inkubiert. Anschließend wurden die Zellen mittels wiederholtem Pipettieren von den Oberflächen der Kulturflaschen mobilisiert. Der unstimulierte Zellansatz wurde auf 10 Eppendorf-Gefäße (Reaktionsgefäße, $1,5\text{ ml}$ mit Deckel, Sarstedt, Nümbrecht, $0,5\text{ml/Gefäß}$) verteilt, der stimulierte Zellansatz auf 6 Gefäße ($1,0\text{ ml/Gefäß}$). Anschließend wurden alle Gefäße 10 min bei 500 g zentrifugiert. Der Überstand wurde abgesaugt und die Zellen, welche sich wieder als pellet am Boden des Gefäßes gesammelt hatten, wurden mittels jeweils 1 ml CellWash

(PBS-Lösung, phosphatgepufferte Salzlösung, Becton&Dickinson, Heidelberg) von der Gefäßwand mobilisiert, und die so entstandene Lösung wurde gevortext. Anschließend erfolgte wieder die 10-minütige Zentrifugation bei 500 g. Die nun entstandenen Zellpellets wurden nach Absaugen des Überstandes jeweils mit 250 µl Cytofix/Cytoperm (Becton&Dickinson, Heidelberg, enthält Paraformaldehyd zur Stabilisierung und Fixierung der Zellstruktur sowie Saponin zur Permeabilisierung der Zellwand; Ziel war, dass die später pipettierten Antikörper in die Zelle eindringen und an die intrazellulären Zytokine binden können) versetzt, gevortext und 20 min bei 4°C und Dunkelheit inkubiert. Anschließend erfolgte wieder die 10-minütige Zentrifugation bei 500 g und das Absaugen der Überstände. Die Zellpellets wurden wieder mittels Spülen mit jeweils 1 ml PermWash von der Gefäßwand mobilisiert und gevortext. Anschließend wurden die Zellsuspensionen in einen neuen Satz Eppendorf-Gefäße überführt, da das vorher aufgeführte Cytofix/Cytoperm die Wände der Reaktionsgefäße angreift und die Zellpellets sich schlechter davon lösen lassen.

Nach erneuter Zentrifugation (10 min bei 500 g) wurden die Zellpellets wiederum mit 100µl PermWash Gebrauchslösung versetzt und mit 10 bzw. 20 µl folgender fluoreszierender Antikörper-Suspensionen gefärbt: anti-CD3-PerCP/anti-69-PE, anti-CD3-PerCP/anti-CD8-FITC/anti-IL-2-PE, anti-CD3-PerCP/anti-CD8-FITC/anti-IL-4-PE, anti-CD3-PerCP/anti-CD8-FITC/anti-IL-10-PE, anti-CD19-PerCP/anti-IL-6-FITC/anti-IL-10-PE, Mouse γ_1 -PE (Isotypkontrolle für IL-2 und IL-4-PE), IL-10-PE und Rat IgG₁-PE (Isotypkontrolle IL-10-PE, alle Becton&Dickinson, Heidelberg). Nach einem langsamen Vortex-Vorgang erfolgte die erneute Inkubation 30 min bei 4°C und Dunkelheit. Nach zweimaliger erneuter Zentrifugation (jeweils 10 min bei 500 g, Lösen der Zellpellets mit jeweils 1,0 ml PermWash) wurden die Zellkonzentrationen mit PBS (Phosphat buffer saline) versetzt und in Teströhrchen für das Durchflußzytometer überführt. Anschließend erfolgte die Messung am FACSCalibur Durchflußzytometer (Becton&Dickinson, Heidelberg).

Die Zellviabilität, welche durch 7-amino-actinomycin D (7-AAD, Becton&Dickinson, Heidelberg) getestet wurde, betrug $99,4\pm 0,2\%$ bei CD4⁺T-Zellen, $98,4\pm 1,4\%$ bei

CD8+T-Zellen, $99,5 \pm 0,1\%$ bei B-Zellen sowie $97,2 \pm 1,9\%$ bei Monozyten (angegeben sind Mittelwert \pm SD).

Die Inter-Assay-Variabilität betrug $0,7\%$ für CD69+T-Zellen, $2,2\%$ IL-2 in CD4+T-Zellen, $1,0\%$ IL-2 in CD8+T-Zellen, $0,3\%$ IL-4 in CD4+T-Zellen, $0,3\%$ IL-4 in CD8+T-Zellen, $10,8$ MFI IL-10 in B-Zellen, $15,7$ MFI IL-10 in Monozyten, $6,2$ MFI IL-10 in CD4+T-Zellen sowie $7,1$ MFI IL-10 in CD8+T-Zellen (angegeben ist SD).

Die Reliabilität des Verfahrens betrug für: CD69+T-Zellen $0,7\%$, IL-2 in CD4+T-Zellen $2,2\%$, IL-4 in CD4+T-Zellen $0,3\%$, IL-10 in CD4+T-Zellen $6,2$ (MFI), IL-2 in CD8+T-Zellen $1,0\%$, IL-4 in CD8+T-Zellen $0,3\%$ sowie für IL-10 in CD8+T-Zellen $7,1$ (MFI).

Unter Durchflusszytometrie versteht man die Erfassung und Vermessung von Zellen, die zuvor durch hydrodynamische Fokussierung in der Messküvette vereinzelt wurden. Um den Probenstrom herum fließt ein schnellfließender Strom aus Trägerflüssigkeit, der den Probenstrom auseinanderzieht und damit die Zellen perlschnurartig anordnet. Die Zellen werden von einem Laserstrahl bestrahlt, anschließend wird deren Emission von optischen Signalen im gleichen Gerät gemessen.

In der durchflusszytometrischen Messung unterscheidet man die Vorwärts-Lichtstreuung, welche mit der Größe der gemessenen Zellen korreliert, von der seitlichen Lichtstreuung (im 90° -Winkel gemessen), welche mit der Granularität der Zellen bzw. mit dem Kern/Plasma-Verhältnis korreliert.

Wie oben aufgeführt, wurden die Zellen mit fluoreszierenden monoklonalen Antikörpern gefärbt und ihre Emission gemessen. Dabei korreliert die Intensität der Fluoreszenz mit der Antigendichte auf einer Zelle.

Die Farbstoffe werden alle bei 488 nm und somit vom gleichen Laser absorbiert. Sie emittieren unterschiedliche Wellenlängen.

Im vorliegenden Protokoll wurden die Proben mit fluoreszierenden Antikörpern gegen bestimmte Oberflächenmerkmale der Zellen inkubiert, so dass die Zellen aufgrund der markierten Oberflächenmerkmale in unterschiedliche Populationen aufgetrennt werden konnten.

B-Zellen wurden über ihre CD19-Expression detektiert. T-Zellen wurden über Expression von CD3 identifiziert, diese konnten über einen Anti-CD8-Antikörper in CD8- und CD4-Zellen differenziert werden. Der Aktivierungsgrad der Zellen wurde mit Hilfe eines Antikörpers gegen CD69 ermittelt.

Je Probe wurden 100 000 Zellen gemessen. Bei den fluoreszierenden Antikörpern handelt es sich zum einen um FITC-Antikörper (Fluorescein isothiocyanate-conjugated). Es ist der am häufigsten verwendete Farbstoff bei durchflusszytometrischen Messungen. Er fluoresziert grün und besteht aus kleinen Molekülen, von denen jeweils 3-6 durch Konjugation mit einem Antikörper verbunden sind. Es hat sein Absorptionsmaximum bei 488 nm und sein Emissionsmaximum bei 519 nm.

Des Weiteren wurde der Farbstoff PE (Phycoerythrin) eingesetzt, er fluoresziert gelb-orange und wird ebenfalls von Licht der Wellenlänge 488 nm angeregt, dabei hat er sein Emissionsmaximum bei 578 nm.

Zuletzt wurde PerCP (Peridinin Chlorophyll Protein) eingesetzt, welches rot fluoresziert und genau wie die anderen beiden Farbstoffe ein Absorptionsmaximum von 488 nm besitzt, aber ein Emissionsmaximum von 678 nm.

Die verschiedenen Emissionen der Farbstoffe werden durch drei verschiedene Detektoren FL-1, FL-2 und FL-3, die im Gerät eingebaut sind, erfasst. Allen Farbstoffen gemein ist ein Absorptionsmaximum bei 488 nm, so dass der Laser des FACSCalibur, der diese Wellenlänge hat, die Farbstoffe optimal anregen kann.

Die Verschiebung der Wellenlänge zwischen Absorptionsmaximum und Emissionsmaximum wird als Stokes-Shift bezeichnet.

Exemplarisch für alle Messungen wird in Abbildung 1 und 2 gezeigt, wie die durchflusszytometrische Messung auszuwerten ist.

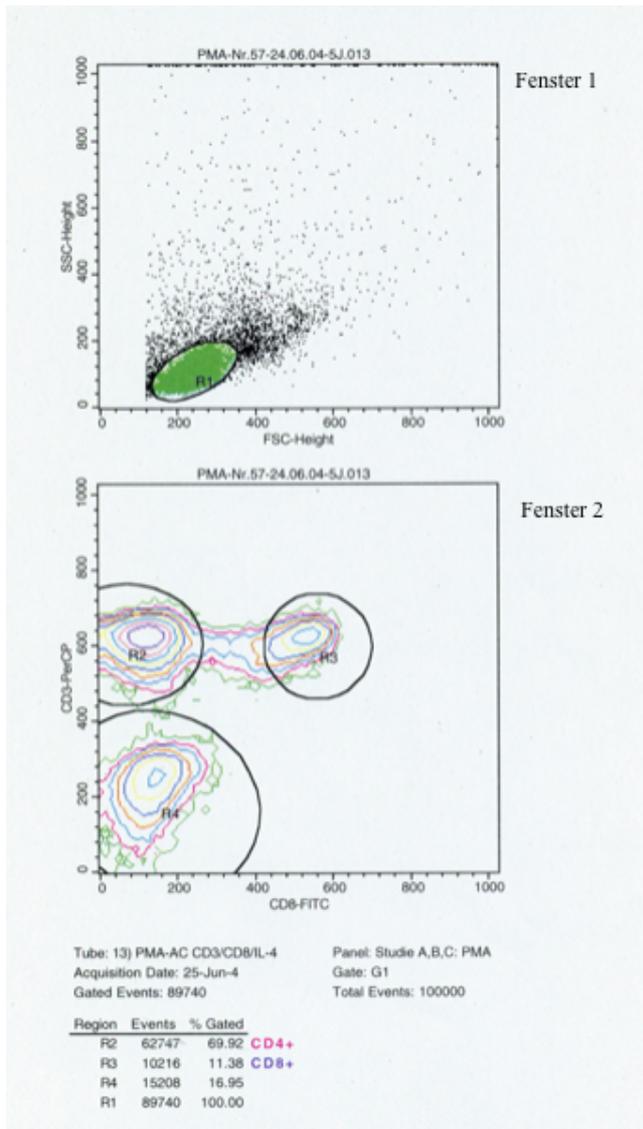


Abbildung 1: Beispiel der Auswertung der durchflusszytometrischen Messung

Zunächst sind dabei 4 Fenster eingerichtet worden. Fenster 1 (Abb. 1) zeigt die gesamte Zellmenge, in welcher die Lymphozytenpopulation grün unterlegt sind (R1).

Im Fenster 2 (Abb. 1) werden diese CD3+T-Lymphozyten in die CD4+Zellen (R2) und die CD8+Zellen (R3) unterteilt. Unter R4 sind CD3-negative Zellen, NK-Zellen und B-Zellen zusammengefasst.

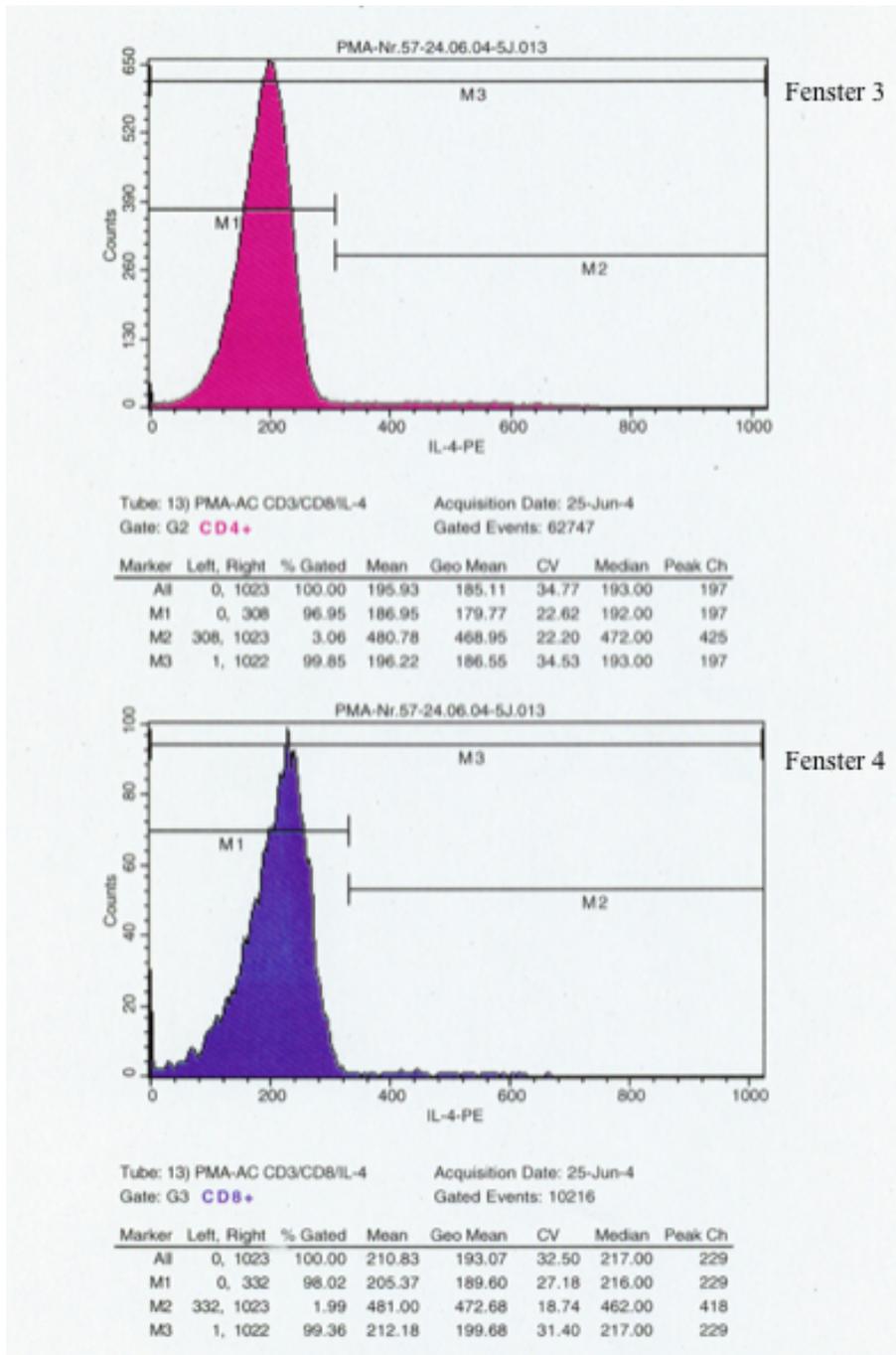


Abbildung 2: Beispiel der Auswertung der Interleukinfreisetzung aus CD4+T-Zellen in der durchflusszytometrischen Messung

Im Fenster 3 (Abb.2) sieht man die IL-4-Freisetzung aus CD4+Zellen, wobei der peak die für das Merkmal negative Population (M1) darstellt und unter M2 die tatsächliche IL-4-Freisetzung dargestellt wird.

Analog dazu wird dies im Fenster 4 (Abb. 2) mit der IL-4-Freisetzung aus CD8+-Zellen durchgeführt.

IL-2 und IL-4 wurden in Prozent angegeben, IL-10 dagegen in MFI (Mean Fluorescence Intensity), weil sich für IL-10 die positiven und negativen Zellpopulationen nicht eindeutig voneinander trennen lassen und daher die Expressionsstärke im Mittel aller Zellen über die Mean Fluorescence Intensity ermittelt wird und sich so eine bessere Differenzierbarkeit ergibt.

2.3. Klinische Daten

Die Erfassung der klinischen Daten erfolgte durch Recherchen in den Krankenblättern.

2.4. Statistik

Die statistischen Berechnungen der vorliegenden Arbeit wurden durch das Institut für Medizinische Informatik der Justus-Liebig-Universität Giessen unter der Leitung von Herrn Dr. Bödeker durchgeführt. Dabei wurde SPSS angewendet.

Die Daten werden als Mittelwerte und SEM (standard error of the mean) angegeben. Es wurden der Wilcoxon Rangsummentest, Chi-Quadrat-Test, Exakter Fisher-Test sowie der Korrelationskoeffizient nach Pearson zur statistischen Analyse genutzt.

Um signifikante Unterschiede zwischen der ATG und der Non-ATG-Gruppe darzustellen, wurden univariate und multivariate Analysen durchgeführt. Ein Level von 0,05 war als cut off definiert, um in der univariaten Analyse eine Signifikanz zu belegen. Die multivariate Analyse dient dazu herauszufinden, mit welchen immunologischen Langzeiteffekten die ATG-Induktion als unabhängiger Faktor assoziiert ist (um weitere Einflussfaktoren auszuschließen). Ein Level von 0,1 war als cut off definiert, um in der multivariaten Analyse Signifikanz zu belegen. P-Werte aus der multivariaten logistischen Regressionsanalyse wurden mit „logreg“ gekennzeichnet.

3. Ergebnisse

3.1. Klinische Daten

3.1.1. Transplantationsergebnisse 5 Jahre nach Nierentransplantation

Tabelle 2: Transplantationsergebnisse 5 Jahre nach Transplantation, Vergleich zwischen ATG-Gruppe und Non-ATG-Gruppe

	ATG	Non-ATG	P ¹
n	44	40	
Inzidenz akuter Abstoßungen	30% (13/44)	28% (11/40)	0,836
---späte akute Abstoßung ²	15% (6/41)	8% (3/39)	0,483
---AMR ²	11% (5/44)	3% (1/40)	0,205
Patientenüberleben ³	91% (40/44)	100% (40/40)	0,051
Transplantatüberleben ⁴	73% (32/44)	90% (36/40)	0,055
Funktionelles Transplantatüberleben ⁴	80% (32/40)	90% (36/40)	0,348
Chronische Transplantatdysfunktion ⁵	19% (6/32)	17% (6/36)	0,822
Proteinurie ⁶	30% (9/30)	18% (6/34)	0,244
---Proteinurie [mg/24h]	414±181 (n=19)	297±146 (n=18)	1,000
Transplantatfunktion ⁷			
---Kreatinin [mg/dl]	2,2±0,2	2,1±0,1	1,00
---Kreatininclearance [ml/min]	51±4	56±4	0,314

¹ Chi-Quadrat-Test, Exakter Fisher-Test und Kruskal-Wallis H Test wurden für den statistischen Vergleich eingesetzt.

² späte akute Abstoßung (= Abstoßung > 4 Monate post transplantationem), AMR = acute antibody-mediated rejection = akute antikörpervermittelte Abstoßung

³ Die niedrigeren 5-Jahres-Überlebensraten bei den Patienten in der ATG-Gruppe sind 4 kardiovaskulären Todesfällen bei Typ-1-Diabetikern zuzuschreiben (3 der 4 Patienten erhielten ATG, weil eine simultane Inselzell-Nierentransplantation durchgeführt wurde) und nicht der ATG-Induktionstherapie.

⁴ Früher Transplantatverlust trat ein aufgrund von AMR (n=3) in der ATG-Gruppe und aufgrund einer venösen Thrombose des Transplantates in der Non-ATG-Gruppe (n=1), alle weiteren Transplantatverluste traten aufgrund von chronischer Transplantatdysfunktion ein.

Um das funktionelle Transplantatüberleben zu berechnen, wird der Tod mit funktionierendem Transplantat ausgeschlossen, während bei der Berechnung des Transplantatüberlebens der Tod eines Patienten als Transplantatverlust zählt.

⁵ Ausschließlich Patienten mit funktionierenden Transplantaten nach 5 Jahren wurden berücksichtigt.

⁶ Die Proteinurie wurde mittels U-Stix getestet (4 Patienten wurden nicht untersucht) sowie durch eine quantitative Urinuntersuchung bei 19 ATG-Patienten und 18 Non-ATG-Patienten.

⁷ Die Transplantatfunktion wurde durch Serum-Kreatinin und gemessene Kreatininclearance beschrieben.

Weiterhin wurden Blutdruck und Lipidstatus der Patienten untersucht. Dabei ergaben sich keine statistisch signifikanten Unterschiede zwischen den beiden Gruppen, außer dass in der ATG-Gruppe signifikant mehr Antihypertensiva zum Einsatz kamen als in der Non-ATG-Gruppe ($2,9 \pm 0,2$ ATG versus $2,6 \pm 0,2$ Non-ATG, $p = 0,030$ (Mann-Whitney-U-Test)).

Die Transplantations-Ergebnisse nach 5 Jahren (Inzidenz akuter Abstoßungen, Auftreten IF/TA, Proteinurie, Kreatinin und Kreatinin-Clearance) unterschieden sich nicht zwischen den beiden Gruppen.

Danach wurde die immunvermittelte Funktionsverschlechterung bzw. der immunvermittelte Transplantatverlust untersucht. Darunter versteht man die chronische Transplantatdysfunktion (IF/TA).

Zunächst wurde dabei ermittelt, ob das Regime der immunsuppressiven Therapie, das Auftreten einer CMV-Erkrankung, sCD30 und Neopterin einen Einfluss auf die immunvermittelte Funktionsverschlechterung oder den immunvermittelten Transplantatverlust 5 Jahre nach Transplantation haben könnten.

Tabelle 3: Immunvermittelte Funktionsverschlechterung oder immunvermittelter Transplantatverlust 5 Jahre nach Transplantation

Variable	p
Immunsuppressive Therapie ¹	
—CsA versus Tacrolimus	0,0902
—Azathioprin versus MMF	0.4211
ATG-Induktion	0,2632
CMV-Erkrankung ²	0,7571
sCD30 (1-Jahres-Wert) ³	0,0058
Neopterin/CR (1-Jahres-Wert) ⁴	0,0637

Statistik: logistische Regression

¹ Immunsuppressive Behandlung 1 Jahr nach Transplantation (es wurden keine signifikanten Effekte der immunsuppressiven Therapie auf sCD30 und Neopterin später als 1 Jahr nach Transplantation gefunden)

² CMV-Erkrankung innerhalb des 1. Jahres nach Transplantation

³ Hoher sCD30-Level (≥ 60 U/ml) versus niedriger sCD30-Level (< 60 U/ml)

⁴ Hoher (≥ 2000 nmol/g CR) versus niedriger (≤ 2000 nmol/g CR) Neopterin/CR-Level 1 Jahr nach Transplantation

Dabei ließ sich in der multivariaten Analyse (Tabelle 3) ein signifikanter Zusammenhang zwischen sCD30 1 Jahr nach Transplantation und dem Auftreten der immunvermittelten Funktionsverschlechterung zeigen. Auch zwischen Neopterin 1 Jahr nach Transplantation und dem Auftreten einer immunvermittelten Transplantatverschlechterung besteht ein Zusammenhang.

sCD30 und Neopterin, deren prädiktiver Wert untersucht werden sollte, hätten hiermit ihre Funktion als prädiktive Marker bestätigt, da laut Tabelle 3 höhere Werte an sCD30 und Neopterin 1 Jahr nach Transplantation mit einer erhöhten Rate an immunvermittelter Funktionsverschlechterung 5 Jahre nach Transplantation assoziiert werden. Dies beantwortet einen Teil der 1. eingangs gestellten Frage.

Auf den weiteren Zusammenhang zwischen chronischer Transplantatdysfunktion und sCD30 sowie Neopterin wird im Kapitel 3.2.3. eingegangen.

3.1.2. Infektionen und maligne Tumore

Anschließend wurde das Auftreten schwerer Infektionen und Malignome nach ATG-Induktion untersucht. Dabei wurde das Auftreten schwerer Infektionen noch einmal in die Zeiträume 0-2 Jahre, 2-5 Jahre und 0-5 Jahre nach Transplantation unterschieden. Als schwere Infektionen wurden Infektionen definiert, welche zur Notwendigkeit eines stationären Aufenthaltes führten.

Tabelle 4: Auftreten schwerer Infektionen und maligner Tumore in den Zeitabschnitten 0 – 2, 2 – 5 und 0 – 5 Jahre nach Transplantation

	ATG	Non-ATG	p
0 – 2 Jahre			
Schwere Infektionen	46% (20/44)	23% (9/40)	0,027
CMV-Erkrankungen	34% (15/44)	43% (17/40)	0,428
Malignome	16% (5/32)	25% (9/36)	0,340
Hautmalignome	13% (4/32)	17% (6/36)	0,739
Andere Malignome	6% (2/32)	8% (3/36)	1,000
>2 – 5 Jahre			
Schwere Infektionen	28% (11/40)	29% (11/38)	0,887
0 – 5 Jahre			
Schwere Infektionen	61% (27/44)	43% (17/40)	0,084
CMV-Erkrankungen	34% (15/44)	43% (17/40)	0,789
Maligne Tumoren Haut	11% (5/44)	18% (7/40)	0,537
Maligne Tumoren (außer Haut)	5% (2/44)	8% (3/40)	0,665
Maligne Tumoren (alle)	14% (6/44)	25% (10/40)	0,185

Statistik: Mann-Whitney-U-Test

Zu den Tumoren gehörten: Mb. Bowen (n = 5), Carcinoma spinocellulare (n = 2), Basaliom (n = 6), Duktales Carcinoma in situ der Mamma (n = 1), Nierenzellkarzinom (n = 2).

Die ATG-Induktion war in den ersten beiden Jahren mit einem zweifach erhöhten Risiko für das Auftreten schwerer Infektionen assoziiert. Insbesondere schwere Atemwegsinfektionen und Varizella zoster-Virus-Infektionen kamen in der ATG-Gruppe häufiger vor. Danach war das Risiko in der ATG-Gruppe genauso hoch wie in der Non-ATG-Gruppe. Betrachtet man die gesamte Beobachtungszeitspanne (5 Jahre), so findet sich für die Infektionsrate kein statistisch signifikanter Unterschied mehr zwischen den beiden Gruppen. Langfristig gleicht sich das Risiko für Infektionen im Risikokollektiv dem des Niedrigrisikokollektivs an. Dies ist eine wesentliche Aussage dieser Arbeit und spielt vor allem in der Langzeitbetreuung der Transplantatempfänger eine wichtige Rolle. Weiterhin liefert sie Antwort auf Frage 2 der eingangs gestellten Fragen.

In Bezug auf das Auftreten von Malignomen war kein statistisch signifikanter Unterschied zwischen den beiden Gruppen zu beobachten. Diese traten nur in einer kleinen Fallzahl auf, so dass die klinische Relevanz in Frage zu stellen ist.

Tabelle 5: Schwere Infektionen 0 bis 5 Jahre nach Transplantation

	ATG	Non-ATG
Atemwegsinfektionen		
Sinusitis/Otitis media	1	0
Schwere Bronchitis/Pneumonie	10	6
Transplantatpyelonephritis	11	8
- mit Urosepsis	3	5
Gastrointestinale Infektionen	8	6
Sigmadivertikulitis mit Perforation	0	2
Akute Cholezystitis	0	1
Hautinfektionen (Erysipel, Phlegmone)	3	1
VZV-Infektion	8	3
- VZV Enzephalitis	1	0
CMV-Erkrankungen ¹	3	1

Enzephalitis (v.a. viraler Genese)	1	0
Hepatitis A	0	1
Gesamt	45	29

¹ CMV-Erkrankungen (inklusive CMV-Syndrom) traten vorrangig in den ersten 4 Monaten nach Transplantation auf. Der CMV-Status vor Transplantation unterschied sich nicht zwischen den beiden untersuchten Gruppen.

3.2. Immunparameter

3.2.1. T-Zellproliferation und intrazelluläre Zytokinproduktion

Im Folgenden zeigen die Abbildungen 3 a - d den Vergleich ATG vs. Non-ATG 2 Jahre nach Transplantation für die T-Zellproliferation, IL-2-, IL-4- und IL-10-Produktion in CD4+ und CD8+T-Zellen.

Das erhöhte Risiko für das Auftreten von Infektionen in den ersten beiden Jahren nach Transplantation fällt mit der verminderten T-Zellfunktion (T-Zellproliferationskapazität, intrazelluläre Zytokinproduktion) nach ATG-Induktion zusammen, wie bis zwei Jahre nach Transplantation messbar war. Dabei besteht ein signifikanter Unterschied bei der T-Zellproliferationskapazität ($p=0,011$, logreg $p=0,038$) sowie bei der IL-10-Antwort aus CD4+T-Zellen ($p=0,004$, logreg $p=0,064$), auch in multivariater Analyse bestätigt. Zusätzlich konnte der IL-10R auf CD4+T-Zellen in der ATG-Gruppe signifikant höher gemessen werden ($p=0,002$, logreg $p=0,0128$). Auf den IL-10R wird in Kapitel 3.2.2. eingegangen.

Der signifikante Unterschied der IL-2-Antwort in CD4+-T-Zellen zwei Jahre nach Transplantation in der univariaten Analyse ($p=0,036$) konnte mittels multivariater Analyse nicht bestätigt werden (logreg $p=0,145$).

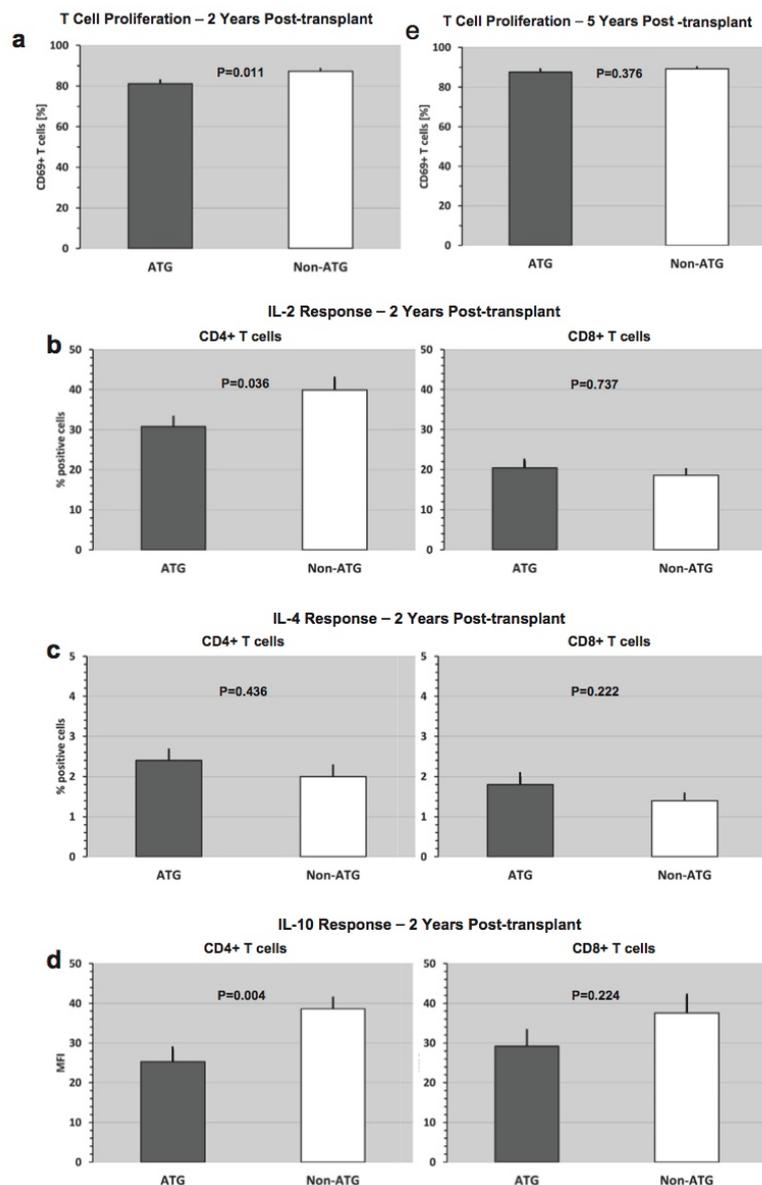


Abbildung 3: T-Zellproliferation, intrazelluläre IL-2, IL-4 und IL-10 Produktion 2 und 5 Jahre nach Transplantation (weiterer Teil der Abbildung folgt)

Legende und Übersetzung:

a: T-Zellproliferation 2 Jahre nach Transplantation

b: IL-2-Antwort 2 Jahre nach Transplantation in CD4+T-Zellen bzw. CD8+T-Zellen

c: IL-4-Antwort 2 Jahre nach Transplantation in CD4+T-Zellen bzw. CD8+T-Zellen

d: IL-10-Antwort 2 Jahre nach Transplantation in CD4+T-Zellen bzw. CD8+T-Zellen

e: T-Zellproliferation 5 Jahre nach Transplantation; leitet bereits an dieser Stelle zu den 5-Jahresergebnissen über

MFI = Mean Fluorescence Intensity; angegeben sind Mittelwert±SEM, p-Werte wurden für signifikante und nicht signifikante Unterschiede zwischen den Patientengruppen angegeben; Statistik: Wilcoxon-Rangsummen-Test

Diesen Untersuchungen schließt sich in Tabelle 6 sowie in den Abbildungen 3e-h der Vergleich der intrazellulären Zytokine 5 Jahre nach Transplantation zwischen der ATG- und der Non-ATG-Gruppe an.

5 Jahre nach Transplantation war die verminderte T-Zellfunktion nicht mehr messbar. Die T-Zellproliferationskapazität unterschied sich zu diesem Zeitpunkt nicht mehr ($p = 0,376$, Abbildung 3e). Ebenso wenig unterschied sich die IL-10-Antwort in CD4+T-Zellen zwischen den beiden Gruppen ($p = 0,457$).

Tabelle 6: Vergleich der Produktion intrazellulärer Zytokine in mononukleären Zellen, ATG-Gruppe und Non-ATG-Gruppe, 5 Jahre nach Transplantation

	ATG [Mittelwert ± SEM]	n	Non-ATG [Mittelwert ± SEM]	n	P ¹
CD69+T-Zellen [%] ²	87,5±1,5	30	89,2±1,3	34	0,376
CD4+Zellen: IL-2 [%]	38,0±2,5	30	41,5±3,2	34	0,332
CD8+Zellen: IL-2 [%]	23,4±2,5	30	19,1±1,8	34	0,225
CD4+Zellen: IL-4 [%]	2,1±0,3	30	2,9±0,7	34	0,968
CD8+Zellen: IL-4 [%]	1,9±0,5	30	1,8±0,3	34	0,686
CD4+Zellen: IL-10 [MFI] ³	11,5±1,8	30	15,1±2,4	34	0,457
CD8+Zellen: IL-10 [MFI]	16,8±2,3	30	16,9±2,4	34	0,984
ISC Bildung [%] ⁴	55±12	26	64±14	32	0,931

¹ Für den statistischen Vergleich wurde der Mann-Whitney-U-Test eingesetzt; angegeben wurden Mittelwert ± SEM

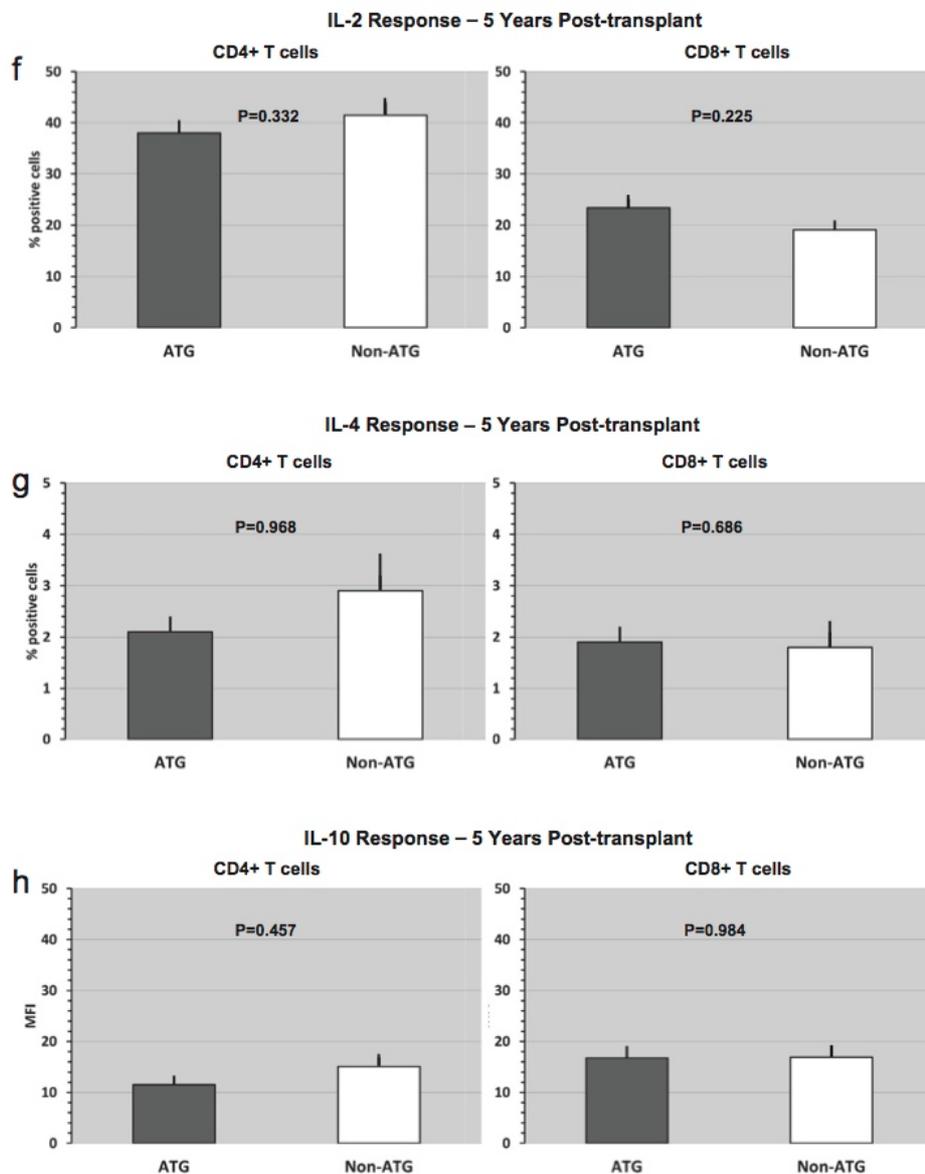
² % der eingegrenzten Zellen

³ MFI = Mean Fluorescence Intensity

⁴ISC = Immunglobulin-sezernierende Zellen

Abbildung 3 f-h zeigt, dass die immunologische Risikogruppe, welche die ATG-Induktion erhalten hatte, 5 Jahre nach Transplantation nunmehr mit der Non-ATG-Gruppe

vergleichbar ist, es zeigt sich bei keinem der Parameter ein signifikanter Unterschied. Damit wird eine weitere Antwort auf Frage 1 der eingangs gestellten Fragen gegeben.



Fortsetzung Abbildung 3:

Legende:

f: IL-2-Antwort 5 Jahre nach Transplantation in CD4+T-Zellen bzw. CD8+T-Zellen

g: IL-4-Antwort 5 Jahre nach Transplantation in CD4+T-Zellen bzw. CD8+T-Zellen

h: IL-10-Antwort 5 Jahre nach Transplantation in CD4+T-Zellen bzw. CD8+T-Zellen

MFI = Mean Fluorescence Intensity; angegeben sind Mittelwert \pm SEM, p-Werte wurden für signifikante und nicht signifikante Unterschiede zwischen den Patientengruppen angegeben

Statistik: Wilcoxon-Rangsummen-Test

Wie bereits erwähnt, wurden die in Abbildung 3 dargestellten Parameter in uni- und multivariater Analyse auf den Einfluss der ATG-Induktion getestet, wobei das erhöhte Risiko für Infektionen während der ersten beiden Jahre zeitgleich mit den supprimierten T-Zellfunktionen nach ATG-Induktion in diesem Zeitraum auftrat. 5 Jahre nach Transplantation ließen sich diese supprimierten T-Zellfunktionen nicht mehr nachweisen.

Es kann also zusammengefasst werden, dass die T-Zellproliferationskapazität 2 Jahre nach Transplantation in der multivariaten Analyse ($p=0,011$, logreg $p=0,038$) einen Zusammenhang mit der ATG-Induktion zeigte, was 5 Jahre ($p=0,376$) nach Transplantation nicht mehr nachweisbar war.

Der Zusammenhang zwischen ATG-Induktion und supprimierter IL-2-Antwort aus CD4+T-Zellen ($p=0,036$) konnte in der multivariaten Analyse nicht bestätigt werden (logreg $p=0,145$).

Auch die IL-10-Antwort der CD4+T-Zellen zeigte 2 Jahre nach Transplantation einen Zusammenhang mit der ATG-Induktion ($p=0,004$, logreg $p=0,065$), welcher 5 Jahre nach Transplantation ($p=0,457$) ebenfalls nicht mehr nachweisbar war.

Während die IL-10-Antwort der CD4+T-Zellen 2 Jahre nach Transplantation und somit nach ATG-Induktion signifikant reduziert war, war die IL-10R-Expression auf CD4+T-Zellen verstärkt ($p=0,002$, logreg $p=0,0128$, siehe Kapitel 3.2.2.). Auf CD8+T-Zellen, B-Zellen und Monozyten konnte keine verstärkte Expression der IL-10R nachgewiesen werden. 5 Jahre nach ATG-Induktion war weder die IL-10-Antwort der CD4+T-Zellen noch die Expression der IL-10-Rezeptoren beeinflusst.

Bezogen auf das Auftreten schwerer Infektionen zeigte die IL-10-Antwort der CD4+T-Zellen weder 2 Jahre ($p=0,422$) noch 5 Jahre ($p=0,850$) nach Transplantation einen Zusammenhang mit dem Auftreten schwerer Infektionen (siehe Kapitel 3.2.5.). Die T-Zellproliferationskapazität 2 Jahre nach Transplantation war dagegen in der Gruppe mit schweren Infektionen signifikant reduziert ($p=0,017$), was 5 Jahre nach Transplantation

nicht mehr nachweisbar war ($p=0,062$). Darauf wird im Kapitel 3.2.5. in den Abbildungen 6 und 7 eingegangen.

3.2.2. Subpopulationen mononukleärer Zellen und Expression kostimulatorischer Liganden, von Adhäsionsmolekülen sowie IL-10R

Tabelle 7: Subpopulationen mononukleärer Zellen 2 Jahre nach Transplantation in der ATG-Gruppe und Non-ATG-Gruppe

	ATG	Non-ATG	p ¹
Mononukleäre Zellen/ μ l	2136 \pm 207	2592 \pm 242	0,175
T-Zellen/ μ l	1082 \pm 152	1570 \pm 168	0,007
CD4+-T-Zellen/ μ l	412 \pm 44	896 \pm 103	<0,005
CD28+ CD4-Zellen [%] ³	87,9 \pm 2,7	93,7 \pm 1,8	0,059
IL-10R+ CD4-Zellen [MFI] ²	182 \pm 5	161 \pm 4	0,002
CD8+-T-Zellen/ μ l	635 \pm 107	624 \pm 73	0,679
CD28+ CD8-Zellen [%]	45,6 \pm 4,3	46,3 \pm 3,6	0,708
IL10R+CD8-Zellen [MFI]	145 \pm 6	146 \pm 4	0,783
CD4/CD8 Ratio	1,0 \pm 0,1	1,7 \pm 0,2	0,001
CD56+NK-Zellen/ μ l	104 \pm 18	136 \pm 27	0,605
CD19+B-Zellen/ μ l	84 \pm 13	96 \pm 13	0,662
IL10R+ B-Zellen [MFI]	67 \pm 7	65 \pm 6	0,682
Monozyten/ μ l	557 \pm 48	616 \pm 104	0,558
IL10R+Monozyten [MFI]	104 \pm 5	112 \pm 6	0,254

¹ Wilcoxon-Rangsummentest. Daten sind angegeben in Mittelwert \pm SEM.

²MFI = Mean Fluorescence Intensity und

³% der eingegrenzten Zellen.

78 Patienten mit funktionierendem Transplantat gingen in diese Untersuchung ein.

2 Jahre nach Transplantation war die CD4+T-Zellzahl in der ATG-Gruppe deutlich geringer als in der Non-ATG-Gruppe, während die CD8+T-Zellzahl vergleichbar war. Dies

hielt sogar bis 5 Jahre nach Transplantation an. Dabei betrug die CD4+T-Zellkonzentration in der ATG-Gruppe nicht einmal die Hälfte, verglichen mit den Patienten ohne ATG-Induktion.

Da die CD8+T-Zellkonzentration von der ATG-Induktion unbeeinflusst erschien, resultiert nun daraus eine verschobene CD4/CD8-Ratio. Dies gibt Antwort auf Frage 2 der unter Studienzielen formulierten Fragen.

Die zusätzlich durchgeführte logistische Regressionsanalyse zeigt, dass die ATG-Induktion der einzige Parameter ist, der unabhängig mit dem dauerhaften Abfall der CD4+-T-Zellen assoziiert war (logreg $p=0,0022$). Weitere berücksichtigte Parameter waren die immunsuppressive Erhaltungstherapie, Steroidfreiheit, PRA-Bildung und Lebend-/postmortale Nierenspende. Diese Parameter zeigten keine Assoziation.

Tabelle 8: Subpopulationen mononukleärer Zellen 5 Jahre nach Transplantation, ATG-Gruppe und Non-ATG-Gruppe

	ATG	Non-ATG	P ¹
Mononukleäre Zellen/ μ l	1531 \pm 134	2289 \pm 217	0,004
T-Zellen/ μ l	981 \pm 107	1669 \pm 186	0,001
CD4+-T-Zellen/ μ l	496 \pm 57	929 \pm 81	<0,0005
CD28+ CD4-Zellen [%] ²	87,6 \pm 2,1	91,0 \pm 2,0	0,103
IL-10R+CD4-Zellen [MFI] ³	40 \pm 5	39 \pm 7	0,748
CD8+-T-Zellen/ μ l	450 \pm 58	626 \pm 92	0,219
CD28+ CD8-Zellen [%]	46,3 \pm 3,8	42,6 \pm 2,6	0,597
IL10R+CD8-Zellen [MFI]	28 \pm 5	30 \pm 6	0,882
CD4/CD8 Ratio	1,4 \pm 0,1	1,8 \pm 0,1	0,024
CD56+NK-Zellen/ μ l	55 \pm 11	74 \pm 11	0,247
CD19+B-Zellen/ μ l	119 \pm 25	192 \pm 35	0,075
Il-10R+B-Zellen [MFI]	34 \pm 5	30 \pm 3	0,915
Monozyten/ μ l	372 \pm 39	399 \pm 45	0,954
IL-10R+Monozyten [MFI]	143 \pm 9	153 \pm 7	0,488
CD11a/CD18+CD4-Zellen [%]	99,5 \pm 0,2	99,6 \pm 0,1	0,845
CD11a/CD18+CD8-Zellen [%]	99,4 \pm 0,2	99,4 \pm 0,2	0,714

CD54+CD4-Zellen [%]	38,3±5,4	32,7±5,1	0,386
CD54+CD8-Zellen [%]	37,4±3,8	35,5±4,3	0,607
CD54+Monozyten [%]	71,0±3,4	64,4±4,0	0,253
CD58+Monozyten [%]	68,7±2,9	73,9±3,3	0,316

¹ Wilcoxon-Rangsummentest. Daten sind angegeben in Mittelwert ± SEM,

²% der eingegrenzten Zellen und

³MFI = Mean Fluorescence Intensity.

68 von 84 Patienten hatten ein funktionierendes Transplantat 5 Jahre nach Transplantation, 4 davon verweigerten die Blutentnahme, so dass insgesamt 64 Patienten in diese Analyse eingingen.

Aus Tabelle 8 geht hervor, dass die ATG-Induktion 5 Jahre nach Transplantation keinen Einfluss auf die Expression der gemessenen kostimulatorischen Liganden und Adhäsionsmoleküle hatte. Ebenso wenig hatte sie einen Effekt auf die Expression von IL-10-Rezeptoren 5 Jahre nach Transplantation. Allerdings gilt es zu bedenken, dass ATG in der immunologischen Risikogruppe verabreicht wurde und dort eine initial erhöhte Expression kostimulatorischer Liganden vorgelegen haben könnte.

Es wurde bereits erwähnt, dass die IL-10-Antwort der CD4+T-Zellen 2 Jahre nach Transplantation in der ATG-Gruppe signifikant reduziert war ($p=0,004$, logreg $p=0,064$; 5 Jahre $p=0,457$), während die Expression des IL-10R auf CD4+T-Zellen signifikant erhöht war ($p=0,002$, logreg $p=0,0128$). Das bedeutet, dass die verminderte CD4-Zell-IL-10-Antwort z.T. durch die erhöhte IL10R-Expression auf CD4-Zellen (nicht aber auf CD8-Zellen, B-Lymphozyten und Monozyten) gegenreguliert wurde. 5 Jahre nach der ATG-Induktion war weder die IL-10-Antwort der CD4+T-Zellen noch die IL10R-Expression beeinflusst.

Die ATG-Induktion beeinflusst also die T-Zellfunktion während der ersten beiden Jahre nach Transplantation. Darüber hinaus ist kein Einfluss des ATG auf die T-Zellfunktion nachweisbar.

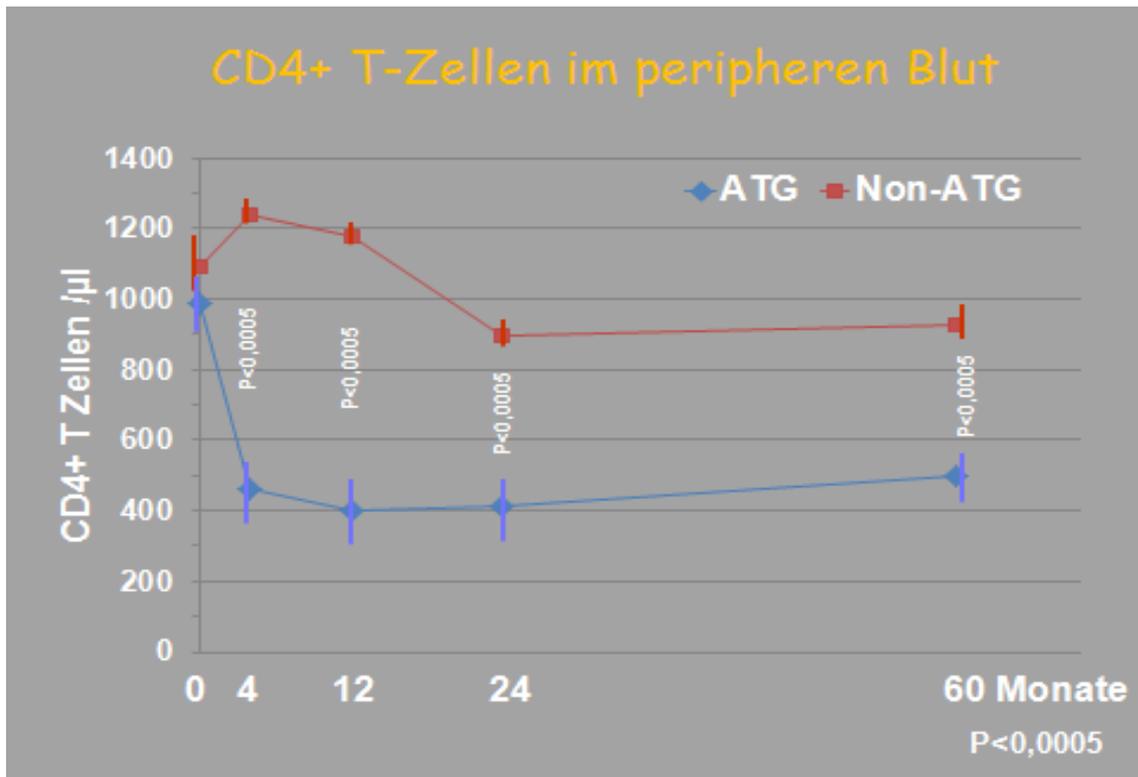


Abbildung 4: CD4+T-Zellen im peripheren Blut, Vergleich ATG und Non-ATG, Langzeitbeobachtung bis 5 Jahre nach Transplantation

Mittelwert \pm SEM sowie p-Werte für statistisch signifikante Unterschiede sind angegeben, Statistik: Wilcoxon-Rangsummentest.

Abbildung 4 zeigt die statistisch signifikant geringere Konzentration von CD4+T-Zellen im Vergleich zur Non-ATG-Gruppe und daraus resultierender signifikant geringeren T-Zellkonzentration mit signifikant niedrigerer CD4/CD8-Ratio. Hier lässt sich der Langzeiteffekt der ATG-Induktionstherapie auf die CD4+T-Zellzahl und die allzeitige signifikante Differenz zwischen ATG und Non-ATG-Gruppe nachvollziehen. Es ergab sich 5 Jahre nach Transplantation ebenfalls eine signifikant geringere Konzentration der mononukleären Zellen (Lymphozyten und Monozyten) im peripheren Blut, was wiederum Frage 3 beantwortet.

Geht man noch einmal zurück zu den klinischen Daten, so ergaben weitere Analysen keinen Vorhersagewert der Konzentration CD4+T-Zellen (prä-Transplantation, 4 Monate und 1 Jahr nach Transplantation) in Bezug auf das Auftreten schwerer Infektionen bis 5 Jahre nach Transplantation. Wie in Kapitel 3.2.5. noch erläutert wird, ließ sich also nicht von den verminderten CD4+T-Zellzahlen auf ein späteres Auftreten schwerer Infektionen schließen. Die CD4/CD8-Ratio war nichtsdestotrotz in den ersten beiden Jah-

ren nach Transplantation in der Gruppe mit schweren Infektionen geringer als in der Vergleichsgruppe (1 Jahr: $0,9 \pm 0,1$ vs $1,5 \pm 0,1$ $p=0.002$).

Zur weiteren Darstellung des Einflusses der ATG-Induktion im Langzeitverlauf wurde neben der T-Zellkonzentration die CD19+B-Zell-Konzentration betrachtet und die Zellkonzentration der 2-Jahresuntersuchung mit der 5-Jahresuntersuchung separat betrachtet und verglichen. Dabei wurde die ATG-Gruppe von der Non-ATG-Gruppe unterschieden.

Tabelle 9: Vergleich CD19+B-Zellkonzentrationen im peripheren Blut 2 Jahre und 5 Jahre nach Transplantation in der ATG- und Non-ATG-Gruppe

	CD19+B-Zellen/ μ l 2 Jahre		CD19+B-Zellen/ μ l 5 Jahre		p ¹
	Mittelwert \pm SEM	n	Mittelwert \pm SEM	n	
Non-ATG	96 \pm 13	36	193 \pm 35	33	<0,0005
ATG	84 \pm 13	35	119 \pm 25	28	0,101

¹Statistik: Wilcoxon-Rangsummentest

Tabelle 10: Abhängigkeit der Differenz der CD19+B-Zellkonzentrationen zwischen den Zeitpunkten 2 Jahre und 5 Jahre nach Transplantation von ATG-Induktion, PRA, HLA-Mismatches, Steroidtherapie sowie Lebendspende versus postmortale Nierenspende

Variable	p
ATG	0,0526
PRAmax	0,0032
HLA-B/DR mismatches	0,0806
Steroidfreie Therapie 5 Jahre nach Transplantation	0,3660
Lebendspende versus postmortaler Nierenspende	0,0143

Statistik: Logistische Regression

Zusätzlich wurde auch der Einfluss der Immunsuppressionserhaltungstherapie betrachtet, dabei wurde in der univariaten Analyse kein Effekt einer Therapie mit CsA versus Tacrolimus ($p=0,1707$) und MMF versus Azathioprin ($p=1,000$) nachgewiesen.

Damit zeigt Tabelle 9, dass die Non-ATG-Gruppe 5-Jahre nach Transplantation signifikant mehr CD19+B-Zellen bildet als 2 Jahre nach Transplantation, während in der ATG-Gruppe zwischen diesen beiden Zeitpunkten kein signifikanter Unterschied zu verzeichnen war.

Tabelle 10 zeigt in einer multivariaten Analyse, dass die ATG-Induktion als unabhängiger Faktor mit dem fehlenden Wiederanstieg der CD19+B-Zellen zwischen 2 und 5 Jahre nach Transplantation assoziiert war.

PRA und HLA-B/DR Mismatches waren bekanntermaßen in der ATG-Gruppe höher. Die ATG-Gruppe beinhaltete auch mehr Lebendspenden.

3.2.3. sCD30, Neopterin und IgA-anti-Fab

Tabelle 11: Vergleich sCD30, Neopterin und IgA-anti-Fab zwischen ATG-und Non-ATG-Gruppe vor Transplantation sowie 4 Monate, 1, 2 und 5 Jahre danach

Variable	ATG	n	Non-ATG	n	p ¹
sCD30 vor Tx [U/ml]	83±4	44	90±7	40	0,858
sCD30 4Mon [U/ml]	44±6	41	51±7	39	0,399
sCD30 1J [U/ml]	41±4	42	47±4	39	0,234
sCD30 2J [U/ml]	41±3	37	51±5	38	0,340
sCD30 5J [U/ml]	45±5	29	38±3	33	0,192
Neo/CR ² 4Mon	1690±215	42	1838±282	39	0,974
Neo/CR 1J	1307±101	41	1351±214	39	0,285
Neo/CR 2J	1544±247	37	1276±134	38	0,535
Neo/CR 5J	1380±138	29	1035±86	33	0,024

IgA-anti-Fab vor Tx [OD] ³	249±77	44	288±87	40	0,183
IgA-anti-Fab 4Mon [OD]	244±84	41	223±62	39	0,197
IgA-anti-Fab 1J [OD]	286±80	40	296±72	39	0,082
IgA-anti-Fab 2J [OD]	249±58	37	318±77	37	0,193
IgA-anti-Fab 5J [OD]	361±69	29	456±88	33	0,592

¹ Statistik: Mann-Whitney-U-Test; angegeben wurden Mittelwert ± SEM

² Neo/CR Quotient Neopterin dividiert durch Kreatinin im Serum; angegeben in nmol/g Kreatinin

³OD = optical density = optische Dichte gemessen bei 405 nm

Es fand sich ein signifikanter Unterschied zwischen ATG und Non-ATG in Bezug auf Neopterin 5 Jahre nach Transplantation. Dieses war in der ATG-Gruppe höher gemessen worden als in der Non-ATG-Gruppe. Es zeigt damit eine höhere Aktivierung des T-Zell-Monozyten-Systems in der immunologischen Risikogruppe an. Dieser Unterschied hatte sich bis 2 Jahre nach Transplantation nicht nachweisen lassen.

Es ließ sich kein Unterschied zwischen der ATG -und der Non-ATG-Gruppe in Bezug auf IgA-anti-Fab nachweisen, was Frage 1 der eingangs gestellten Fragen nach transplantatprotektiven Parametern beantwortet.

Wie bereits im Kapitel 3.1.1. dargestellt, ist ein Zusammenhang zwischen der Höhe des Neopterin- und sCD30-Wertes 1 Jahr nach Transplantation und dem Auftreten der chronischen Transplantatdysfunktion bis 5 Jahre nach Transplantation anzunehmen. Nachfolgend wurde hier noch einmal der Zusammenhang von chronischer Transplantatdysfunktion mit diesen beiden Vorhersagewerten dargestellt und o.g. Ergebnisse bestätigt.

Tabelle 12: Auftreten von chronischer Transplantatdysfunktion 5 Jahre nach Transplantation und sCD30 und Neopterin 1 Jahr nach Transplantation

	Stabile Transplantatfunktion		Chronische Transplantatdysfunktion		p
	Mean	n	Mean	n	
sCD30	39±3	56	54±7	22	0,026
Neo/CR ¹	12±1	56	16±2	22	0,051

Statistik: Mann-Whitney-U-Test; angegeben sind Mittelwert±SEM

¹Neo/CR Quotient Neopterin dividiert durch Kreatinin im Serum; angegeben in nmol/g Kreatinin

Dabei findet sich ein Zusammenhang zwischen der Höhe dieser beiden prädiktiven Marker 1 Jahr nach Transplantation und dem Auftreten einer chronischen Transplantatdysfunktion, für sCD30 lässt sich dabei ein signifikanter Unterschied berechnen, für Neopterin ein tendenzieller Zusammenhang.

Nun wurde (Tabelle 13) der Zusammenhang zwischen sCD30 und Neopterin mit dem Transplantatverlust geprüft.

Tabelle 13: 1- und 2-Jahreswerte der Risikoparameter sCD30 und Neopterin und Transplantatüberlebensrate 5 Jahre nach Transplantation

		Transplantat-	n	kein Transplantat-	n	p
		verlust Mean±SEM		verlust Mean±SEM		
1 Jahr	sCD30 [U/ml]	54±9	13	42±3	68	0,047
	Neo/CR ¹	17±3	12	13±1	68	0,038
2 Jahre	sCD30 [U/ml]	55±8	9	45±3	66	0,178
	Neo/CR	22±6	9	13±1	66	0,007

Statistik: Mann-Whitney-U-Test

¹Neo/CR Quotient Neopterin dividiert durch Kreatinin im Serum; angegeben in nmol/g Kreatinin

Auch hier lassen sich die bereits genannten Ergebnisse bestätigen, da sCD30 1 Jahr nach Transplantation in der Gruppe mit Transplantatverlust signifikant höher ist als in der Gruppe ohne Transplantatverlust. 2 Jahre nach Transplantation war das sCD30 zwischen diesen beiden Gruppen nicht mehr verschieden.

Da sich für Neopterin auch 2 Jahre nach Transplantation ein signifikanter Unterschied zeigte, ist dies hier zusätzlich aufgeführt, denn Neopterin war sowohl 1 als auch 2 Jahre nach Transplantation in der Gruppe mit Transplantatverlust signifikant höher.

Somit wären sCD30 1 Jahr nach Transplantation und Neopterin 1 und 2 Jahre nach Transplantation als prädiktive Marker zu werten.

Dies beantwortet Frage 1 der eingangs gestellten Fragen.

Die Transplantatüberlebensrate wird von der funktionellen Transplantatüberlebensrate unterschieden, weshalb dies im Zusammenhang mit den prädiktiven Markern in Tabelle 14 gesondert betrachtet wurde.

Tabelle 14: 1- und 2-Jahreswerte der Risikoparameter sCD30 und Neopterin und funktionelles Transplantatüberleben 5 Jahre nach Transplantation

		Funktioneller Transplantatverlust	n	kein funktioneller Transplantatverlust	n	p ¹
1 Jahr	sCD30 [U/ml]	52±12	9	42±3	68	0,173
	Neo/CR ¹	18±3	8	13±1	68	0,049
2 Jahre	sCD30 [U/ml]	48±10	5	45±3	66	0,613
	Neo/CR	27±11	5	13±1	66	0,059

Statistik: Mann-Whitney-U-Test, angegeben wurden Mittelwert ± SEM

¹Neo/CR Quotient Neopterin dividiert durch Kreatinin im Serum; angegeben in nmol/g Kreatinin

Dabei lässt sich in der Gruppe mit funktionellem Transplantatverlust 1 Jahr nach Transplantation ein signifikant höherer Neopterinwert finden als in der Gruppe ohne funktionellen Transplantatverlust. Eine statistische Tendenz zwischen diesen beiden Gruppen lässt sich für das Neopterin auch 2 Jahre nach Transplantation noch ausmachen.

3.2.4. HLA-Antikörper

Tabelle 15: Nachweis von HLA-Klasse-I-Antikörpern im ELISA bis 5 Jahre nach Transplantation, Vergleich ATG und Non-ATG

	ATG	Non-ATG	P ¹
Vor Tx	10/44 22,7%	1/40 2,5%	0,008
4 Monate	5/25 20,0%	1/25 4,0%	0,189
1 Jahr	6/40 15,0%	0/39 0%	0,026
2 Jahre	4/37 10,8%	2/37 5,4%	0,674
5 Jahre	3/29 10,3%	0/33 0%	0,097

¹ Statistik: Exakter Fisher Test

Dabei ließen sich vor Transplantation und 1 Jahr nach Transplantation in der ATG-Gruppe signifikant mehr HLA-Klasse-I-Antikörper nachweisen (bedingt durch die Indikation für die ATG-Induktion). Eine de-novo HLA-I-Ak-Bildung ließ sich bis 5 Jahre nach Transplantation nicht nachweisen.

Tabelle 16: Nachweis von HLA-Klasse-II-Antikörpern im ELISA bis 5 Jahre nach Transplantation, Vergleich ATG und Non-ATG

	ATG	Non-ATG	P ¹
Vor Tx	6/44 13,6%	2/40 5,0%	0,269
4Monate	2/25 8%	1/25 4,0%	1,000
1 Jahr	2/41 4,9%	2/39 5,1%	1,000
2 Jahre	2/37 5,4%	1/37 2,7%	1,000
5 Jahre	2/29 6,9%	6/33 18,2%	0,264

¹ Statistik: Exakter Fisher Test

Es ließen sich keine signifikanten Unterschiede im Auftreten von HLA-Klasse-II-Antikörpern im Vergleich der ATG-Gruppe mit der Non-ATG-Gruppe nachweisen. De-novo HLA-Klasse-II-Ak ließen sich bei 5 Patienten in der Non-ATG-Gruppe nachweisen versus 1 Patienten in der ATG-Gruppe. Aufgrund der geringen Fallzahlen sind bezüglich der De-novo-HLA-Klasse-II-Ak keine weiteren Schlüsse möglich.

3.2.5. CD4+T-Zellen: Zellzahl im peripheren Blut und Zellfunktionen; CD4-Helferfunktion

Es wurde zunächst untersucht, welche der aufgeführten Parameter als unabhängige Parameter mit der CD4+T-Zellzahl im peripheren Blut in Beziehung stehen.

Tabelle 17: CD4+T-Zellzahlen 2 Jahre nach Transplantation

Variable	p
Tacrolimus versus CsA	0,3036
MMF versus Aza	0,4262
ATG	0,0022
PRA max ($\geq 10\%$ versus $< 10\%$)	0,6826
Retransplantationen	0,3367

Statistik: logistische Regression

Somit konnte gezeigt werden, dass ATG als einziger unabhängiger Parameter Einfluss auf die CD4+T-Zellzahl hat. Alle anderen Parameter haben keinen Einfluss auf die CD4+T-Zellzahl.

In der univariaten Analyse war auch ein Zusammenhang zwischen PRA ($p=0,0442$) und Re-Transplantation ($p=0,0275$) mit der CD4+T-Zellzahl nachweisbar.

Zusätzlich wurden in der univariaten Analyse die Gruppe der Lebendspenden versus postmortalen Spenden ($p = 0,4125$) und steroidfreie versus steroidhaltige Behandlung ($p = 1,000$) untersucht, wobei sich jedoch keine Assoziation mit der CD4+T-Zellzahl ergab.

Tabelle 18: IL-10-Produktion in CD4+T-Zellen 2 Jahre nach Transplantation

Variable	p
MMF versus Aza	0,0084
ATG	0,0635
Tacrolimus versus CsA	>0,1000
PRA max ($\geq 10\%$) versus ($< 10\%$)	>0,1000

Statistik: logistische Regression

Es zeigte sich, dass ATG als unabhängige Variable mit einer niedrigen IL-10-Antwort in CD4+T-Zellen assoziiert ist.

MMF hat im Vergleich zu Azathioprin einen hoch signifikanten Einfluss auf die IL-10-Antwort der CD4+T-Zellen.

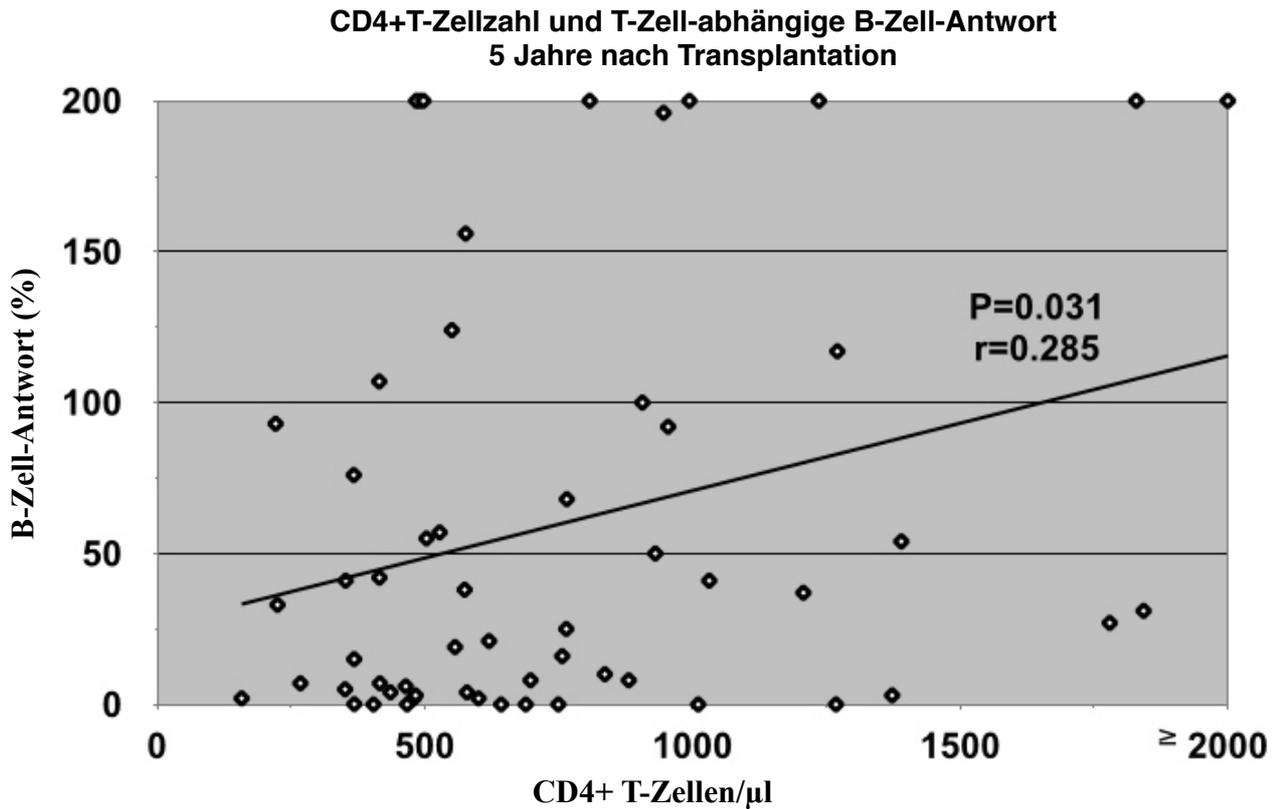


Abbildung 5: CD4+T-Zellzahl und T-Zell-abhängige B-Zell-Antwort 5 Jahre nach Transplantation

Statistik: Pearson's Korrelationskoeffizient

Die verminderte CD4+T-Zellzahl nach ATG-Induktion ging nicht mit einer verminderten CD4+Zellfunktion (CD4-Helferfunktion oder IL-2-Antwort der CD4+-T-Zellen) einher, jedoch mit einer verminderten T-zellabhängigen B-Zell-Antwort.

Nach Bestätigung der ATG-Induktion als unabhängige Einflussgröße auf die CD4+Zellzahl wurde der Zusammenhang zwischen dem Auftreten schwerer Infektionen bis 2 Jahre nach Transplantation und der CD4+T-Zellkonzentration sowie der CD69+T-Zellkonzentration 2 nach Transplantation untersucht.

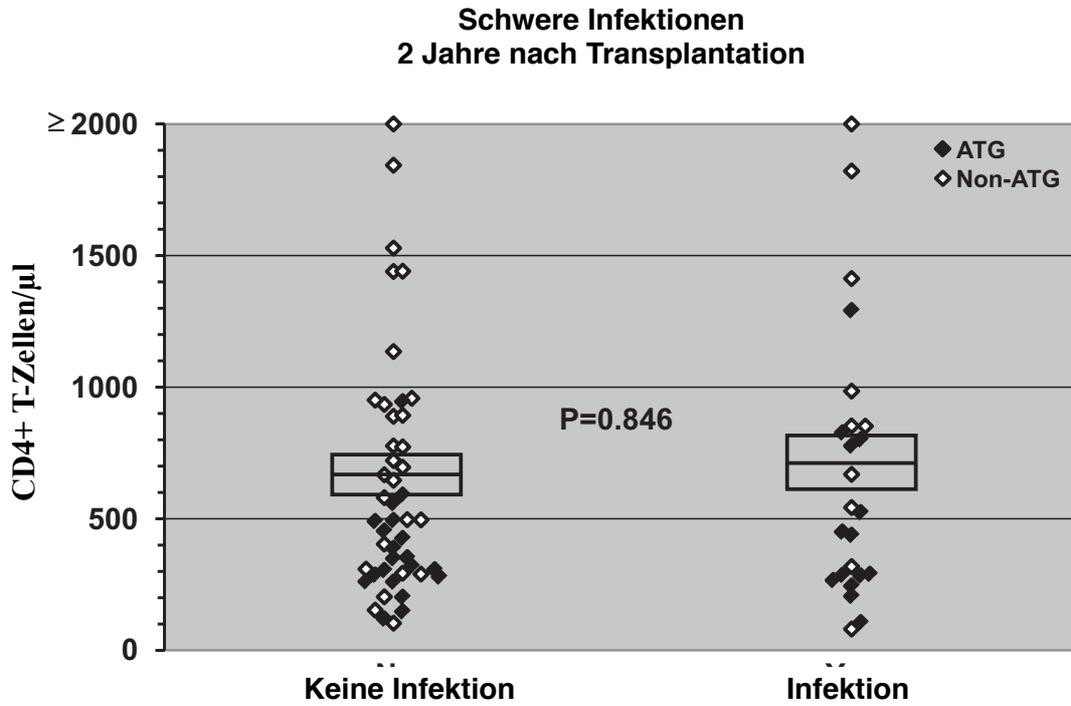


Abbildung 6: Zusammenhang zwischen dem Auftreten schwerer Infektionen und der CD4+T-Zellzahl 2 Jahre nach Transplantation
 Statistik: Wilcoxon Rangsummentest, schwarze Punkte: ATG-Patienten, weiße Punkte Non-ATG-Patienten

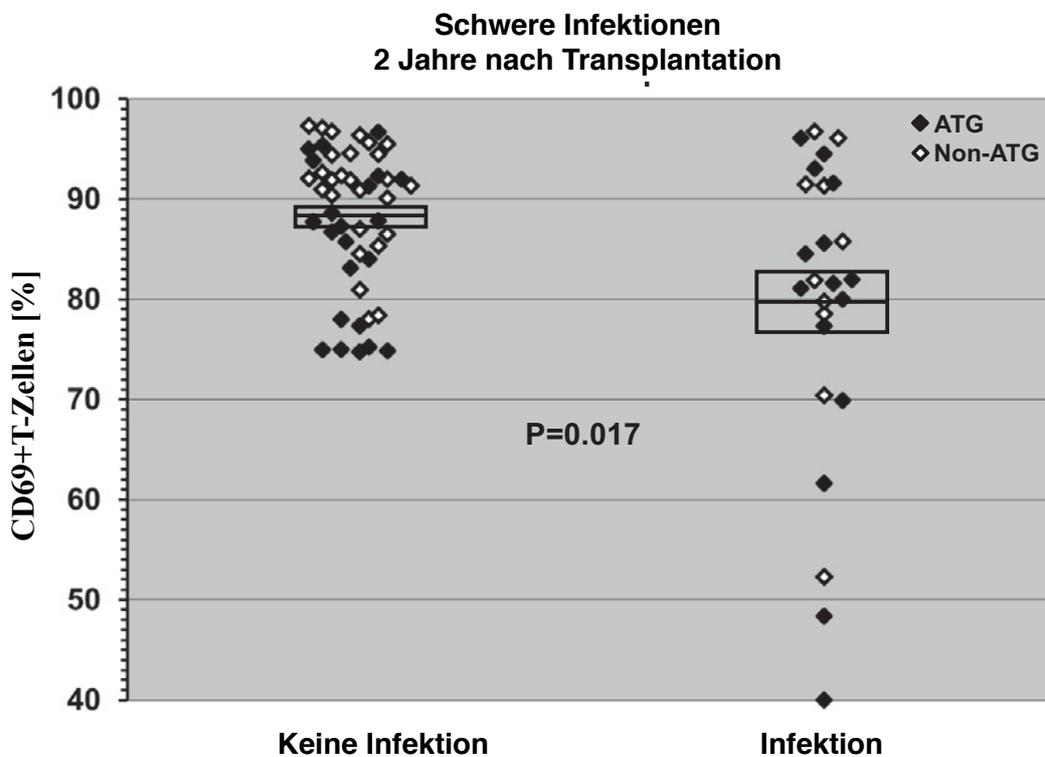


Abbildung 7: Zusammenhang zwischen dem Auftreten schwerer Infektionen und der CD69+T-Zellzahl 2 Jahre nach Transplantation
 Statistik: Wilcoxon Rangsummentest, schwarze Punkte: ATG-Patienten, weiße Punkte Non-ATG-Patienten

Dabei zeigt sich kein signifikanter Zusammenhang zwischen der CD4+T-Zellzahl und dem Auftreten schwerer Infektionen, obgleich diese in der ATG-Gruppe häufiger vorkommen als in der Non-ATG-Gruppe.

Die T-Zellproliferationskapazität war signifikant geringer bei Patienten mit schweren Infektionen während dieses Zeitfensters.

Auch an dieser Stelle wird Frage 2 der unter Studienzielen verfassten Fragen beantwortet.

CD4+T-Zellen als T-Helferzellen induzieren die Freisetzung von IL-2 (aus TH1-Zellen) sowie IL-4 und IL-10 (aus TH2-Zellen).

Da nun die absolute Zahl an T-Helferzellen keinen Zusammenhang mit dem Auftreten schwerer Infektionen zeigt, wurden die intrazellulären Zytokine 5 Jahre nach Transplantation auf einen Zusammenhang mit dem Auftreten schwerer Infektionen untersucht, um Frage 1 zu beantworten.

Tabelle 19: Intrazelluläre Zytokin-Produktion und CD4+T-Zellzahl 5 Jahre nach Transplantation und Auftreten schwerer Infektionen 5 Jahre nach Transplantation

Variable	Schwere Infektion		Keine schwere Infektion		p ¹
	n		n		
CD4+T-Zellen/ μ l	31	667,8 \pm 57,2	30	810,1 \pm 98,5	0,676
CD69+T-Zellen [%]	31	86,4 \pm 1,6	33	90,3 \pm 1,1	0,062
IL-2 aus CD4+T-Zellen [%]	31	36,8 \pm 3,4	33	42,7 \pm 2,3	0,248
IL-4 aus CD4+T-Zellen [%]	31	2,2 \pm 0,5	33	2,8 \pm 0,6	0,110
IL-2 aus CD8+T-Zellen [%]	31	20,1 \pm 2,7	33	22,0 \pm 1,5	0,176

IL-4 aus CD8+T-Zellen [%]	31	1,9±0,5	33	1,8±0,3	0,227
IL-10 aus CD4+T-Zellen [MFI]	31	14,0±2,4	33	12,8±2,0	0,850
IL-10 aus CD8+T-Zellen [MFI]	31	16,8±2,6	33	16,9±2,2	0,782
CD4-Helferfunktion [%]	30	68,2±11,9	31	81,4±12,3	0,402

¹ Statistik: Mann-Whitney-U-Test; angegeben sind Mittelwert± SEM

In Tabelle 19 ergeben sich keine statistisch signifikanten Unterschiede. Eine statistische Tendenz ist zwischen der T-Zell-Proliferationskapazität (CD69) und dem Auftreten schwerer Infektionen auszumachen.

Somit kann also nicht davon ausgegangen werden, dass schwere Infektionen mit veränderten intrazellulären Zytokinen bzw. veränderter CD4+T-Zellzahl einhergehen beziehungsweise die veränderte CD4+T-Zellzahl mit einer veränderten intrazellulären Zytokinproduktion einhergeht.

Zusätzlich wurde das Auftreten schwerer Infektionen 5 Jahre nach Transplantation und intrazelluläre Zytokine 2 Jahre nach Transplantation untersucht, um zu prüfen, ob die T-Zell-Funktion prädiktiv für das Auftreten schwerer Infektionen im Zeitraum bis 5 Jahre nach Transplantation sein kann.

Dabei ergaben sich jedoch immer $p > 0,100$, es ließ sich also auch hier kein Zusammenhang nachweisen.

Als Teil der Zell-Funktionen wurde die CD4-Helferfunktion vor Transplantation, 4 Monate, 1, 2 und 5 Jahre nach Transplantation zwischen ATG- und Non-ATG-Gruppe verglichen.

Tabelle 20: Vergleich CD4-Helferfunktion zwischen Non-ATG-Gruppe und ATG-Gruppe vor Transplantation sowie 4 Monate, 1, 2 und 5 Jahre nach Transplantation

	ATG	n	Non-ATG	n	p
CD4-Helferfunktion vor Tx [%]	99±12	41	85±11	38	0,430
CD4-Helferfunktion 4Mon [%]	88±13	42	72±12	37	0,674
CD4-Helferfunktion 1J [%]	95±12	40	66±12	37	0,072
CD4-Helferfunktion 2J [%]	86±12	37	81±11	36	0,842
CD4-Helferfunktion 5J [%]	77±13	29	73±11	32	0,879

Statistik: Mann-Whitney-U-Test; angegeben wurden Mittelwert ± SEM

Dabei ließen sich in den beiden Gruppen sowohl vor als auch nach Transplantation keine statistisch signifikanten Unterschiede nachweisen.

4. Diskussion

Für die vorliegende Arbeit ergaben sich folgende Fragestellungen:

- 1. Hat die ATG-Induktionstherapie bei Nierentransplantatempfängern Langzeiteffekte auf transplantatprotektive Parameter? Zu diesen protektiven Parametern zählen nachgewiesenermaßen die CD4-Helferfunktion, IL-4 und IL-10-Antwort aus CD4+T-Zellen, sCD30 und Neopterin.**
- 2. Sind die Langzeiteffekte der ATG-Induktionstherapie auf die CD4+T-Zellkonzentration relevant für diese transplantatprotektiven Effekte? Geht eine Reduktion der CD4+T-Zellzahl mit funktionellen Störungen der CD4+T-Zellen einher?**
- 3. Hat die ATG-Induktionstherapie Langzeiteffekte auf andere Lymphozytenpopulationen, Zytokinrezeptoren, kostimulatorische Liganden, Adhäsionsmoleküle oder IgA-anti-Fab?**

- 1. Hat die ATG-Induktionstherapie bei Nierentransplantatempfängern Langzeiteffekte auf transplantatprotektive Parameter?**

Ein wichtiges Ergebnis der vorliegenden Arbeit besteht in der Erkenntnis, dass ATG Langzeiteffekte hat und diese immunologischen Langzeiteffekte der ATG-Induktion sowohl einen starken Abfall von T-Zellen und CD4+T-Zellen hervorrufen (Müller et al. 1997, Thibaudin et al. 2005, Weimer 2005 et al. und Tang et al. 2012), als auch funktionelle Veränderungen dieser Zellen induzieren. Dies betrifft die Proliferationskapazität von T-Zellen und die Produktion von Zytokinen. Diese beiden Effekte auf Zellzahl und Zellfunktion sind allerdings nicht gleichwertig zu sehen. Weimer et al. zeigten bereits 2005, dass die ATG-Induktionstherapie 1 Jahr nach Transplantation einen starken Abfall von T-Zellen und CD4+T-Zellen induziert. Zusätzlich zeigte sich die IL-2-Sekretion aus CD4+T-Zellen unter in-vitro-Bedingungen reduziert. Die TH2-Antwort und die CD4-Helferfunktion blieben jedoch in dieser Untersuchung unbeeinträchtigt.

In der vorliegenden Studie wurden die gleichen Patienten 2 und 5 Jahre nach Transplantation beobachtet. Dafür nutzten wir die sensible Messung der intrazellulären Zytokine, und es muss dabei betont werden, dass diese Technik mit größter Sorgfalt durchgeführt werden muss, um die Validität und Reliabilität sicherzustellen (Weimer et al. 2011).

Mittels multivariater Analyse konnte nun gezeigt werden, dass die ATG-Induktionstherapie mit dem tiefen und persistierenden Abfall der CD4+T-Zellen bis 5 Jahre nach ATG-Induktion assoziiert war.

Das wichtigste Ergebnis lag dabei in der Feststellung, dass die Suppression der T-Zell-Funktion nur bis 2 Jahre nach ATG-Induktion nachweisbar war. Nach diesem Zeitpunkt war die T-Zell-Funktion wiederhergestellt (betrifft T-Zell-Proliferation und IL-10-Antwort aus CD4+T-Zellen).

Diese eingeschränkte T-Zell-Funktion bis 2 Jahre nach Transplantation ging mit einer doppelt so hohen Rate an schweren Infektionen während dieser ersten beiden Jahre einher.

Die verminderte TH2-Antwort (IL-10 aus CD4+T-Zellen) sagt ein verbessertes Transplantat-Outcome voraus (Weimer et al. 1996, Weimer et al. 1998, Süsal et al. 2002, Weimer et al. 2002, Weimer et al. 2006, Süsal et al. 2011). Die verfügbaren Literaturangaben weisen übereinstimmend darauf hin.

Passend zu diesen Daten ist das vorteilhafte klinische Outcome der ATG-Gruppe in der vorliegenden Analyse: Obwohl die Gruppe, welche mit ATG behandelt wurde, aus immunologischen Risikopatienten bestand, unterschied sich das 5-Jahres-Outcome der ATG-Gruppe nicht signifikant von dem der Non-ATG-Gruppe, welche einem Niedrigrisikokollektiv angehörte.

Neben diesen Ergebnissen wurde der prädiktive Wert sowohl für Neopterin als auch für sCD30 in Bezug auf chronische Transplantatdysfunktion, Transplantatverlust und funktionellen Transplantatverlust untersucht. Hierbei ergab sich ein Zusammenhang zwischen dem sCD30-Level 1 Jahr nach Transplantation und dem Auftreten einer chronischen Transplantatdysfunktion 5 Jahre nach Transplantation, der auch statistisch durch eine multivariate Analyse gesichert werden konnte. Weiterhin ließ sich statistisch relevant ein Zusammenhang zwischen erhöhtem sCD30 1 Jahr nach Transplantation und dem Transplantatverlust 5 Jahre nach Transplantation nachweisen. Dieser Zusammen-

hang war mit dem sCD 30-Wert 2 Jahre nach Transplantation nicht mehr nachweisbar. Ein Zusammenhang zwischen sCD30 und dem funktionellem Transplantatverlust war nicht gegeben.

Dies weist darauf hin, dass ein erhöhter sCD30-Wert 1 Jahr nach Transplantation schon prognostische Aussagen über das Outcome 5 Jahre nach Transplantation zulässt und somit nicht nur von statistischer sondern von klinischer Relevanz ist.

Auch Neopterin 1 Jahr nach Transplantation schien einen Zusammenhang mit der chronischen Transplantatdysfunktion 5 Jahre zu haben.

Ein erhöhter Neopterin-Wert sowohl 1 Jahr als auch 2 Jahre nach Transplantation ging statistisch nachweisbar mit einer erhöhten Rate an Transplantatverlusten 5 Jahre nach Transplantation einher. Ein funktioneller Transplantatverlust liess sich durch ein erhöhtes Neopterin 1 Jahr nach Transplantation in der univariaten Analyse vorhersagen, konnte jedoch durch eine multivariate Analyse nicht bestätigt werden. Ein erhöhtes Neopterin 2 Jahre nach Transplantation ließ diese Vorhersage jedoch nicht mehr zu, war aber der Tendenz nach immer noch vorhanden.

Somit könnte auch Neopterin 1 und 2 Jahre nach Transplantation von prognostischer Relevanz sein, um das Outcome nach 5 Jahren vorherzusagen.

Wovon wird sCD30 beeinflusst? Weimer et al. 2006 beschrieben einen Einfluß von CMV- Infektionen auf den Anstieg von sCD30 und Neopterin. Unbeeinflusst blieben diese beiden prognostischen Werte von einer ATG-Induktion und akuten Abstoßungen. Auf diese prognostischen Parameter hat ATG also keinen Einfluss.

Eine reduzierende Wirkung auf sCD30 und Neopterin hatte der Einsatz von Tacrolimus im Vergleich zu Ciclosporin A.

2. Sind die Langzeiteffekte der ATG-Induktionstherapie auf die CD4+T-Zellkonzentration relevant für diese transplantatprotektiven Effekte? Geht eine Reduktion der CD4+T-Zellzahl mit funktionellen Störungen der CD4+T-Zellen einher?

Es wird allgemein angenommen, dass die Langzeiteffekte der ATG-Induktionstherapie mit der Fähigkeit von ATG in Zusammenhang stehen, die CD4+T-Zellen zu reduzieren. Diese Fähigkeit konnte in vorliegender Studie erneut belegt werden. Weitere immunologische Langzeiteffekte der ATG-Induktion waren bis zur Durchführung der Studie nicht untersucht. In der vorliegenden Studie konnte gezeigt werden, dass die ATG-Induktion die T-Zellproliferationskapazität und die IL10-Antwort aus CD4+T-Zellen signifikant reduziert. Diese funktionellen Veränderungen gingen mit einer erhöhten Anzahl schwerer Infektionen in der ATG-Gruppe in den ersten beiden Jahren nach Transplantation einher. Allerdings war nur die verminderte T-Zell-Proliferation 2 Jahre nach Transplantation mit einem erhöhten Risiko schwerer Infektionen assoziiert. Somit kann gesagt werden, dass die ATG-Induktionstherapie nach Transplantation einen in multivariater Analyse nachgewiesenen Zusammenhang mit reduzierter T-Zellproliferationskapazität und IL-10-Antwort aus CD4+T-Zellen hat und ein verstärktes Auftreten in den ersten beiden Jahren nach Transplantation mit verminderter T-Zell-Proliferation assoziiert ist, jedoch nicht über diesen Zeitraum hinaus.

Andere immunologische Langzeiteffekte nach ATG-Induktion sind nicht nachgewiesen worden. Ein erhöhter Prozentsatz an regulatorischen T-Zellen im peripheren Blut sowie eine Verminderung der donor-reaktiven T-Zellen nach ATG-Induktion könnten transplantatprotektive Effekte darstellen. Diese Effekte konnten allerdings nur bis 6 Monate nach Transplantation nachgewiesen werden (Sewgobind et al. 2009, Cherkassky et al. 2011, Tang et al. 2012).

Während einige Publikationen einen Jahre anhaltenden CD4+T-Zellabfall nach ATG-Induktion beschreiben (Müller 1997 et al., Thibaudin 2005 et al. und Weimer et al. 2005, Tang et al. 2012), weitet die vorliegende Arbeit diese Ergebnisse aus und zeigt, dass die ATG-Induktionstherapie mit stark verminderter CD4+T-Zellzahl im peripheren Blut bis zu 5 Jahre nach Transplantation einhergeht, die T-Zellfunktion sich jedoch jen-

seits von 2 Jahren nach Transplantation wieder erholt. Eine CD4+T-Zell-Depression geht also nicht mit einer funktionellen Störung dieser CD4+T-Zellen einher. Die CD4+T-Zellzahl steht langfristig in keinem Zusammenhang mit dem Einfluss auf transplantatprotektive Effekte.

Unsere Ergebnisse waren unbeeinflusst durch zusätzliche Gaben von lymphozytenreduzierenden Medikamenten wie ATG und OKT3. Eine solche Behandlung war nicht erforderlich, da keine akuten, steroidresistenten Abstoßungsreaktionen auftraten.

3. Hat die ATG-Induktionstherapie Langzeiteffekte auf andere Lymphozytenpopulationen, Zytokinrezeptoren, kostimulatorische Liganden, Adhäsionsmoleküle oder IgA-anti-Fab?

Ein wichtiges Ergebnis dieser Arbeit ist die Erkenntnis, dass das gesteigerte Risiko für schwere Infektionen in den ersten beiden Jahren nach der ATG-Induktion nicht im Zusammenhang stand mit dem ausgeprägten Abfall der CD4+T-Zellzahl im peripheren Blut. Es ist vielmehr auf die eingeschränkte T-Zellproliferationskapazität zurückzuführen. Diese war bis 2 Jahre nach Transplantation nachweisbar, jedoch 5 Jahre nach der ATG-Induktion nicht mehr.

Während Ducloux et al. 1998 ein erhöhtes Risiko für opportunistische Infektionen bei Nierentransplantatempfängern beschrieben, die nach der Transplantation eine dauerhafte CD4-Lymphopenie aufwiesen, fanden Calarota et al. 2012 einen signifikanten Zusammenhang zwischen dem Auftreten schwerer Infektionen und niedriger CD8+T-Zellzahl. Einen Zusammenhang mit einer niedrigen CD4+T-Zellzahl konnten Calarota et al. nur bei Herztransplantatempfängern, aber nicht bei Nierentransplantatempfängern nachweisen.

Ducloux et al. zeigten 1998, dass die Thymusfunktion vor Transplantation die Wiederherstellung der CD4-Zellen voraussagen kann sowie auch die Inzidenz an Infektionen und malignen Tumoren nach ATG-Behandlung.

Obwohl diese Daten einen Zusammenhang zwischen der CD4-Lymphopenie nach ATG-Induktion und dem Risiko an Infektionen andeuten, beschrieben Ducloux et al. 1998

einen solchen Zusammenhang nicht. Nach unseren eigenen Daten scheint eine Wiederherstellung der verminderten CD4+T-Zellen nach ATG-Induktion nicht nur die Anzahl der CD4+T-Zellen zu verändern, sondern auch eine funktionelle Erholung der CD4+T-Zellen hervorzurufen. Diese funktionelle Erholung ist für das Risiko von Infektionen relevant und reduziert es.

Überraschenderweise konnten wir feststellen, dass sowohl funktionelle Veränderungen der CD4+T-Zell-Zytokinproduktion als auch die CD4-Helferaktivität keinen Zusammenhang mit der ATG-induzierten CD4+T-Zellreduktion zeigten.

Die Lymphozytenpopulation der CD19+ B-Zellen zeigte zum Zeitpunkt 2 Jahre nach Transplantation signifikant geringere Zellkonzentrationen als zum Zeitpunkt 5 Jahre nach Transplantation, und zwar in der non-ATG Gruppe. Demgegenüber fand sich in der ATG Gruppe kein signifikanter Anstieg der B-Zell-Konzentration 5 Jahre im Vergleich zu 2 Jahre nach ATG-Gabe. Die multivariate Analyse ergab, dass die ATG-Induktion als unabhängiger Faktor mit dem fehlenden Anstieg der B-Zell-Konzentration zwischen den Zeitpunkten 2 und 5 Jahre nach Transplantation assoziiert war. Somit scheint ATG den ansonsten auftretenden Anstieg der B-Zell-Konzentration im peripheren Blut zwischen 2 und 5 Jahre nach Transplantation zu verhindern. Dies könnte transplantatprotektiv sein, falls damit eine verminderte de-novo Bildung von donorspezifischen Antikörpern einhergehen würde.

Die CD4-Helferfunktion, Adhäsionsmoleküle, kostimulatorische Liganden sowie IgA-Anti-Fab blieben im Langzeitverlauf von der ATG-Induktionstherapie unbeeinflusst.

Während die Expression des IL-10R auf CD4+T-Zellen kompensatorisch in den ersten beiden Jahren erhöht war, ließ sich dieser Effekt über diesen Zeitpunkt hinaus nicht mehr nachweisen. Der IL-10R auf CD8+T-Zellen oder Monozyten zeigte sich im gesamten Beobachtungszeitraum unbeeinflusst.

In einer Studie bei HIV-infizierten Patienten konnten Weimer et al. 1989 und 1991 zeigen, dass funktionelle Veränderungen von CD4-Zellen (CD4-Helferaktivität) in keinem Zusammenhang mit der CD4-Zellverminderung dieser Patienten standen. Allerdings trugen diese funktionellen Veränderungen signifikant zum Status der Immundefizienz bei.

Unsere Daten belegen, dass das Auftreten schwerer Infektionen während der ersten beiden Jahre nach Transplantation im Zusammenhang mit verminderter T-Zellproliferationskapazität steht. Sie zeigen, dass es nicht durch den numerischen Abfall von T-Zellen, sondern durch die funktionellen Veränderungen dieser Zellen zu einem erhöhten Risiko an schweren Infektionen kommt.

Funktionelle T-Zellveränderungen und ein stark erhöhtes Risiko an schweren Infektionen waren zeitgleich während der ersten beiden Jahre nach ATG-Induktion zu beobachten, während der signifikante Abfall der CD4+T-Zellen sowohl in den ersten beiden Jahren nach Transplantation als auch im Zeitraum 2-5 Jahre nach Transplantation zu beobachten war. In diesem Zeitraum war kein erhöhtes Risiko für schwere Infektionen zu verzeichnen.

Es muss berücksichtigt werden, dass es unterschiedliche Effekte der verschiedenen ATG-Zubereitungen gibt (z.B. ATG-Fresenius oder Thymoglobulin), welche bislang nicht in einer kontrollierten Studie verglichen wurden.

Während Thymoglobulin durch die Immunisierung von Kaninchen mit humanen Thymozyten hergestellt wird, wird ATG-Fresenius (welches in vorliegender Studie benutzt wurde) durch die Immunisierung von Kaninchen mit T-Zellen der Jurkat-Zelllinie hergestellt. Diese ähneln aktivierten T-Zellen und tragen den EBV/C3d-Rezeptor (CD21). Dies erklärt, warum das Spektrum an Zielantigenen bei ATG-Fresenius viel kleiner ist als das Spektrum bei Thymoglobulin. Dieses schmalere Spektrum von Zielantigenen (inklusive des EBV/C3d-Rezeptors) könnte einen Einfluss auf die immunologischen Effekte des ATG haben und somit auch auf das Risiko des Auftretens von Infektionen und malignen Tumoren.

Die Daten der CTS (Collaborative Transplant Study) zeigen, dass die Inzidenz an Non-Hodgkin-Lymphomen nach Transplantation bei Patienten, welche mit Thymoglobulin behandelt wurden, signifikant höher war als bei Patienten, welche mit ATG-Fresenius behandelt wurden (Opelz et al. 2006).

Das Auftreten maligner Tumoren war in der vorliegenden Studie zu selten, um aussagekräftige Daten zu liefern.

Wir wissen, dass auch die vorliegende Studie ihre Einschränkungen hat. Obwohl es sich um eine prospektive Langzeitstudie handelt, war aus ethischen Gründen keine Rando-

misierung vornehmbar. Eine Randomisierung hätte eine Behandlung von Niedrig-Risiko-Patienten mit ATG und eine fehlende ATG-Induktion bei Hochrisikopatienten zur Folge gehabt.

Die Ergebnisse der Analyse sind angemessen tragfähig, da potentielle Störfaktoren durch die multivariate Analyse erfasst werden konnten. Es waren keine weiteren Induktionstherapien (monoklonaler Ak gegen CD25) oder lymphozyten-limitierenden Behandlungen (ATG, OKT3) aufgrund von Abstossungsreaktionen erforderlich.

Zusammenfassend konnte in dieser Studie über die immunologischen Langzeiteffekte einer ATG-Induktionstherapie und deren Einfluss auf T-Zellen (CD4-Helferaktivität, T-Zellproliferationskapazität und Zytokinproduktion) nach ATG-Induktion bei Nierentransplantatempfängern ein signifikant erhöhtes Risiko für schwere Infektionen während der ersten beiden Jahre nach Induktion nachgewiesen werden. Dies war nicht durch den ATG-induzierten CD4-Zellabfall hervorgerufen, sondern stand vielmehr im Zusammenhang mit der verminderten T-Zell-Funktion, welche in den ersten beiden Jahren nach Transplantation zu beobachten war. Über diesen Zeitpunkt hinaus bestand eine normale T-Zell-Funktion und somit auch kein erhöhtes Risiko für das Auftreten schwerer Infektionen.

5. Zusammenfassung

Es konnte bereits gezeigt werden, dass Kaninchen ATG in Empfängern von Nierentransplantaten eine starke Reduktion von CD4+T-Zellen induziert und mit reduzierter *in vitro* IL-2-Sekretion bis 1 Jahr nach Transplantation einhergeht.

Um nun weitere immunologische Langzeiteffekte der ATG-Induktionstherapie 2 Jahre und 5 Jahre nach Transplantation zu charakterisieren wurden in vorliegender Arbeit in derselben Patientengruppe sensible intrazelluläre Zytokinanalysen durchgeführt. In diese bezüglich der Erhaltungssimmunsuppression randomisiert prospektiven Studie wurden 84 Nierentransplantatempfänger eingeschlossen. Davon erhielt eine immunologische Hochrisikogruppe (n=44) eine ATG-Induktionstherapie. Anschliessend erfolgte die Auswertung ATG-Gruppe versus Non-ATG-Gruppe (n=40; immunologische Niedrigrisikogruppe) ATG versus Non-ATG: nicht randomisiert.

Dabei konnte eine signifikant gesteigerte Rate an schweren Infektionen in der Hochrisikogruppe nach ATG-Induktion 2 Jahre nach Transplantation nachgewiesen werden ($p=0,027$). Anschliessend glichen sich die beiden Gruppen an. Das Risiko für schwere Infektion unterschied sich nach 2 Jahren in der Hochrisikogruppe nicht mehr von dem der Niedrigrisikogruppe.

Ausserdem konnten verminderte T-Zellfunktionen bis 2 Jahre nach Transplantation gefunden werden. Über diesen Zeitpunkt hinaus konnten diese Effekte jedoch nicht gezeigt werden. Von diesen Funktionen war die IL-10-Antwort in CD4+T-Zellen (logreg $p=0,064$) signifikant nach ATG-Induktionstherapie reduziert. Auch die T-Zellproliferation war bis 2 Jahre nach Transplantation signifikant nach ATG-Induktion reduziert (log $p=0,038$). Reduzierte T-Zellproliferation 2 Jahre nach Transplantation war mit dem Auftreten schwerer Infektionen assoziiert ($p=0,017$).

Mittels multivariater Analyse konnte gezeigt werden, dass die ATG-Induktionstherapie mit dem tiefen und persistierenden Abfall von CD4+T-Zellen bis 5 Jahre nach ATG-Induktion assoziiert war ($p<0,0005$). Diese reduzierte CD4+T-Zellzahl war unabhängig mit der ATG-Induktionstherapie assoziiert (logreg $p=0,002$). Es bestand jedoch kein Zusammenhang mit reduzierter CD4-Zellfunktion (Helferaktivität/Zytokinproduktion) oder mit dem Auftreten schwerer Infektionen.

Schlussfolgernd lässt sich sagen, dass das Auftreten schwerer Infektionen bis 2 Jahre nach ATG-Induktion mit einer beeinträchtigten T-Zellproliferationskapazität assoziiert war, jedoch in keinem Zusammenhang zu sehen ist mit dem ausgeprägten CD4+T-Zellzahl-Abfall, welcher nach ATG-Induktion auftrat und bis 5 Jahre nach Transplantation anhielt.

6. Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Klinische Daten und Transplantationsdaten der Patienten in der ATG-Gruppe bzw. in der Non-ATG-Gruppe

Tabelle 2: Transplantationsergebnisse 5 Jahre nach Transplantation, Vergleich zwischen ATG-Gruppe und Non-ATG-Gruppe

Tabelle 3: Immunvermittelte Funktionsverschlechterung oder immunvermittelter Transplantatverlust 5 Jahre nach Transplantation

Tabelle 4: Auftreten schwerer Infektionen und maligner Tumore in den Zeitabschnitten 0 – 2, 2 – 5 und 0 – 5 Jahre

Tabelle 5: Schwere Infektionen 0 bis 5 Jahre nach Transplantation

Tabelle 6: Vergleich der Produktion intrazellulärer Zytokine in mononukleären Zellen, ATG-Gruppe und Non-ATG-Gruppe 5 Jahre nach Transplantation

Tabelle 7: Subpopulationen mononukleärer Zellen 2 Jahre nach Transplantation, ATG-Gruppe und Non-ATG-Gruppe

Tabelle 8: Subpopulationen mononukleärer Zellen 5 Jahre nach Transplantation, ATG-Gruppe und Non-ATG-Gruppe

Tabelle 9: Vergleich CD19+B-Zellkonzentrationen im peripheren Blut 2 Jahre und 5 Jahre nach Transplantation in der ATG-Gruppe und Non-ATG-Gruppe

Tabelle 10: Abhängigkeit der Differenz der CD19+B-Zellkonzentrationen zwischen den Zeitpunkten 2 Jahre und 5 Jahre nach Transplantation von ATG-Induktion, PRA, HLA-Mismatches, Steroidtherapie sowie Lebendspende versus postmortale Nierenspende

Tabelle 11: Vergleich sCD30, Neopterin und IgA-anti-Fab zwischen ATG-und Non-ATG-Gruppe vor Transplantation sowie 4 Monate, 1, 2 und 5 Jahre danach

Tabelle 12: Auftreten von chronischer Transplantatdysfunktion 5 Jahre nach Transplantation und sCD30 und Neopterin 1 Jahr nach Transplantation

Tabelle 13: 1- und 2-Jahreswerte der Risikoparameter sCD30 und Neopterin und Transplantatüberlebensrate 5 Jahre nach Transplantation

Tabelle 14: 1- und 2-Jahreswerte der Risikoparameter sCD30 und Neopterin und funktionelles Transplantatüberleben 5 Jahre nach Transplantation

Tabelle 15: Nachweis von HLA-Klasse-I-Antikörpern im ELISA bis 5 Jahre nach Transplantation, Vergleich ATG und Non-ATG

Tabelle 16: Nachweis von HLA-Klasse-II-Antikörpern im ELISA bis 5 Jahre nach Transplantation, Vergleich ATG und Non-ATG

Tabelle 17: CD4+T-Zellzahlen 2 Jahre nach Transplantation

Tabelle 18: IL-10-Produktion in CD4+T-Zellen 2 Jahre nach Transplantation

Tabelle 19: Intrazelluläre Zytokin-Produktion und CD4+T-Zellzahl 5 Jahre nach Transplantation und Auftreten schwerer Infektionen 5 Jahre nach Transplantation

Tabelle 20: Vergleich CD4-Helferfunktion zwischen Non-ATG-Gruppe und ATG-Gruppe vor Transplantation sowie 4 Monate, 1, 2 und 5 Jahre nach Transplantation

7. *Abbildungsverzeichnis*

Abbildung 1: Beispiel der Auswertung der durchflusszytometrischen Messung

Abbildung 2: Beispiel der Auswertung der Interleukinfreisetzung aus CD4⁺T-Zellen in der durchflusszytometrischen Messung

Abbildung 3: T-Zellproliferation, intrazelluläre IL-2, IL-4 und IL-10-Produktion 2 und 5 Jahre nach Transplantation

Fortsetzung Abbildung 3: T-Zellproliferation, intrazelluläre IL-2, IL-4 und IL-10-Produktion 2 und 5 Jahre nach Transplantation

Abbildung 4: CD4⁺T-Zellen im peripheren Blut, Vergleich ATG und Non-ATG, Langzeitbeobachtung bis 5 Jahre nach Transplantation

Abbildung 5: CD4⁺T-Zellzahl und T-Zell-abhängige B-Zell-Antwort 5 Jahre nach Transplantation

Abbildung 6: Zusammenhang zwischen dem Auftreten schwerer Infektionen und der CD4⁺T-Zellzahl 2 Jahre nach Transplantation

Abbildung 7: Zusammenhang zwischen dem Auftreten schwerer Infektionen und der CD69⁺T-Zellzahl 2 Jahre nach Transplantation

8. Literaturverzeichnis

Abbas, A, Lichtmann, A. Basic Immunology Functions and Disorders of the immune system. 2001, W.B. Saunders Company.

Abe M, Kawai T, Futatsuyama K et al. Postoperative production of anti-donor antibody and chronic rejection in renal transplantation. *Transplantation* 1997; 63: 1616-1619.

Almond PS, Matas A, Gillingham K et al. Risk factors for chronic rejection in renal allograft recipients. *Transplantation* 1993; 55: 752-756.

Almond PS, Matas A, Gillingham K et al. Predictors of chronic rejection in renal transplant recipients. *Transplant Proc* 1993; 25: 936.

Artz MA, Boots JM, Ligtenberg G et al. Improved cardiovascular risk profile and renal function in renal transplant patients after randomized conversion from Ciclosporine to Tacrolimus. *J Am Soc Nephrol* 2003; 14: 1880-1888.

Artz MA, Boots JM, Ligtenberg G et al. Conversion from Ciclosporine to Tacrolimus improves quality-of-life indices, renal graft function and cardiovascular risk profile. *Am J Transplant* 2004; 4: 937-945.

Assfalg V, Hüser N, van Meel M et al. High-urgency kidney transplantation in the Eurotransplant Kidney Allocation System: success or waste of organs? The Eurotransplant 15-year all-centre survey. *Nephrol Dial Transplant* 2016; 31: 1515-1522.

Basu A, Falcone JL, Tan HP et al. Chronic allograft nephropathy score before sirolimus rescue predicts allograft function in renal transplant patients. *Transplant Proc* 2007; 39: 94-98.

Blume, C, Helmchen, U, Kurschat, CE et al. Chronische Transplantatdysfunktion und Möglichkeiten zur Beeinflussung der Progression. *Der Nephrologe* 2006; 1: 241-254.

Bödeker, RH, Einführung in die medizinische Statistik, 2001, Verlag der Ferber'schen Universitätsbuchhandlung.

Boom H, Mallat MJ, de Fijter JW et al. Delayed graft function influences renal function, but not survival. *Kidney Int* 2000; 58: 859-866.

Borrows R, Chusney G, Loucaidou M et al. Mycophenolic acid 12-h trough level monitoring in renal transplantation: association with acute rejection and toxicity. *Am J Transplant* 2006; 6: 121-128.

Breulmann B, Bantis C, Siekierka M et al. Influence of cytokine genes polymorphisms on long-term outcome in renal transplantation. *Clin Transplant* 2007; 21: 615-621.

Brunet M, Crespo M, Millan O et al. Pharmacokinetics and pharmacodynamics in renal transplant recipients under treatment with Ciclosporine and Myfortic. *Transplant Proc* 2007; 39: 2160-2162.

Bühling, KJ, Lepenies, J, Witt, K, Intensivkurs Allgemeine und spezielle Pathologie, 2. Auflage, 2000, Urban & Fischer.

Calarota SA, Zelini P, De Silvestri A et al. Kinetics of T-lymphocyte subsets and post-transplant opportunistic infections in heart and kidney transplant recipients. *Transplantation*. 2012; 93: 112-119.

Chang HR, Lin CC, Lian JD Predictors of renal function improvement following Tacrolimus conversion in Ciclosporine-treated kidney transplant recipients. *Transplant Proc* 2007; 39: 3135-3141.

Chapman JR, O'Connell PJ, Nankivell BJ. Chronic renal allograft dysfunction. *J Am Soc Nephrol* 2005; 16: 3015-3026.

Cherkassky L, Lanning M, Lalli PN et al. Evaluation of alloreactivity in kidney transplant recipients treated with antithymocyte globulin versus IL-2 receptor blocker. *Am J Transplant* 2011; 11: 1388-1396.

O'Connell PJ, Nankivell BJ, Chapman JR et al. Biopsy transcriptome expression profiling to identify kidney transplants at risk of chronic injury: a multicentre, prospective study. *Lancet* 2016; 388: 983-993.

Cosio FG, Henry M, Pesavento TE et al. The relationship between donor age and cadaveric renal allograft survival is modified by the recipient's blood pressure. *Am J Transplant* 2003; 3: 340-347.

Crispin JC, Martinez A, de Pablo P et al. Participation of the CD69 antigen in the T-cell activation process of patients with systemic lupus erythematosus. *Scand J Immunol* 1998; 48: 196-200

Davies NM, Grinyó J, Meier-Kriesche HU et al. Gastrointestinal side effects of mycophenolic acid in renal transplant patients: a reappraisal. *Nephrol Dial Transplant* 2007; 22: 2440-2448.

Diethelm AG, Blackstone EH, Naftel DC et al. Important risk factors of allograft survival in cadaveric renal transplantation. A study of 426 patients. *Ann Surg* 1988; 207: 538-548.

Djamali A, Turc-Baron C, Portales P et al. Low dose anti-thymocyte globulins in renal transplantation: daily versus intermittent administration based on T-cell monitoring. *Transplantation* 2000; 69: 799-805.

Ducloux D, Carron PL, Racadot E, CD4 lymphocytopenia in long-term renal transplant recipients. *Transplant Proc* 1998; 30: 2859-2860.

Ekberg H, Grinyo J, Nashan B et al. Cyclosporine sparing with mycophenolate mofetil, daclizumab and corticosteroids in renal allograft recipients: the CAESAR Study. *Am J Transplant* 2007; 7: 560-570.

Ekberg H, Tedesco-Silva H, Demirbas A et al. Reduced exposure to calcineurin inhibitors in renal transplantation. *N Engl J Med* 2007; 357: 2562-2575.

Emami S, Huang E, Kuo HT et al. Multivariate analysis of antibody induction therapy and their associated outcomes in live donor kidney transplantation in the recent era. *Clin Transplant* 2012; 26: 351-358.

Flechner SM, Kurian SM, Solez K et al. De novo kidney transplantation without use of calcineurin inhibitors preserves renal structure and function at two years. *Am J Transplant* 2004; 4: 1776-1785.

Firoz CK, Jabir NR, Kamal MA et al. Neopterin: An immune biomarker of coronary artery disease and its association with other CAD markers. *IUBMB Life*. 2015; 67: 453-459.

Frimat L, Cassuto-Viguier E, Charpentier B et al. Impact of Cyclosporine reduction with MMF: a randomized trial in chronic allograft dysfunction. The 'reference' study. *Am J Transplant* 2006; 6: 2725-2734.

Fritsche L, Horstrup J, Budde K et al. Old-for-old kidney allocation allows successful expansion of the donor and recipient pool. *Am J Transplant* 2003; 3: 1434-1439.

Fuchs D, Hausen A, Reibnegger G et al. Neopterin as a marker for activated cell-mediated immunity: Application in HIV infection. *Immunol Today* 1988; 9: 150-155.

Gavela E, Avila A, Sancho A et al. Benefits derived from late steroid withdrawal in renal transplant recipients. *Transplant Proc* 2007; 39: 2173-2175.

Gonzalez MM, Morales JM, Marcen R et al. Renal function in patients with cadaveric kidney transplants treated with Tacrolimus or Ciclosporine. *Transplant Proc* 2007; 39: 2167-2169.

Guerra G, Srinivas TR, Meier-Kriesche HU et al. Calcineurin inhibitor-free immunosuppression in kidney transplantation. *Transpl Int* 2007; 20: 813-827.

Hack N, Angra S, McKnight T et al. HLA class II-like antiidiotypic antibodies from highly sensitized patients inhibit T-cell alloresponses. *Am J Transplant* 2008; 8: 111-120.

Halloran PF, Langone AJ, Helderman JH et al. Assessing long-term nephron loss: is it time to kick the CAN grading system? *Am J Transplant* 2004; 4: 1729-1730.

Hariharan S, Kasiske B, Matas A et al. Surrogate markers for long-term renal allograft survival. *Am J Transplant* 2004; 4: 1179-1183.

Heinold A, Opelz G, Scherer S et al. Role of minor histocompatibility antigens in renal transplantation. *Am J Transplant* 2008; 8: 95-102.

Herold, G., *Innere Medizin*, 2007, Gerd Herold, Köln.

Hick, C., Hick A., *Kurzlehrbuch Physiologie*, 3. Auflage, 2000, Urban & Fischer.

Hidalgo LG, Einecke G, Allanach K et al. The transcriptome of human cytotoxic T cells: similarities and disparities among allostimulated CD4(+) CTL, CD8(+) CTL and NK cells. *Am J Transplant* 2008; 8: 627-636.

Hricik DE, Schulak JA. Steroid withdrawal from Ciclosporine-based regimens: con—a flawed strategy. *Transplant Proc* 1998; 30: 1785-1787.

Humar A, Gillingham KJ, Payne WD et al. Association between cytomegalovirus disease and chronic rejection in kidney transplant recipients. *Transplantation* 1999; 68: 1879-1883.

Humar A, Kerr S, Matas AJ et al. Features of acute rejection that increase risk for chronic rejection. *Transplantation* 1999; 68: 1200-1203.

Humar A, Kerr S, Hassoun A et al. The association between acute rejection and chronic rejection in kidney transplantation. *Transplant Proc* 1999; 31: 1302-1303.

Hutchinson P, Divola LA, Holdsworth SR. Mitogen-induced T-cell CD69 expression is a less sensitive measure of T-cell function than [(3)H]-thymidine uptake. *Cytometry* 1999; 38: 244-249.

Janeway CA, Travers P, *Immunologie*, 2. Auflage, 1997, Spektrum Akademischer Verlag GmbH.

Jiyad, Z, Olsen, CM, Burke, MT et al. Azathioprine and Risk of Skin Cancer in Organ Transplant Recipients: Systematic Review and Meta-Analysis. *American Journal of transplantation* 2016; 16: 3490–3503.

Joosten SA, Sijpkens YW, van Kooten C et al. Chronic renal allograft rejection: Pathophysiologic considerations. *Kidney Int* 2005; 68: 1-13.

Kamar N, Garrigue V, Karras A et al. Impact of early or delayed Ciclosporine on delayed graft function in renal transplant recipients: a randomized, multicenter study. *Am J Transplant* 2006; 6: 1042-1048.

Kandaswamy R, Melancon JK, Dunn T et al. A prospective randomized trial of steroid-free maintenance regimens in kidney transplant recipients--an interim analysis. *Am J Transplant* 2005; 5: 1529-1536.

Karow T, Lang R Allgemeine und spezielle Pharmakologie und Toxikologie, 23. Auflage, 2015, Thomas Karow (Verlag)

Kasiske BL, Gaston RS, Gourishankar S et al. Long-term deterioration of kidney allograft function. *Am J Transplant* 2005; 5: 1405-1414.

Kerman RH, Susskind B, Kerman DH et al. Anti-HLA antibodies detected in posttransplant renal allograft recipient sera correlate with chronic rejection. *Transplant Proc* 1997; 29: 1515-1516.

Kim MJ, Tsinalis D, Franz S et al. ATG-Fresenius or daclizumab induction therapy in immunologically high risk kidney recipients: a prospective randomized pilot trial. *Ann Transplant*. 2008; 13: 21-27.

Kobayashi T, Yokoyama I, Hayashi S et al. Genetic polymorphism in the IL-10 promoter region in renal transplantation. *Transplant Proc*. 1999; 31: 755-756.

Kramer MD, Immunologie und Immunpathologie, 1997, Ferdinand Enke Verlag

Kücükköylü S et al. Nierentransplantation bei hochimmunisierten Patienten. *Transplantationsmedizin* 2010; 22: 301-307.

Kuhlmann U, Walb D, Nephrologie Pathophysiologie – Klinik – Praxis, 2. Auflage, 1994, Georg Thieme Verlag.

Larsen CP, Knechtle SJ, Adams A et al. A new look at blockade of T-cell costimulation: a therapeutic strategy for long-term maintenance immunosuppression. *Am J Transplant* 2006; 6: 876-883.

Lauzurica R, Pastor MC, Bayes B et al. Subclinical inflammation in renal transplant recipients: impact of Ciclosporine microemulsion versus tacrolimus. *Transplant Proc* 2007; 39: 2170-2172.

Legris T, Picard C, Todorova D et al. Antibody-Dependent nK cell activation is associated with late Kidney allograft Dysfunction and the complement-independent alloreactive Potential of Donor-specific antibodies. *Frontiers in Immunology* 2016; 7: 1-16.

Lindner S. Funktion und pathophysiologische Bedeutung Granzym B-exprimierender regulatorischer B-Zellen. 2015 Open Access Repository der Universität Ulm. Dissertation. <http://dx.doi.org/10.18725/OPARU-3646>.

Liu Y, Zhou P, Han M et al. Basiliximab or antithymocyte globulin for induction therapy in kidney transplantation: a meta-analysis. *Transplant Proc* 2010; 42: 1667-1670.

Lisik W, Schoenberg L, Lasky RE et al. Statins benefit outcomes of renal transplant recipients on a sirolimus-Ciclosporine regimen. *Transplant Proc* 2007; 39: 3086-3092.

Löffler, G. Basiswissen Biochemie mit Pathobiochemie, 4. Auflage, 2001, Springer-Verlag.

Loupy A, Haas M, Solez K et al. The Banff 2015 Kidney Meeting Report: Current Challenges in Rejection Classification and Prospects for Adopting Molecular Pathology. *Am J Transplant* 2017; 17: 28–41.

Macatonia SE, Doherty TM, Knight SC et al. Differential effect of IL-10 on dendritic cell-induced T cell proliferation and IFN-gamma production. *J Immunol* 1993; 150: 3755-3765.

Mardiney M 3rd, Brown MR, Fleisher TA. Measurement of T-cell CD69 expression: a rapid and efficient means to assess mitogen- or antigen-induced proliferative capacity in normals. *Cytometry*. 1996; 26: 305-310.

Margreiter R, Fuchs D, Hausen A et al. Neopterin as a new biochemical marker for diagnosis of allograft rejection. *Transplantation* 1983; 36: 650-653.

Martins L, Fonseca I, Sousa S et al. The influence of HLA mismatches and immunosuppression on kidney graft survival: an analysis of more than 1300 patients. *Transplant Proc* 2007; 39: 2489-2493.

Mas VR, Mas LA, Archer KJ et al. Evaluation of gene panel mRNAs in urine samples of kidney transplant recipients as a non-invasive tool of graft function. *Mol Med* 2007; 13: 315-324.

Matas AJ. Chronic rejection in renal transplant recipients-risk factors and correlates. *Clin Transplant* 1994; 8: 332-335.

Matas AJ, Sutherland DE, Najarian JS. The impact of HLA matching on graft survival. *Transplantation* 1992; 54: 568-569.

Matas AJ. Chronic rejection-definition and correlates. *Clin Transplant* 1994; 8: 162-167.

Matas AJ, Burke JF Jr., DeVault GA et al. Chronic rejection. *J Am Soc Nephrol* 1994; 4: 23-29.

Matas AJ. Acute rejection is a major risk factor for chronic rejection. *Transplant Proc* 1998; 30: 1766-1768.

Meier-Kriesche HU, Arndorfer JA, Kaplan B. Association of antibody induction with short- and long-term cause-specific mortality in renal transplant recipients. *J Am Soc Nephrol*. 2002; 13: 769-772.

Meier-Kriesche HU, Steffen BJ, Hochberg AM et al. Long-term use of mycophenolate mofetil is associated with a reduction in the incidence and risk of late rejection. *Am J Transplant* 2003; 3: 68-73.

Meier-Kriesche HU, Schold JD, Srinivas TR et al. Lack of improvement in renal allograft survival despite a marked decrease in acute rejection rates over the most recent era. *Am J Transplant* 2004; 4: 378-383.

Meier-Kriesche HU, Li S, Gruessner RW et al. Immunosuppression: evolution in practice and trends 1994-2004. *Am J Transplant* 2006; 6: 1111-1131.

Meier-Kriesche HU, Hricik DE. Are we ready to give up on calcineurin inhibitors? *Am J Transplant* 2006; 6: 445-446.

Meier-Kriesche HU, Magee JC, Kaplan B. Trials and tribulations of steroid withdrawal after kidney transplantation. *Am J Transplant* 2008; 8: 265-266.

Meier M, Nitschke M, Weidtmann B et al. Slowing the progression of chronic allograft nephropathy by conversion from Cyclosporine to Tacrolimus: a randomized controlled trial. *Transplantation* 2006; 81: 1035-1040.

Memikoglu KO, Keven K, Sengul S et al. Urinary tract infections following renal transplantation: a single-center experience. *Transplant Proc* 2007; 39: 3131-3134.

Mengel, M. Chronische Nierentransplantatschädigung Warum das CAN-Konzept verlassen werden muss. *Der Nephrologe* 2010; 4: 307-313.

Merville P, Pouteil-Noble C, Wijdenes J et al. Detection of single cells secreting IFN-gamma, IL-6, and IL-10 in irreversibly rejected human kidney allografts, and their modulation by IL-2 and IL-4. *Transplantation* 1993; 55: 639-649.

Merville P, Berge F, Deminiere C et al. Lower incidence of chronic allograft nephropathy at 1 year post-transplantation in patients treated with mycophenolate mofetil. *Am J Transplant* 2004; 4: 1769-1775.

Moffatt SD, Cockman M, Metcalfe SM. STAT6 upregulation by FK506 in the presence of interleukin-4. *Transplantation* 2000; 69: 1521-1523.

Moore KW, de Waal Malefyt R, Coffman RL et al. Interleukin-10 and the interleukin-10 receptor. *Annu Rev Immunol* 2001; 19: 683-765.

Morath, C, Zeier, M, Sommerer, C. Immunsuppression nach Nierentransplantation. *Der Nephrologe* 2010; 5: 108-117.

Morath C, Beimler J, Opelz G et al. An integrative approach for the transplantation of high-risk sensitized patients. *Transplantation* 2010; 90: 645-653.

Moreso F, Ibernón M, Goma M et al. Subclinical rejection associated with chronic allograft nephropathy in protocol biopsies as a risk factor for late graft loss. *Am J Transplant* 2006; 6: 747-752.

Müller TF, Grebe SO, Neumann MC et al. Persistent long-term changes in lymphocyte subsets induced by polyclonal antibodies. *Transplantation*. 1997; 64: 1432-1437.

Nadeau K, Azuma H, Chandraker A et al. Inhibition of CD28-B7 T-cell costimulatory activation pathway affects intragraft cytokine and growth factor expression in chronic renal allograft rejection. *Transplant Proc* 1997; 29: 1038-1038.

Nankivell BJ, Borrows RJ, Fung CL et al. The natural history of chronic allograft nephropathy. *N Engl J Med* 2003; 349: 2326-2333.

Nankivell BJ, Wavamunno MD, Borrows RJ et al. Mycophenolate mofetil is associated with altered expression of chronic renal transplant histology. *Am J Transplant* 2007; 7: 366-376.

Oberdisse E, Hackenthal E, Kuschinsky K.(Hrsg.), *Pharmakologie und Toxikologie*, 3. Auflage, 2002, Springer Verlag.

Ojo AO, Meier-Kriesche HU, Hanson JA et al. Mycophenolate mofetil reduces late renal allograft loss independent of acute rejection. *Transplantation* 2000; 69: 2405-2409.

Opelz G, Wujciak T, Ritz E. for the COLLABORATIVE TRANSPLANT STUDY Association of chronic kidney graft failure with recipient blood pressure. *Kidney International* 1998; 53: 217–222.

Opelz G, Naujokat C, Daniel V et al. Disassociation between risk of graft loss and risk of non-Hodgkin lymphoma with induction agents in renal transplant recipients. *Transplantation* 2006; 81: 1227-33.

Ponticelli C. Can mTOR inhibitors reduce the risk of late kidney allograft failure? *Transpl Int* 2008; 21: 2-10.

Posselt AM, Vincenti F, Bedolli M. CD69 expression on peripheral CD8 T cells correlates with acute rejection in renal transplant recipients. *Transplantation* 2003; 76: 190-195.

Pschyrembel, Klinisches Wörterbuch, 258. Auflage, 1998, Verlag de Gruyter.

Racusen LC, Solez K, Colvin RB et al. The Banff 97 working classification of renal allograft pathology. *Kidney Int* 1999; 55: 713-723.

Racusen LC, Solez K, Colvin RB. Fibrosis and atrophy in the renal allograft: interim report and new directions. *Am J Transplant* 2002; 2: 203-206.

Racusen LC, Halloran PF, Solez K. Banff 2003 meeting report: new diagnostic insights and standards. *Am J Transplant* 2004; 4: 1562-1566.

Ramezani M, Einollahi B, Ahmadzad-Asl M et al. Hyperlipidemia after renal transplantation and its relation to graft and patient survival. *Transplant Proc* 2007; 39: 1044-1047.

Raphael I, Nalawade S, Eagar TN et al. T cell subsets and their signature cytokines in autoimmune and inflammatory diseases. *Cytokine* 2015; 74: 5–17.

Risler, T, Müller GA, Rosendahl W (Hrsg.). *Therapieschemata Nephrologie*, 2. Auflage, 1997, Verlag Urban & Fischer

Robbins HA, Clarke CA, Arron ST. Melanoma Risk and Survival among Organ Transplant Recipients. *J Invest Dermatol* 2015; 135: 2657-2665.

Roitts, I, Brostoff, J, Male D. *Kurzes Lehrbuch der Immunologie*, 3. Auflage, 1995, Georg Thieme Verlag.

Rostaing L, Puyoo O, Tkaczuk J et al. Differences in Type 1 and Type 2 intracytoplasmic cytokines, detected by flow cytometry, according to immunosuppression (Ciclosporin)

rine A vs. tacrolimus) in stable renal allograft recipients. *Clin Transplant* 1999; 13: 400-409.

Sayegh MH, Turka LA. The role of T-cell costimulatory activation pathways in transplant rejection. *N Engl J Med* 1998; 338: 1813-1821.

Sewgobind VD, Kho MM, van der Laan LJ et al. The effect of rabbit anti-thymocyte globulin induction therapy on regulatory T-cells in kidney transplant patients. *Nephrol Dial Transplant* 2009; 24: 1635-1644.

Setoguchi K, Ishida H, Shimmura H et al. Analysis of renal transplant protocol biopsies in ABO-incompatible kidney transplantation. *Am J Transplant* 2008; 8: 86-94.

Sheashaa HA, Hamdy AF, Bakr MA et al. Long-term evaluation of single bolus high dose ATG induction therapy for prophylaxis of rejection in live donor kidney transplantation. *Int Urol Nephrol* 2008; 40: 515-520.

Shiu KY, McLaughlin L, Rebollo-Mesa I. B-lymphocytes support and regulate indirect T-cell alloreactivity in individual patients with chronic antibody-mediated rejection. *Kidney Int* 2015; 88: 560-568.

Solez K, Colvin RB, Racusen LC et al. Banff 2005 Meeting Report: differential diagnosis of chronic allograft injury and elimination of chronic allograft nephropathy(CAN). *Am J Transplant* 2007; 7: 518-526.

Solez K, Colvin RB, Racusen LC et al. Banff 2007 classification of renal allograft pathology: updates and future directions. *Am J Transplant* 2008; 8: 753-760.

Süsal, C, Wiesel M, Schönemann C et al. Presensitization and HLA Match influence the predictive power of pretransplant serum IgA and IgA-Anti-Fab autoantibodies in kidney graft recipients. *Transplantation Proceedings* 1997; 29: 1444-1446.

Süsal C, Döhler B, Opelz G. Graft-protective role of high pretransplantation IgA-anti-Fab autoantibodies: confirmatory evidence obtained in more than 4000 kidney transplants. The Collaborative Transplant Study. *Transplantation*. 2000; 69: 1337-1340.

Süsal C, Pelzl S, Döhler B et al. Identification of highly responsive kidney transplant recipients using pre transplant soluble CD30. *J Am Soc Nephrol* 2002; 13: 1650-1656.

Süsal C, Döhler B, Sadeghi M et al. Posttransplant sCD30 as a predictor of kidney graft outcome. *Transplantation*. 2011; 91: 1364-1369.

Tang Q, Leung J, Melli K et al. Altered balance between effector T cells and FOXP3+ Helios+ regulatory T cells after thymoglobulin induction in kidney transplant recipients. *Transpl Int* 2012; 25: 1257-1267.

Tanriover B, Zhang S, MacConmara M et al. Induction Therapies in Live Donor Kidney Transplantation on Tacrolimus and Mycophenolate With or Without Steroid Maintenance. *Clin J Am Soc Nephrol* 2015; 10: 1041-1049.

Le Texier L, Thebault P, Lavault A et al. Long-term allograft tolerance is characterized by the accumulation of B cells exhibiting an inhibited profile. *Am J Transplant*. 2011; 11: 429-438.

Tian JH, Wang X, Yang KH et al. Induction with or without antithymocyte globulin combined with cyclosporine/tacrolimus-based immunosuppression in renal transplantation: a meta-analysis of randomized controlled trials. *Transplantation Proceedings* 2009; 41: 3671-3676.

Thibaudin D, Alamartine E, Filippis JP et al. Advantage of antithymocyte globulin induction in sensitized kidney recipients: a randomized prospective study comparing induction with and without antithymocyte globulin. *Nephrol Dial Transplant*. 1998; 13: 711-715.

Thibaudin D, Alamartine E, Mariat C et al. Long-term kinetic of T-lymphocyte subsets in kidney-transplant recipients: influence of anti-T-cell antibodies and association with posttransplant malignancies. *Transplantation*. 2005; 80: 1514-1517.

Vamvakopoulos JE, Taylor CJ, Green C et al. Interleukin 1 and chronic rejection: possible genetic links in human heart allografts. *Am J Transplant* 2002; 2: 76-83.

Vassalotti JA, Centor R, Turner BJ et al. National Kidney Foundation Kidney Disease Outcomes Quality Initiative. Practical Approach to Detection and Management of Chronic Kidney Disease for the Primary Care Clinician. *Am J Med* 2016; 129: 153-162.

Vincenti F, Monaco A, Grinyo J et al. Multicenter randomized prospective trial of steroid withdrawal in renal transplant recipients receiving basiliximab, Ciclosporine microemulsion and mycophenolate mofetil. *Am J Transplant* 2003; 3: 306-311.

Vincenti F, Ghiggeri GM. New insights into the pathogenesis and the therapy of recurrent focal glomerulosclerosis. *Am J Transplant* 2005; 5: 1179-1185.

Walter MR The Molecular Basis of IL-10 Function: From Receptor Structure to the Onset of Signaling. *Curr Top Microbiol Immunol* 2014; 380: 191–212.

Webster AC, Woodroffe RC, Taylor RS et al. Tacrolimus versus Ciclosporin as primary immunosuppression for kidney transplant recipients: meta-analysis and meta-regression of randomised trial data. *BMJ* 2005; 331: 810.

Weimer R, Schweighoffer T, Schimpf K et al. Helper and suppressor T-cell function in HIV-infected hemophilia patients. *Blood* 1989; 74: 298-302.

Weimer R, Pomer S, Staehler G et al. Increased T-suppressor activity in renal transplant recipients with long-term stable graft function. *Clin Transplantation* 1990; 4: 280-286.

Weimer R, Daniel V, Zimmermann R et al. Autoantibodies against CD4 cells are associated with CD4 helper defects in human immunodeficiency virus-infected patients. *Blood* 1991; 77: 133-140.

Weimer R, Zipperle S, Daniel V et al. IL-6 independent monocyte/B cell defect in renal transplant recipients with long-term stable graft function. *Transplantation* 1994; 57: 54-59.

Weimer R, Zipperle S, Daniel V et al. Pretransplant CD4 helper function and interleukin 10 response predict risk of acute kidney graft rejection. *Transplantation*. 1996; 62: 1606-1614.

Weimer R, Zipperle S, Daniel V et al. Superior 3-year kidney graft function in patients with impaired pretransplant Th2 responses. *Transpl Int* 1998; 11: 350-356.

Weimer R, Melk A, Daniel V et al. Switch from Cyclosporine A to Tacrolimus in renal transplant recipients: impact on Th1, Th2, and monokine responses. *Hum Immunol* 2000; 61: 884-897.

Weimer R, Streller S, Staak A et al. Effects of three immunosuppressive regimens on CD4 helper function, B cell monocyte and cytokine responses in renal transplant recipients: 4-month follow-up of a prospective randomized study. *Transplant Proc* 2002; 34: 2377-2378.

Weimer R, Mytilineos J, Feustel A et al. Mycophenolate mofetil-based immunosuppression and cytokine genotypes: effects on monokine secretion and antigen presentation in long-term renal transplant recipients. *Transplantation* 2003; 75: 2090-2099.

Weimer R, Süsal C, Yildiz S et al. sCD30 and neopterin as risk factors of chronic renal transplant rejection: impact of Cyclosporine A, tacrolimus, and mycophenolate mofetil. *Transplant Proc* 2005; 37: 1776-1778.

Weimer R, Staak A, Süsal C et al. ATG induction therapy: long-term effects on Th1 but not on Th2 responses. *Transpl Int* 2005; 18: 226-236.

Weimer R, Süsal C, Yildiz S et al. Post-transplant sCD30 and neopterin as predictors of chronic allograft nephropathy: impact of different immunosuppressive regimens. *Am J Transplant* 2006; 6: 1865-1874.

Weimer R, Deisz S, Dietrich H. et al. Impact of maintenance immunosuppressive regimens – balance between graft protective suppression of immune functions and a near physiological immune response. *Transplant International* 2011; 24: 596-609.

Weimer R, Etrich M, Renner R et al. ATG-induction in renal transplant recipients: Long-term hazard of severe infection is associated with long-term functional T cell impairment but not the ATG-induced CD4 cell decline. *Hum Immunol.* 2014; 75: 561-569.

Wiecek A, Nowicki M, Kokot F et al. Acute failure of the transplanted kidney-pathophysiology, diagnosis and prevention. *Ann Transplant* 1996; 1: 5-9.

Wieczorek G, Bigaud M, Menninger K et al. Acute and chronic vascular rejection in nonhuman primate kidney transplantation. *Am J Transplant* 2006; 6: 1285-1296.

Wilkinson A. Protocol transplant biopsies: are they really needed? *Clin J Am Soc Nephrol* 2006; 1: 130-137.

Woo YM, Jardine AG, Clark AF et al. Early graft function and patient survival following cadaveric renal transplantation. *Kidney Int* 1999; 55: 692-699.

Wood KJ, Goto R. Mechanisms of rejection: current perspectives. *Transplantation* 2012; 93: 1-10.

Yilmaz S, Tomlanovich S, Mathew T et al. Protocol Core Needle Biopsy and Histologic Chronic Allograft Damage Index (CADI) as Surrogate End Point for Long-Term Graft Survival in Multicenter Studies. *J Am Soc Nephrol* 2003; 14: 773–779.

Yussim A, Shapira Z. Single-bolus high dose ATG for prophylaxis of rejection in renal transplantation - a prospective, randomized study. *Transpl Int* 2000; 13: 293-294.

9. Publikationen

Weimer R, Ettrich M, Renner R, Dietrich H, Süsal C, Deisz S, Padberg W, Opelz G. ATG-induction in renal transplant recipients: Long-term hazard of severe infection is associated with long-term functional T cell impairment but not the ATG-induced CD4 cell decline. Hum Immunol. 2014;75:561-569

Poster:

Ettrich M, Renner F, Dietrich H, Deisz S, Daniel V, Kamali-Ernst S, Ernst W, Padberg W, Opelz G und Weimer R: Long-term effects of ATG-induction associated with an increased risk of infection. 20. Kongress der Deutschen Transplantationsgesellschaft, Regensburg 6.-8.10.2011

10. Ehrenwörtliche Erklärung

„Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig und ohne unzulässige Hilfe oder Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe. Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten oder nichtveröffentlichten Schriften entnommen sind, und alle Angaben, die auf mündlichen Auskünften beruhen, sind als solche kenntlich gemacht. Bei den von mir durchgeführten und in der Dissertation erwähnten Untersuchungen habe ich die Grundsätze guter wissenschaftlicher Praxis, wie sie in der „Satzung der Justus-Liebig-Universität Gießen zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis“ niedergelegt sind, eingehalten sowie ethische, datenschutzrechtliche und tierschutzrechtliche Grundsätze befolgt. Ich versichere, dass Dritte von mir weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen für Arbeiten erhalten haben, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen, oder habe diese nachstehend spezifiziert.

Die vorgelegte Arbeit wurde weder im Inland noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde zum Zweck einer Promotion oder eines anderen Prüfungsverfahrens vorgelegt. Alles aus anderen Quellen und von anderen Personen übernommene Material, das in der Arbeit verwendet wurde oder auf das direkt Bezug genommen wird, wurde als solches kenntlich gemacht. Insbesondere wurden alle Personen genannt, die direkt und indirekt an der Entstehung der vorliegenden Arbeit beteiligt waren. Mit der Überprüfung meiner Arbeit durch eine Plagiatserkennungssoftware bzw. ein internetbasiertes Softwareprogramm erkläre ich mich einverstanden.“

Ort, Datum

Unterschrift

11. Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Herrn Professor Dr. Weimer für die Überlassung dieses interessanten Promotionsthemas, seine Unterstützung und kritischen Anregungen sowie Geduld bei der Fertigstellung dieser Arbeit.

Weiterhin bedanke ich mich bei Herrn Hartmut Dietrich für seine kompetente Unterstützung, Hilfsbereitschaft und konstruktiven Anmerkungen während der experimentellen Phase dieser Arbeit.

Ich bedanke mich bei Frau Juliane Sobania für ihre Unterstützung und Hilfsbereitschaft.

Für stetige und unermüdliche Unterstützung gebührt meiner Familie mein ganz besonderer Dank.