

Kreatinin-Clearance (in ml/min)								
	Gruppe I/1 (~20 min Ischämie)				Gruppe I/2 (6 h Ischämie)			
Zeit nach NTx (Monate)	0,50	1	2	3	0,50	1	2	3
Mittelwert	0,72	0,86	0,66	1,20	0,88	1,34	1,70	1,76
Standardabweichung	0,34	0,43	0,48	0,24	0,42	0,39	0,54	0,60
Standardfehler	0,11	0,14	0,20	0,14	0,16	0,15	0,20	0,23

Tabelle 6. Mittelwerte mit Standardabweichungen und –fehlern für die Kreatinin-Clearance der Gruppen von Stufe I; angegeben für die Messzeitpunkte 0, 5, 1, 2 und 3 Monate nach NTx.

4.5. Histomorphologie

4.5.1. Transplantatmorphologie in Stufe I

Die morphologischen Veränderungen der Transplantate in Stufe I korrelierten mit den Funktionsparametern im Sinne einer chronischen Transplantatschädigung.

Zur Beurteilung der Pathomorphologie wurden die Kriterien der Banff-Klassifikation von 1997 herangezogen: Auf einer semi-quantitativen Skala von „0“ bis „4“ wurde der Grad interstitieller Fibrose, Arteriosklerose, tubulärer Atrophie und zellulärer Infiltration bewertet. „0“ entspricht dem Bild morphologisch intakter Nieren (Abbildung 13), „4“ bezeichnet schwere pathologische Veränderungen bis hin zur Unkenntlichkeit (Abbildung 14).

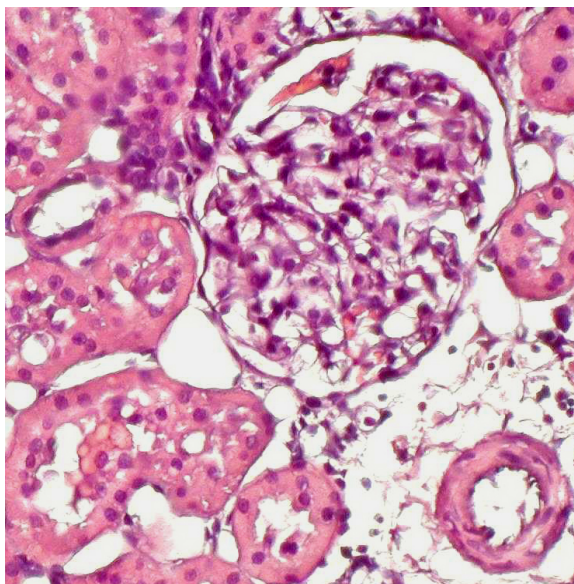


Abbildung 13. Normalbefund mit Färbeartefakten (Fettauslösung): Unauffälliges Glomerulum, schlanke Bowman-Kapsel und vollständig erhaltene Tubuli. Rechts unten: Arteriole umgeben von Bindegewebe. (H&E-Färbung, Vergr. 400-fach).

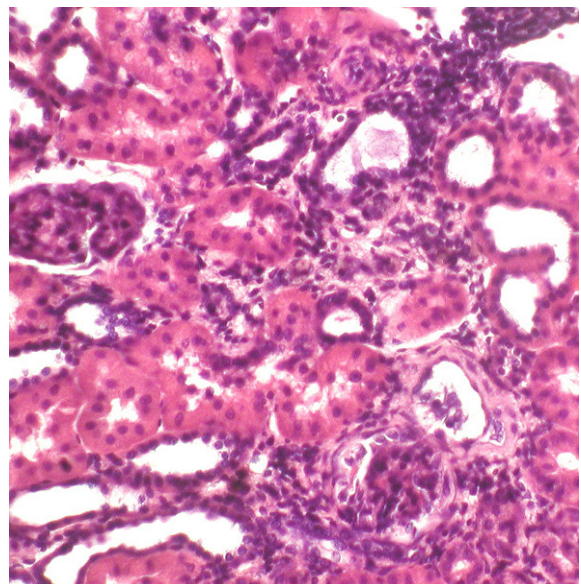


Abbildung 14. Befund chronischer Transplantatschädigung: Struktur des Glomerulum (rechts unten) aufgehoben, fibrotischer Parenchyumbau, massive Zellinfiltration. (H&E-Färbung, Vergr. 400-fach).

4.5.1.1. Tubuläre Atrophie

Beide Gruppen der Stufe I wiesen zum Ende der Beobachtungszeit insgesamt nur mäßige tubuläre Atrophie auf (Mittelwert±Standardfehler): 1,67±0,17 (Gruppe I/1) vs. 1,17±0,11 (Gruppe I/2).

Wie die Funktionsparametern erwarten ließen, fanden sich bei Transplantaten der Gruppe I/2 (6 h Ischämie) signifikant geringere Schädigungsgrade gegenüber den Organen aus der Gruppe kurzer Ischämie ($p=0,0331$). Ein graphischer Vergleich ist Abbildung 15 zu entnehmen. Statistische Angaben finden sich in Tabelle 7.

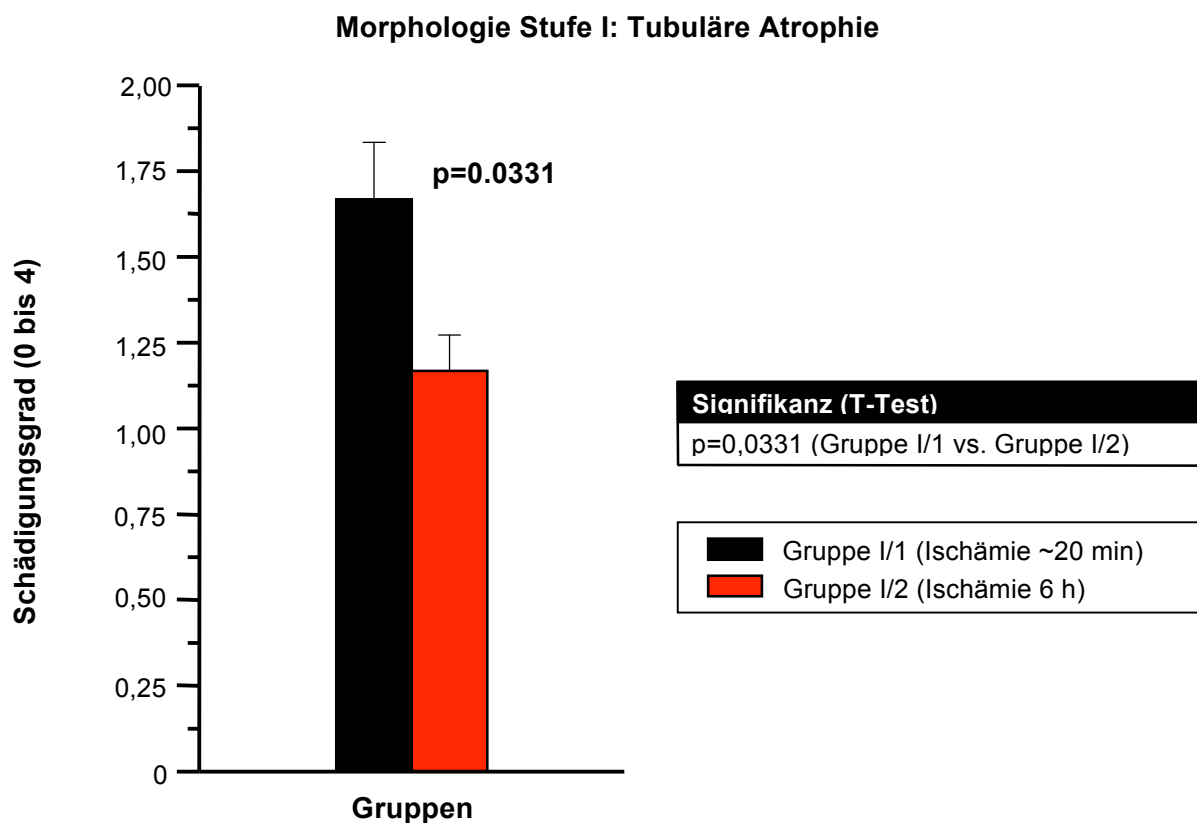


Abbildung 15. Diagramm der tubulären Atrophiegrade der Transplantate von Stufe I nach 100 Tagen; Signifikanz der Unterschiede zw. den Gruppen ermittelt mit Students-T-Test.

Morphologie Stufe I: Tubuläre Atrophie				
Gruppe	Mittelwert	SA	SF	n
I/1	1,67	0,29	0,17	3
I/2	1,17	0,26	0,11	7

Tabelle 7. Tubuläre Atrophie bei Transplantaten von Stufe I. Mittelwerte mit Standardabweichungen (SA), –fehlern (SF) und Tierzahl (n).

4.5.1.2. Arteriosklerose, Fibrose und zelluläre Infiltrate

Die arteriosklerotischen Veränderungen im Rahmen der chronischen Abstoßung wurden in Analogie zur etablierten Banff-Klassifikation anhand folgender Kriterien bewertet: fibröse Intimaverdickung und konzentrische Verengung des Gefäßlumens. Beide Gruppen wiesen in diesem Sinne nur mittelgradige atherosklerotische Schädigung auf (Mittelwert±Standardfehler): 1,85±0,28 (Gruppe I/1) vs. 1,83±0,29 (Gruppe I/2). Ein signifikanter Unterschied wurde nicht festgestellt.

Auch fanden sich in beiden Versuchsgruppen nur moderate Fibrosierungsgrade, die nicht signifikant divergierten (Mittelwert±Standardfehler): 1,67±0,44 (Gruppe I/1) vs. 1,29±0,34 (Gruppe I/2).

Die zelluläre Infiltration der Transplantate war in beiden Gruppen ebenfalls nur moderat. In Gruppe I/1 war sie tendenziell höher (Mittelwert±Standardfehler): 2,00±0,52 vs. 1,58±0,27. Ein signifikanter Unterschied bestand nicht.

Alle Einzelwerte der genannten Kriterien sind Tabelle 8 zu entnehmen.

Morphologie: Arteriosklerose, Fibrose und zell. Infiltrate (Stufe I)					
Kategorie	Gruppe	Mittelwert	SA	SF	n
Arteriosklerose	I/1	1,85	0,28	0,28	3
	I/2	1,83	0,72	0,29	7
Fibrose	I/1	1,67	0,76	0,44	3
	I/2	1,29	0,84	0,34	7
Zelluläre Infiltrate	I/1	2,00	0,90	0,52	3
	I/2	1,58	0,66	0,28	7

Tabelle 8. Ausprägungsgrade von Arteriosklerose, Fibrose und zellulärer Infiltration bei den Transplantaten der Stufe I. Mittelwerte mit Standardabweichungen und –fehlern für die einzelnen Unterkategorien.

4.5.1.3. Glomerulosklerose

Die Schwere glomerulosklerotischer Schädigung wurde als prozentuales Verhältnis von sklerosierten zu nicht-sklerosierten Glomeruli festgehalten. Hierzu wurden bei 400-facher Vergrößerung alle Glomeruli in den Kortexarealen ausgezählt. Kriterien der Sklerose waren: Eine Zunahme mesangialer Matrix, Rarifizierung der glomerulären Kapillarschlinge, Verdickung der Bowman-Kapsel und rundzellige Infiltrate.

Insgesamt zeigen beide Transplantatgruppen hohe Grad an Glomerulosklerose. In der Gruppe verlängerter Ischämie (I/2) war sie dabei vergleichsweise geringer (Mittel-

wert±Standardfehler): 43,19±2,21 (n=3) gegenüber 45,11±2,88 (n=7). Eine statistisch signifikante Korrelation von Ischämiezeit und Schädigungsausmaß konnte nicht gefunden werden.

Ein grafischer Vergleich ist untenstehender Abbildung 16, die statistischen Werte der Tabelle 9 zu entnehmen.

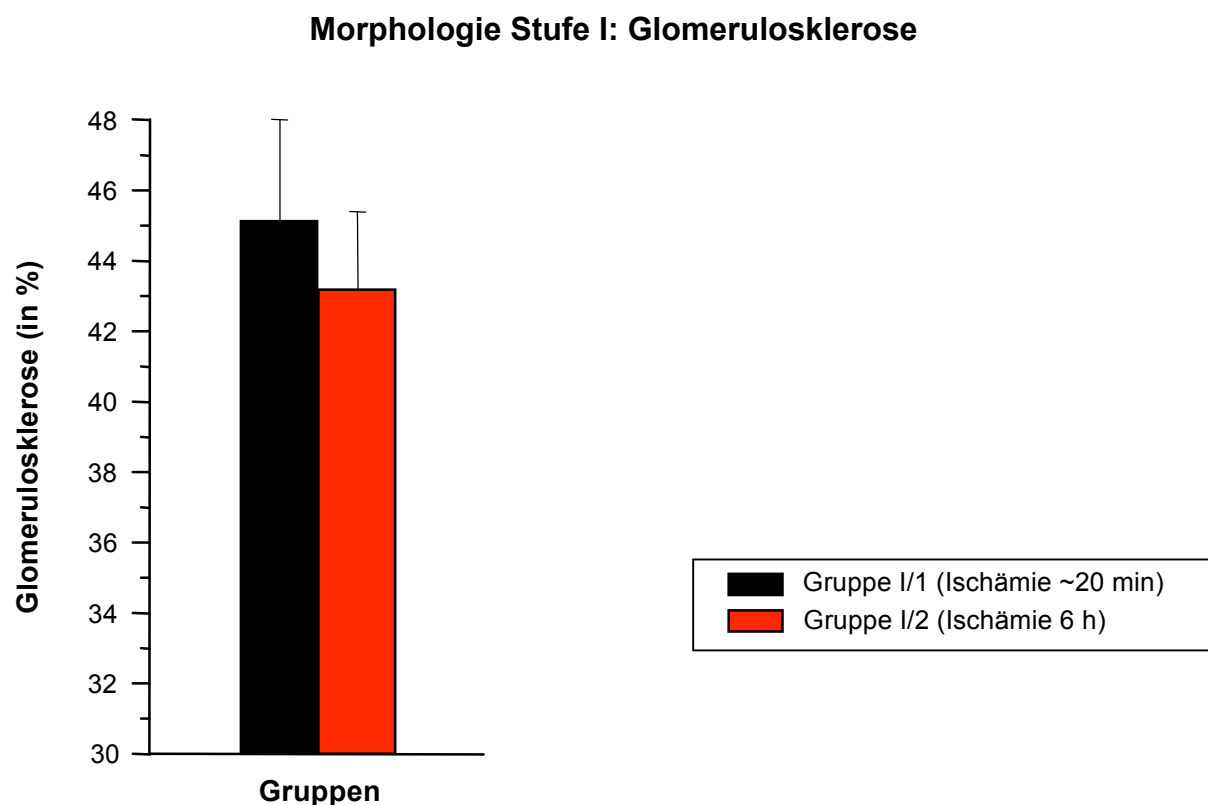


Abbildung 16. Diagramm der Glomerulosklerosegrade der Transplantate von Stufe I nach 100 Tagen. Tabellarisch angegeben: Signifikanz nach Students-T-Test, Mittelwerte, Standardabweichung (SA) und -fehler (SF).

Morphologie Stufe I: Glomerulosklerose				
Gruppe	Mittelwert	SA	SF	n
I/1	45,11	5,00	2,88	3
I/2	43,19	5,40	2,21	6

Tabelle 9. Glomerulosklerose der Transplantate von Stufe I. Mittelwerte mit Standardabweichungen (SA), -fehlern (SF) und Tierzahl (n).

4.5.2. Transplantatmorphologie in Stufe II

Die pathomorphologischen Veränderungen der Transplantate in Stufe II entsprachen den Schädigungsmustern akuter (bzw. hyperakuter Abstoßung). Beispielhaft hierfür sind Abbildung 17 und Abbildung 19. Das Beispiel eines Normalbefundes ist in obiger Abbildung 13 wiedergegeben.

Zur Bewertung wurden die Kriterien der Banff-Klassifikation für akute Transplantatschädigung analog angewendet. Dabei wurden drei morphologische Kategorien bewertet: Arteritis, interstitielle Entzündungszeichen und Tubulitis. Auf einer Skala von „0“ (keine) bis „3“ (schwere entzündliche Veränderung) wurden pro Kategorie bis zu drei Unterkategorien beurteilt. Insgesamt weisen die Transplantate der Stufe II einen einheitlich hohen Schädigungsgrad auf.

Signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen wurden in keiner der bewerteten Kategorien gefunden.

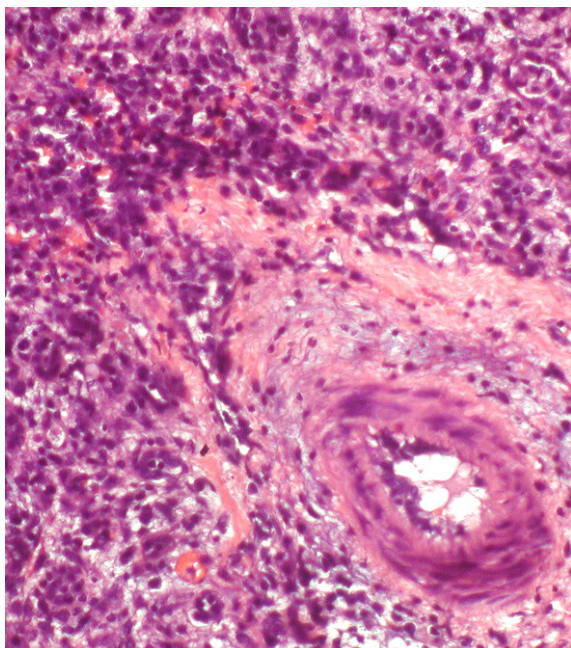


Abbildung 17. Befund akuter Abstoßung: Massive Leukozyteninfiltration mit beginnender Thrombosierung der Arteriole (rechts unten). Glomeruli und Tubuli sind nicht mehr erkennbar. (H&E-Färbung, Vergr. 400-fach).

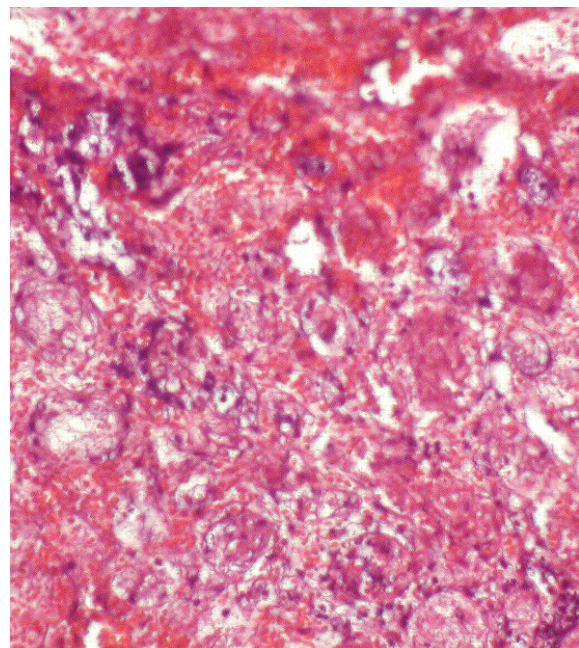


Abbildung 18: Schädigungsmuster hyperakuter Abstoßung: Neben ausgeprägten Zeichen akuter Abstoßung finden sich großflächig diffuse Einblutungen (vor allem oberer Bildteil) (Tier 23 der Gruppe II/2). (H&E-Färbung, Vergr. 400-fach).

4.5.2.1. Arteritis

Die Arteritis wurde auf einer relativen Skala von 1 bis 3 anhand folgender Kriterien eingestuft: subendotheliale Infiltration mononukleärer Zellen, fibrinoide Veränderungen, transmurale Infiltrate und Thrombosierungen.

Bei beiden Gruppen wurden Zeichen moderater bis schwere Arteritis gefunden (Mittelwert±Standardfehler): $1,82 \pm 0,19$ (Gruppe II/1) gegenüber $2,15 \pm 0,15$ (Gruppe II/2). Eine signifikante Differenz bestand nicht. Abbildung 19 zeigt einen grafischen Vergleich; die statistischen Werte sind Tabelle 10 zu entnehmen.

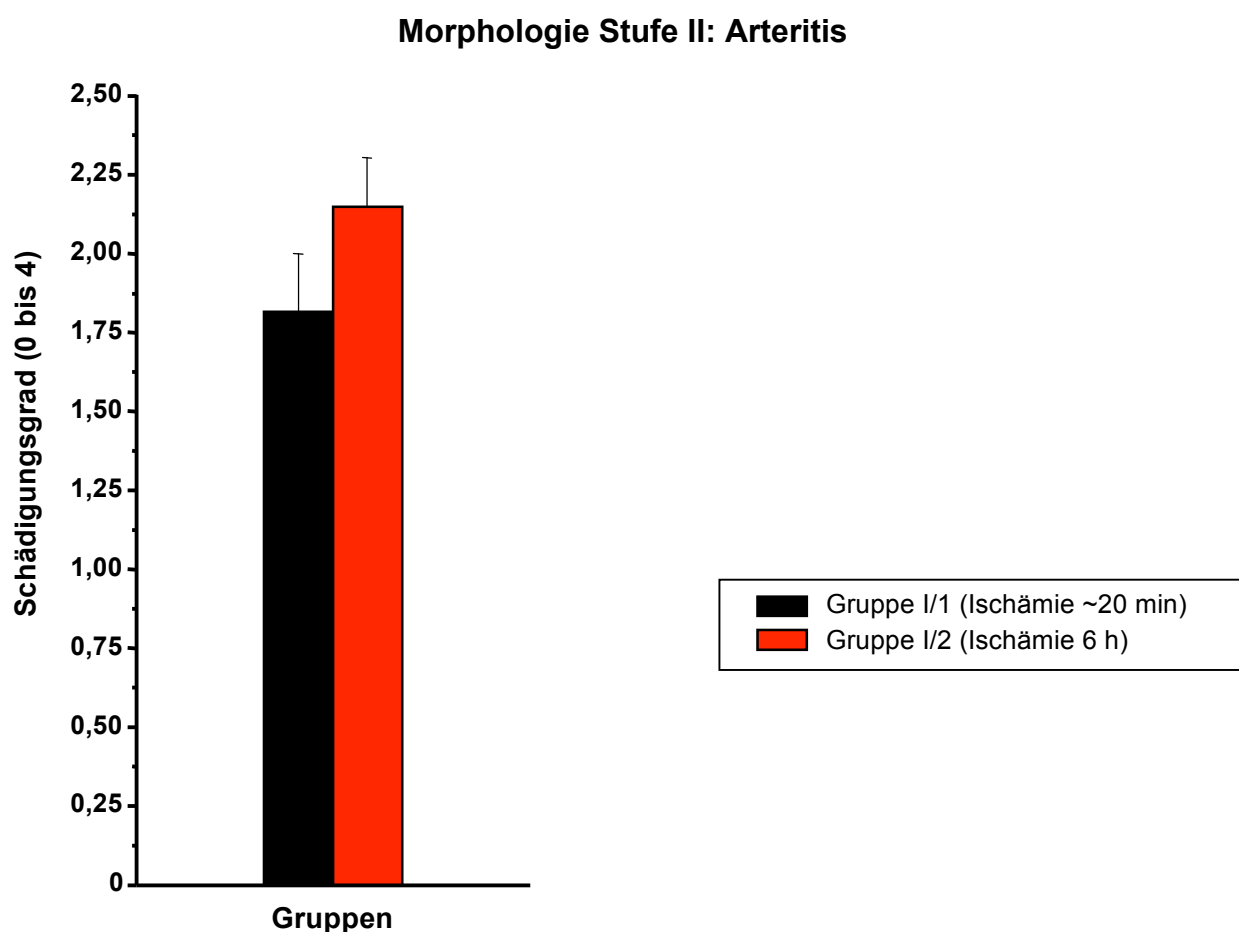


Abbildung 19. Diagramm der Arteritisgrade der Transplantate von Stufe II.

Morphologie Stufe II: Arteritis				
Gruppe	Mittelwert	SA	SF	n
II/1	1,82	0,26	0,19	2
II/2	2,15	0,41	0,15	7

Tabelle 10. Arteritis der Transplantate von Stufe II gem. der Banff-Skala von 0-3. Mittelwerte mit Standardabweichungen (SA), –Fehlern (SF) und Tierzahl (n).

4.5.2.2. Interstitielle Veränderungen

Die Beurteilung interstitiellen Entzündungsgeschehens erfolgte anhand dreier Unterkategorien: interstitielle Zellinfiltration, Hämorrhagie und fibrinoide Veränderungen.

In allen Kategorien wiesen die Gruppen tendenziell gleiche Schädigungsgrade auf. Signifikante Unterschiede fanden sich in keiner Kategorie. Ein grafischer Vergleich ist Abbildung 20 zu entnehmen. Statistische Werte finden sich in Tabelle 11.

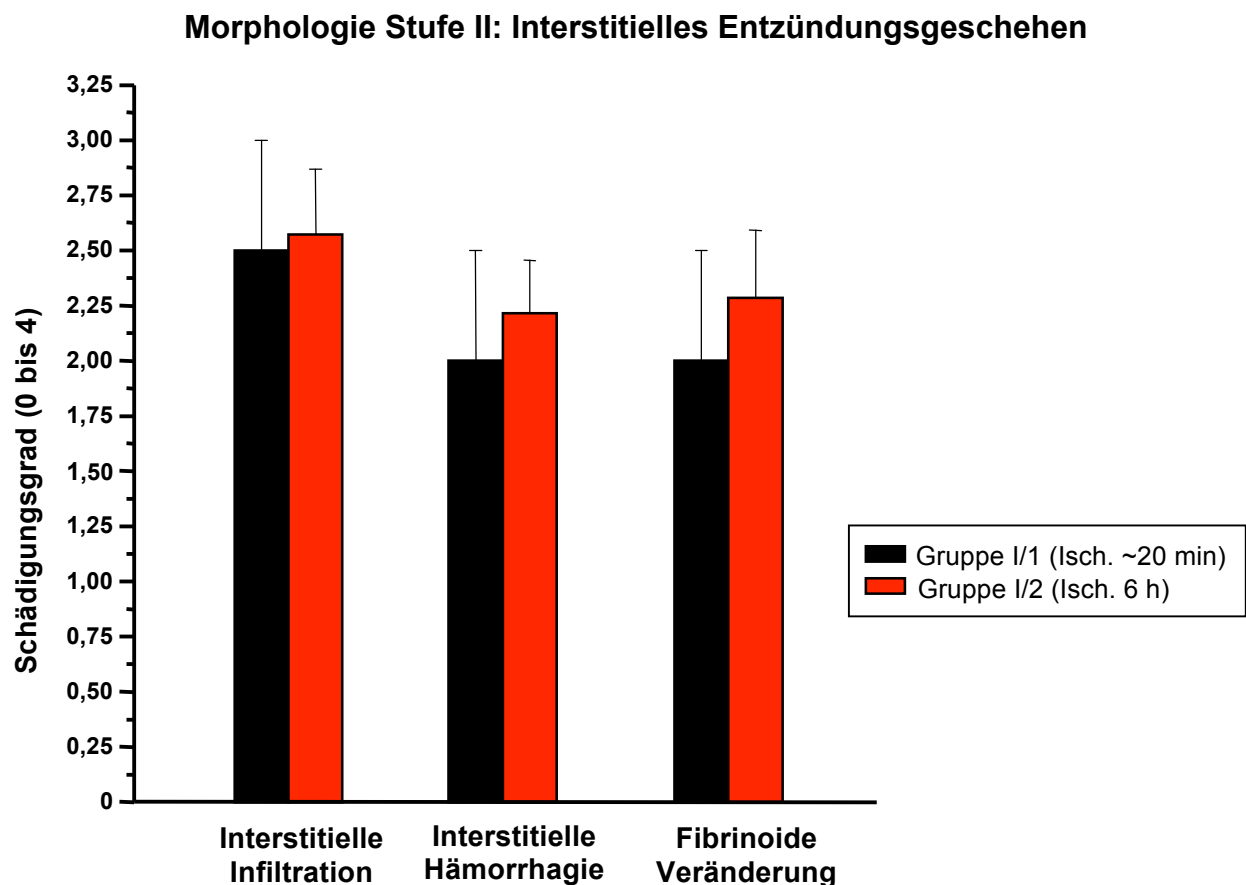


Abbildung 20. Kategorien interstitiellen Entzündungsgeschehens bei Transplantaten von Stufe II

Morphologie Stufe II: Interstitielles Entzündungsgeschehen					
Kategorie	Gruppe	Mittelwert	SA	SF	n
Interstitielle Infiltration	II/1	2,50	0,71	0,50	2
	II/2	2,75	0,79	0,30	7
Interstitielle Hämorrhagie	II/1	2,00	0,71	0,50	2
	II/2	2,21	0,64	0,24	7
Fibrinoide Veränderung	II/1	2,00	0,71	0,50	2
	II/2	2,29	0,81	0,31	7

Tabelle 11. Interstitielles Entzündungsgeschehen in den Transplantaten von Stufe II gem. der Banff-Skala von 0-3. Mittelwerte mit Standardabweichungen und –fehlern für die einzelnen Unterkategorien.

4.5.2.3. Tubulitis

Bei Beschreibung der Tubulitis werden nach Banff relative Scores in drei Kategorien vergeben: aktive tubuläre Inflammationszeichen, tubuläre Atrophie und *vanishing* Tubuli.

Die Gruppen der Stufe II wiesen ein tendenziell gleichstarkes Tubulitisgeschehen auf. Signifikante Unterschiede bestanden in keiner Kategorie. Ein grafischer Vergleich ist in Abbildung 21 zu finden. Werte und statistische Angaben finden sich in Tabelle 12.

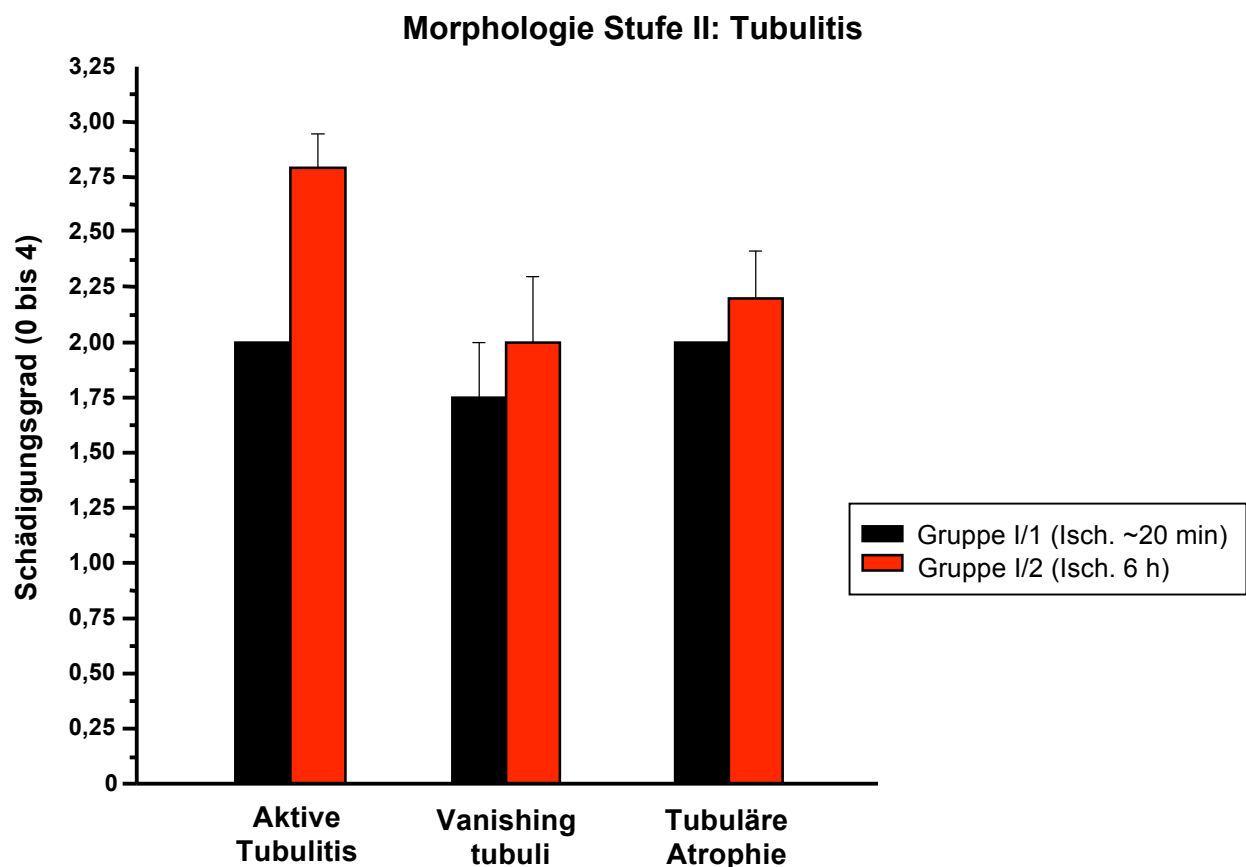


Abbildung 21. Diagramm der Tubulitisausprägungen bei Transplantaten von Stufe II.

Morphologie in Stufe II: Tubulitis					
Kategorie	Gruppe	Mittelwert	SA	SF	n
Aktive Tubulitis	II/1	2,00	0,00	0,00	2
	II/2	2,79	0,40	0,15	7
Tubuläre Atrophie	II/1	2,00	0,00	0,00	2
	II/2	2,20	0,75	0,22	7
Vanishing Tubuli	II/1	1,75	0,35	0,35	2
	II/2	2,00	0,79	0,30	7

Tabelle 12. Tubulitisgrade der Transplantate von Stufe II analog der Banff-Skala von 0-3. Mittelwerte mit Standardabweichungen (SA), –fehlern (SF) und Tierzahl (n).

4.6. Immunhistochemie

Zur Unterscheidung transplantatinfiltrierender Leukozyten wurden Nierenschnitte im APAAP-Verfahren immunhistochemisch gegen folgende Antigene gefärbt:

CD4	Antigen CD4+ T-Helferzellen
CD8	Antigen zytotoxischer T-Zellen
CD25	Antigen des IL-2-Rezeptors aktivierter T-Zellen, B-Zellen und Makrophagen
ED1	Antigen der Monozyten / Makrophagen
OX62	Antigen Dendritischer Zellen
OX3	Ia-Antigen (MHC-Klasse II) auf antigen-präsentierenden Zellen

Pro Organschnitt wurden 20 Gesichtsfelder bei 400-facher Vergrößerung ausgewertet. Die Auswertung erfolgte verblindet. Das Ergebnis wurde als arithmetischer Mittelwert der transplantatinfiltrierenden Zellen pro Blickfeld \pm Standardfehler dargestellt.

Die T-zellassozierten Antigene (CD4, CD8, CD25) der aus Transplantaten gewonnenen Leukozyten wiesen eine erhöhte Frequenz in beiden Gruppen der Stufe II gegenüber den Gruppen der Stufe I auf. Innerhalb der Stufen fanden sich hingegen keine Unterschiede zwischen den Gruppen. Nachfolgende Abbildung 22 gibt die Frequenzen im grafischen Vergleich der Gruppen und Stufen wieder. Die zugehörigen Einzelwerte und statistischen Angaben finden sich in Tabelle 13.

Auch die DC-assozierten (OX62), Makrophagen-assozierten (ED1) und die unspezifisch mit MHC-II-Zellen assoziierten (OX3) Antigene wiesen im Vergleich der Stufen deutlich erhöhte Frequenzen in Stufe II auf. Innerhalb der jeweiligen Stufen fanden sich auch hier keine Unterschiede zwischen den Gruppen. Nachfolgende Abbildung 23 gibt dies im grafischen Vergleich wieder. Die zugehörigen Einzelwerte und statistischen Angaben finden sich in Tabelle 14.

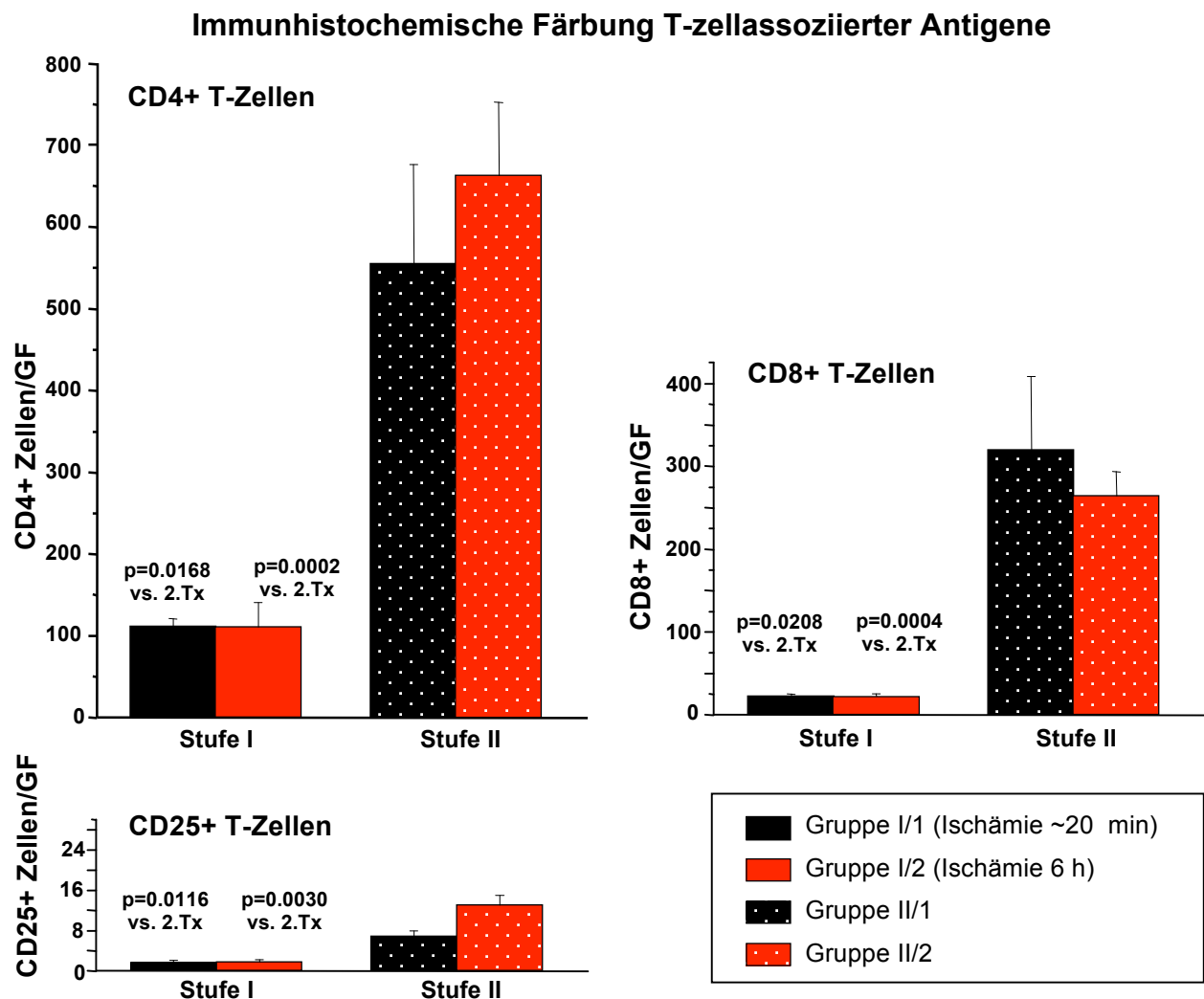


Abbildung 22. Diagramm der immunhistochemischen Färbung gegen T-zellassoziierte Antigene der Transplantate beider Stufen; GF=Gesichtsfeld.

Immunhistochemische Färbung T-zellassoziierter Antigene in Transplantaten beider Stufen					
Antigen	Gruppe	Mittelwert	SA	SF	n
CD4	I/1	111,73	15,96	9,22	3
	I/2	111,23	72,54	29,61	6
	II/1	555,17	172,30	121,83	2
	II/2	663,17	219,56	89,63	6
CD8	I/1	22,25	4,80	2,77	3
	I/2	21,99	7,82	3,19	6
	II/1	319,67	125,87	89,00	2
	II/2	264,40	72,09	29,43	6
CD25	I/1	1,65	0,69	0,40	3
	I/2	1,76	1,16	0,48	6
	II/1	6,77	1,46	1,03	2
	II/2	12,78	4,87	1,99	6

Tabelle 13. Immunhistochemische Färbung T-zellassoziierter Antigene der Nierentransplantate beider Stufen; Angaben in absoluten Färbereignissen. Mittelwerte mit Standardabweichungen (SA), –fehlern (SF) und Tierzahl (n).

Immunhistochemische Färbung Makrophagen-/MHC II-/DC-assoziierter Antigene

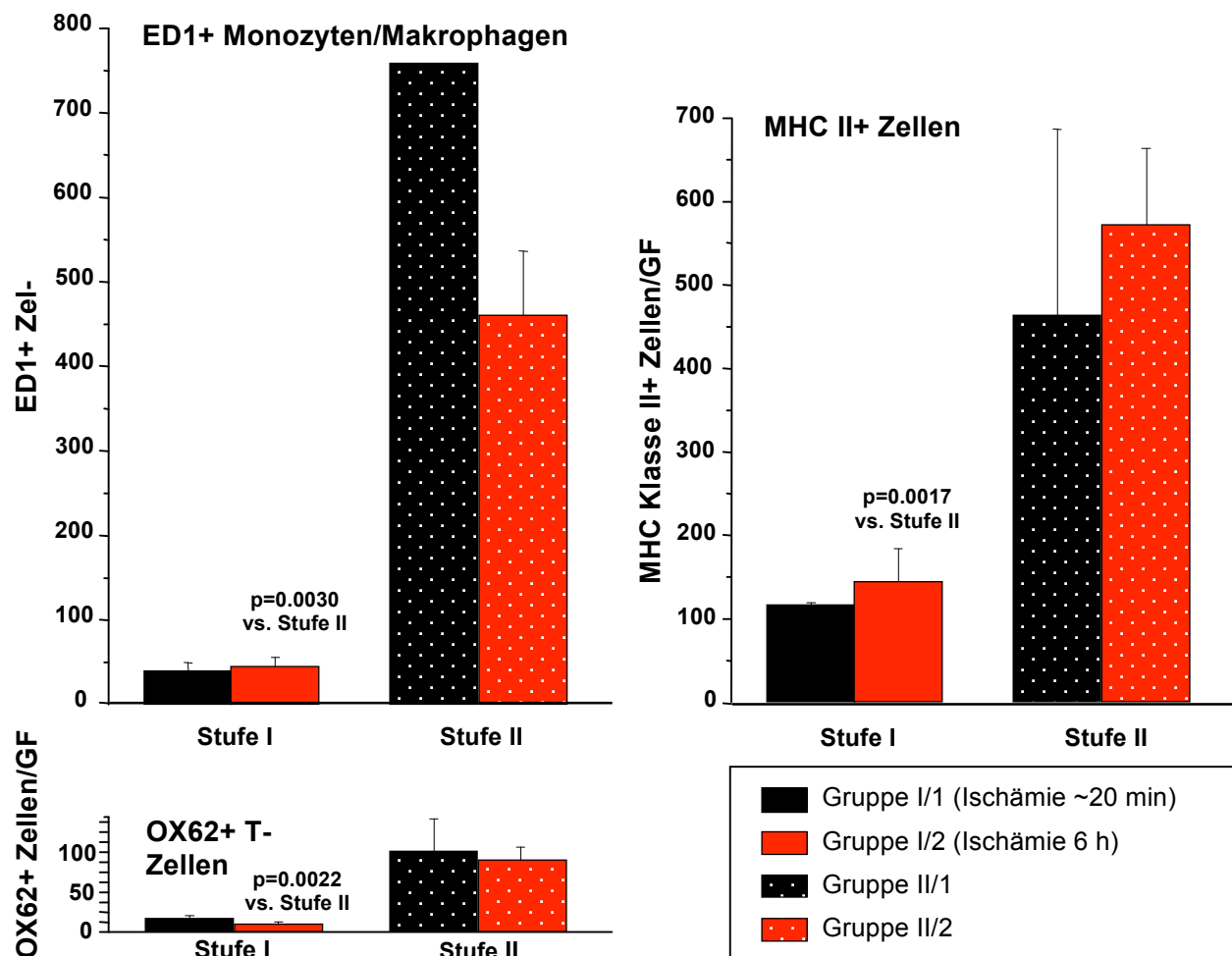


Abbildung 23. Diagramm der immunhistochemischen Färbung gegen Makrophagen-, MHC II- und DC-assozierte Antigene der Transplantate beider Stufen; GF=Gesichtsfeld.

Immunhistochemische Färbung T-zellassoziierter Antigene in Transplantaten beider Stufen					
Antigen	Gruppe	Mittelwert	SA	SF	n
ED1	I/1	39,40	17,35	10,02	3
	I/2	45,27	26,22	10,71	6
	II/1	758,00	0,00	0,00	1
	II/2	460,50	187,22	76,43	6
MHC II	I/1	116,05	5,57	3,21	3
	I/2	144,22	97,87	39,95	6
	II/1	463,33	315,84	223,33	2
	II/2	571,61	226,12	92,31	6
OX62	I/1	13,23	6,07	3,50	3
	I/2	8,03	5,24	2,14	6
	II/1	80,67	46,20	32,67	2
	II/2	71,63	32,13	13,12	6

Tabelle 14. Immunhistochemische Färbung Makrophagen-, MHC II- und DC-assoziierter Antigene der Nierentransplantate beider Stufen; Angaben in absoluten Färbereignissen. Mittelwerte mit Standardabweichungen (SA), -fehlern (SF) und Tierzahl (n).

4.7. Durchflusszytometrische Untersuchung (FACS)

Nach Ablauf der Beobachtungszeit (100 d in Stufe I bzw. 20 d in Stufe II) wurden folgenden Gewebeproben zur Aufbereitung für die durchflusszytometrische Untersuchung (FACS) gewonnen:

- Milzen der Empfänger von Stufe I (Leukozyten für den adoptiven Zelltransfer)
- Blut, Milz und Lymphknoten der Empfänger von Stufe II
- Nierentransplantate der Empfänger von Stufe II

Aus den Organen wurden nach oben beschriebenem Verfahren Suspensionen bereitet und die enthaltenen Leukozyten hinsichtlich der Expression (bzw. Doppelsexpression) folgender Oberflächenantigene qualitativ und quantitativ analysiert:

CD3	Antigen der T-Lymphozyten
CD4	spezifisches Antigen CD4+ T-Helferzellen
CD25	Antigen gegen den IL-2-Rezeptor aktivierter T- und B-Zellen und aktivierter Makrophagen
CD86	Antigen auf der Membran antigen-präsentierender Zellen (co-stimulatorischer Rezeptor der B7-Familie)
OX62	Antigen Dendritischer Zellen
RT1B	Ia-Antigen (MHC Klasse II) auf antigen-präsentierenden Zellen
RT1A ^{ab}	spezifisches Antigen gegen MHC I (Haplotyp RT1 ^a) des DA-Rattenstammes; nicht auf Zellen des Lewis-Stammes.

Bis zu zwei Färbqualitäten (\cong Antigenexpressionen) konnten vom FACS-Gerät in einer Messung registriert werden. Aus den Einfach- bzw. Doppelmessungen der Fluoreszenzen wurde auf den Leukozytentyp geschlossen: Als CD3+ bzw. CD4+ wurden Leukozyten klassifiziert, die einfach-positiv für CD3- bzw. CD4-Färbung waren. Doppelt-gefärbte CD4+CD25+ T-Zellen wurden als regulatorische T-Lymphozyten klassifiziert. Eine zeitgleiche Auswertung der CD3+CD25+-Doppelpositivität diente der Plausibilitätskontrolle. Bei Messung von CD86- oder MHC II-Färbung wurde von einer antigen-präsentierenden Zelle (APC) ausgegangen. Bei einfacher oder zusätzlicher Messung von OX62 wurde die APC als Dendritische Zelle (DC) klassifiziert. Bei Doppel-Messung von OX62+CD86+ oder OX62+MHC II+ wurde von einer aktivierten DC ausgegangen. Bei (einfacher oder zusätzlicher) Färbung von RT1A^{ab} wurde die Zelle als DA-spezifisch und somit vom Spender stammend eingestuft.

Um die Anzahl spenderspezifischer, aktivierter DC zu erheben, musste indirekt das gleichzeitige Vorliegen dreier Antigeneigenschaften gemessen werden: RT1A^{ab} / OX62 / CD86 oder RT1A^{ab} / OX62 / MHC II. Hierzu wurde die *Gating*-Funktion des FACS genutzt: Durch *Gating* wurde der Bereich der gemessenen Zellen anhand ihrer Größe (\cong FSC)- und Dichtewerte (\cong SSC) dergestalt eingeschränkt, dass ausschließlich Dendritische Zellen bei der Fluoreszenzmessung berücksichtigt wurden.

Alle gemessenen Färbeereignisse wurden ausgedrückt als prozentuale Anteile der antigen-postiven (bzw. doppelt antigen-positiven) Leukozyten an der Gesamtmenge gezählter Zellen.

4.7.1. Milzleukozyten der Transfersuspension (Stufe I)

In den isolierten Milzleukozyten der Empfänger von Stufe I (Suspension für den adoptiven Zelltransfer) fanden sich keine signifikanten Unterschiede in den Frequenzen der untersuchten Oberflächenantigene.

Abbildung 24 und Tabelle 15 sind die Werte im grafischen Vergleich, bzw. die statistischen Angaben zu entnehmen.

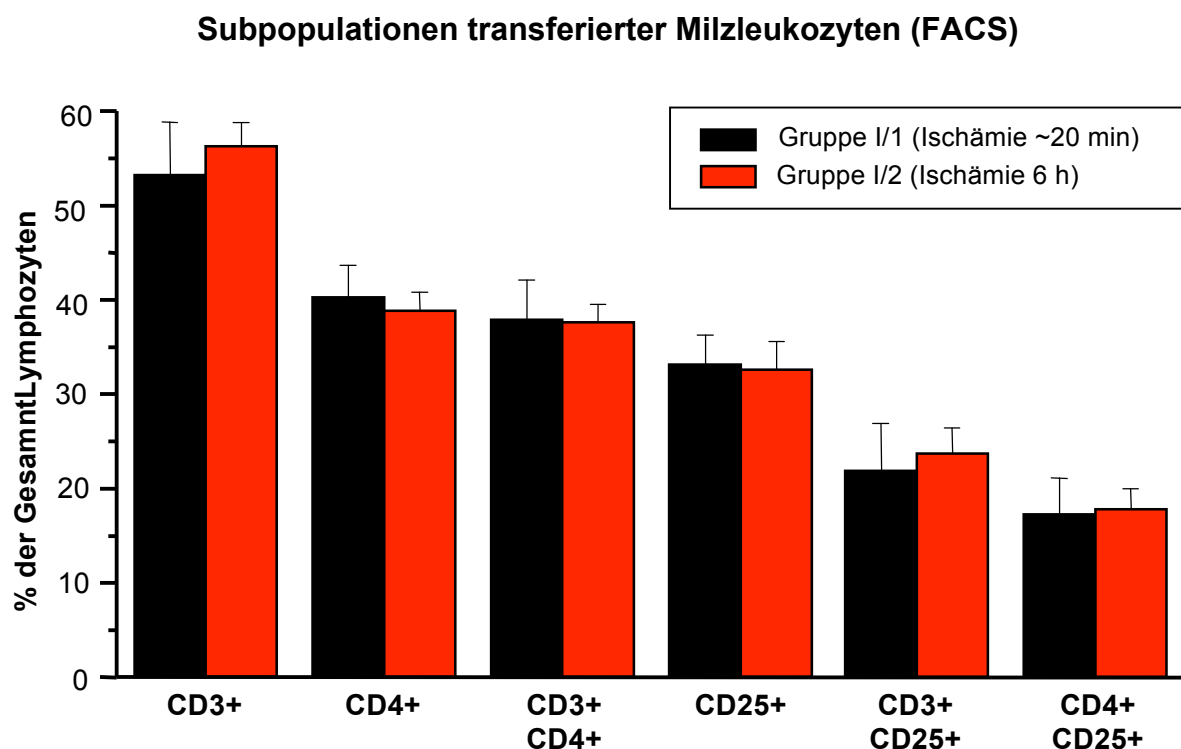


Abbildung 24. Prozentuale Anteile der Subpopulationen an der Gesamtmenge transferierter T-Zellen. Werte, Standardabweichungen und -fehler sind Tabelle 15 zu entnehmen.

Expression lymphozytenassoziierter Antigene bei adoptiv transferierter Zellen der Stufe I (in %)					
Antigen	Gruppe	Mittelwert	SA	SF	n
CD3	I/1	53,24	9,71	5,60	3
	I/2	56,28	6,74	2,55	7
CD4	I/1	40,25	5,89	3,40	3
	I/2	38,84	5,22	1,97	7
CD3 + CD4	I/1	37,87	7,29	4,21	3
	I/2	37,64	5,00	1,89	7
CD25	I/1	33,14	5,43	3,14	3
	I/2	32,64	7,77	2,94	7
CD3 + CD25	I/1	21,88	8,68	5,01	3
	I/2	23,73	7,10	2,68	7
CD4 + CD25	I/1	17,26	6,64	3,84	3
	I/2	17,84	5,64	2,13	7

Tabelle 15. Antigenexpression der Leukozyten in der Suspension für den adoptiven Zelltransfer; wiedergegeben als prozentualer Anteil antigen-positiver Zellen an der Gesamtmenge gezählter Zellen. Mittelwerte mit Standardabweichungen (SA), –fehlern (SF) und Tierzahl (n).

4.7.2. Expression und Verteilung leukozytärer Antigene in Stufe II

Die gewonnenen Leukozyten aus Lymphknoten, Transplantat, Blut und Milz der Empfänger von Stufe II wurden hinsichtlich ihrer Einfach-, bzw. Mehrfachexpression von CD3, CD4, CD25, CD86, bzw. OX62, MHC II und RT1A^{ab} analysiert.

4.7.2.1. Expression lymphozytenassoziierter Antigene

In der Verteilung der T-Zellpopulationen auf Lymphknoten, Blut, Milz und Transplantattiere fanden sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen der Stufe II. Tendenziell geringer war lediglich der absolute Anteil CD3+ Zellen an der Gesamtleukozytenpopulation in Gruppe II/2 (Spenderlymphozyten von Erstempfängern mit verlängerter Transplantatischämie). Dieser Unterschied erreichte statistische Signifikanz hinsichtlich des absoluten Anteils CD4+ T-Zellen in den Kompartimenten Blut und Nierentransplantat. Bei diesen Tieren fand sich zudem ein tendenziell höherer Anteil regulatorischer T-Zellen (CD4+CD25+) in Lymphknoten und Transplantaten; nicht jedoch in Blut oder Milz.

Untenstehende Abbildung 25 gibt die ermittelten Werte für die einzelnen Gewebe im grafischen Vergleich wieder. Die zugehörigen Werte finden sich in Tabelle 16.

Expression lymphozyten-assoziiierter Antigene in Organen der Stufe II (FACS)

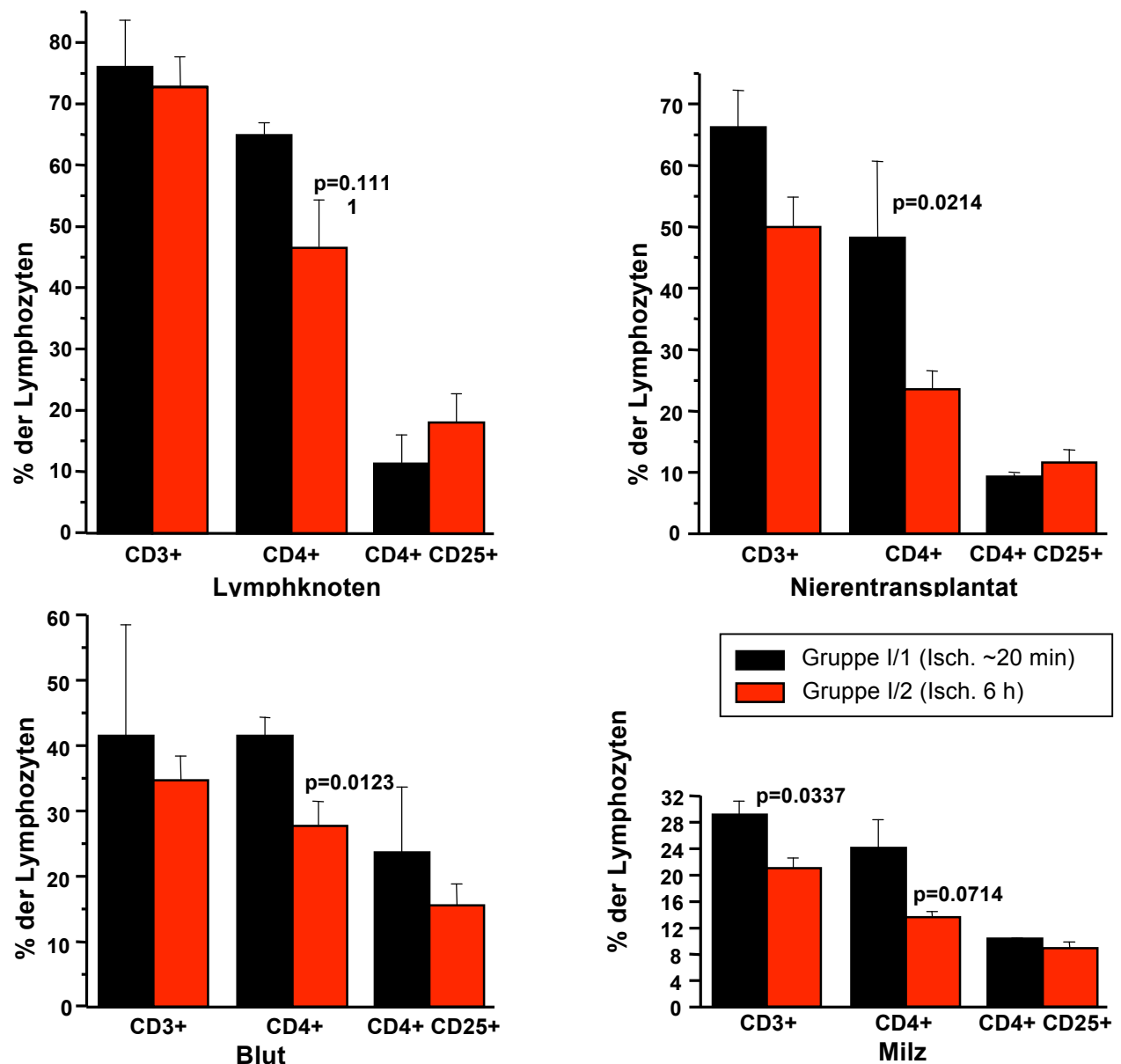


Abbildung 25. Subpopulationen der T-Lymphozyten in den ausgewerteten Organen der Stufe II. Wiedergegeben als prozentualer Anteil des jew. Subtyps an der Gesamtzahl identifizierter Leukozyten. Mittelwerte, Standardabweichungen/–fehler (SF) und Tierzahlen (n) siehe nachfolgende Tabellen.

Expression lymphozytenassoziierter Antigene in Stufe II (%-Anteil gemessener Zellen)					
	Gruppe	Mittelwert	SA	SF	n
Lymphknoten					
CD3	II/1	76,16	10,55	7,46	2
	II/2	72,78	12,86	4,86	7
CD4	II/1	65,04	2,59	1,83	2
	II/2	46,66	20,17	7,62	7
CD4 + CD25	II/1	11,41	6,49	4,59	2
	II/2	18,08	12,01	4,54	7

Niere					
CD3	II/1	66,18	8,56	6,05	2
	II/2	49,95	12,79	4,83	7
CD4	II/1	48,19	17,61	12,45	2
	II/2	23,49	7,40	3,02	6
CD4 + CD25	II/1	9,25	0,71	0,51	2
	II/2	11,60	4,61	2,06	5
Blut					
CD3	II/1	41,42	24,01	16,98	2
	II/2	34,59	10,07	3,81	7
CD4	II/1	41,46	3,96	2,80	2
	II/2	27,63	9,78	3,70	7
CD4 + CD25	II/1	23,60	14,20	10,04	2
	II/2	15,43	8,96	3,39	7
Milz					
CD3	II/1	29,15	2,94	2,08	2
	II/2	21,08	3,95	1,49	7
CD4	II/1	24,11	6,03	4,27	2
	II/2	13,60	2,05	0,84	6
CD4 + CD25	II/1	10,35	0,10	0,07	2
	II/2	8,85	2,44	0,99	6

Tabelle 16. Expression lymphozytenassoziierter Antigene in Zellen aus den Organen der Stufe II, wiedergegeben als prozentualer Anteil antigen-positiver Zellen an der Gesamtmenge gezählter Zellen. Mittelwerte mit Standardabweichungen und –fehlern.

4.7.2.2. Expression DC-assoziierter Antigene

Die Verteilung sowohl aktivierter, spendereigener (OX62+RT1A^{ab+}) als auch allgemein der Dendritischer Zellen (DC) (OX62+) wies keinen signifikanten Unterschied zwischen den Gruppen der Stufe II auf. Tendenziell war der relative Anteil aktivierter, spendereigener DC bei Gruppe II/2 (Leukozyten von Transplantatempfängern mit initial kurzer Ischämie) höher als bei Gruppe II/1. Dies gilt insbesondere für Leukozyten der Lymphknoten und der Nierentransplantate. Beim Vergleich zu berücksichtigen ist jedoch die geringe Größe der Gruppe II/2 (n=1).

Untenstehende Abbildung 26 gibt einen grafischen Vergleich der möglichen Mehrfachpositivitäten für spendereigene, aktivierte DC wieder. Die zugehörigen statistischen Werte finden sich in Tabelle 17.

Mehrfachexpression DC-assoziiierter Antigene in Organen der Stufe II (FACS)

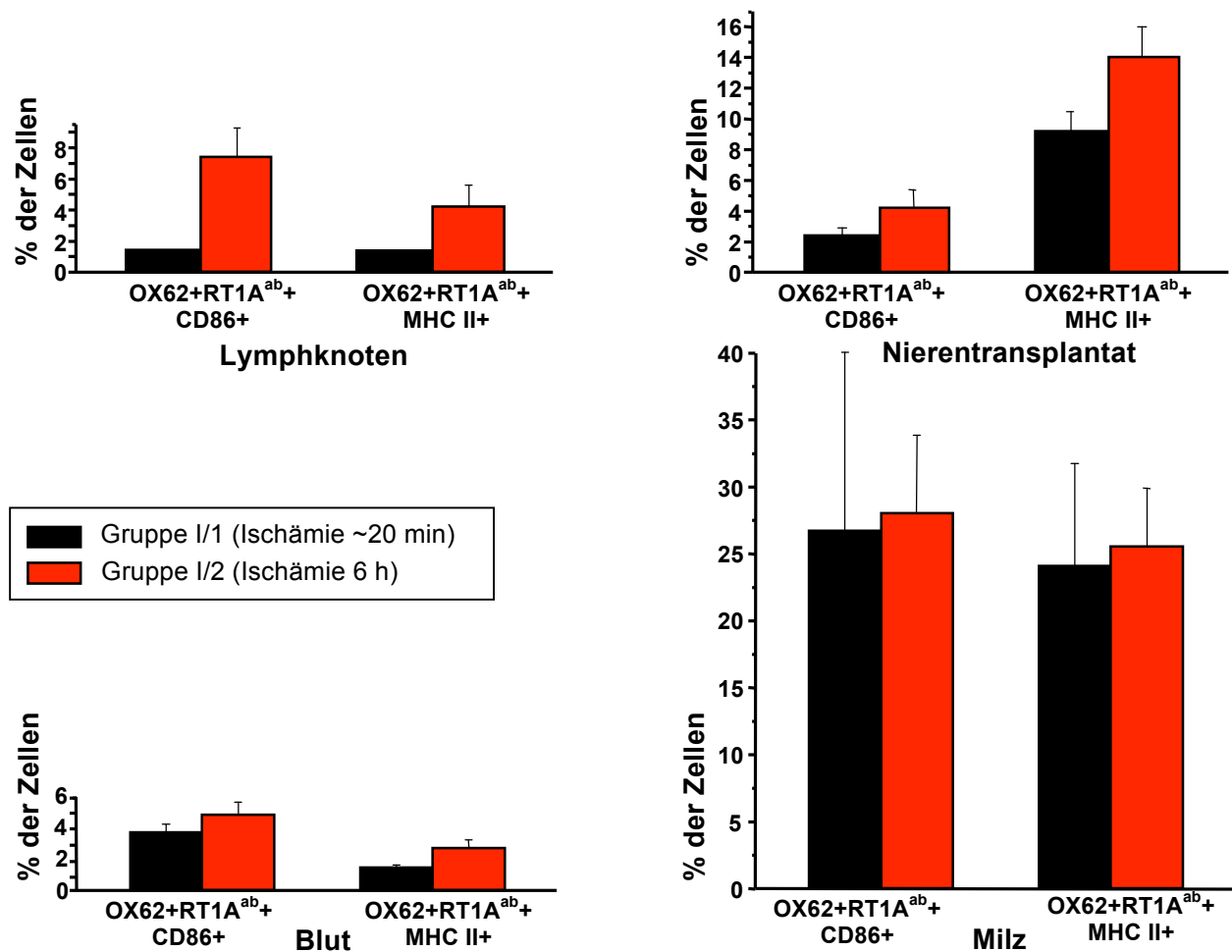


Abbildung 26. Mehrfachexpression DC-assoziiierter Antigene in den ausgewerteten Organen der Stufe II. Wiedergegeben als prozentualer Anteil des jew. Subtyps an der Gesamtzahl identifizierter Leukozyten. Mittelwerte, Standardabweichungen/–fehler (SF) und Tierzahlen (n) siehe nachfolgende Tabellen.

Expression DC-assoziiierter Antigene in Stufe II (%-Anteil der gemessenen Zellen)					
	Gruppe	Mittelwert	SA	SF	n
Lymphknoten					
OX62	II/1	10,15	0,00	0,00	1
	II/2	3,11	1,25	0,51	6
CD86	II/1	6,51	0,00	0,00	1
	II/2	3,36	0,88	0,36	6
MHC II	II/1	29,50	0,00	0,00	1
	II/2	25,32	6,92	2,83	6
RT1A ^{ab}	II/1	0,60	0,00	0,00	1
	II/2	1,79	2,40	0,98	6
OX62 + RT1A ^{ab} + CD86	II/1	1,42	0,00	0,00	1
	II/2	7,38	4,13	1,85	5
OX62 + RT1A ^{ab} + MHC II	II/1	1,39	0,00	0,00	1
	II/2	4,20	3,07	1,37	5

Niere					
OX62	II/1	9,92	0,75	0,53	2
	II/2	8,94	1,01	0,51	4
CD86	II/1	5,58	4,75	3,36	2
	II/2	5,79	1,87	0,93	4
MHC II	II/1	17,50	1,94	1,37	2
	II/2	18,98	4,96	2,48	4
RT1A^{ab}	II/1	16,87	12,25	8,66	2
	II/2	17,96	7,39	3,69	4
OX62 + RT1A^{ab} + CD86	II/1	2,41	0,69	0,49	2
	II/2	4,18	2,39	1,20	4
OX62 + RT1A^{ab} + MHC II	II/1	9,17	1,85	1,31	2
	II/2	14,03	3,93	1,97	4
Blut					
OX62	II/1	5,57	4,12	2,92	2
	II/2	3,08	1,08	0,48	5
CD86	II/1	3,91	0,39	0,28	2
	II/2	5,34	2,75	1,23	5
MHC II	II/1	24,04	10,90	7,71	2
	II/2	25,03	8,16	3,65	5
RT1A^{ab}	II/1	11,94	4,63	3,28	2
	II/2	12,77	3,94	1,76	5
OX62 + RT1A^{ab} + CD86	II/1	3,43	0,65	0,46	2
	II/2	4,47	1,60	0,72	5
OX62 + RT1A^{ab} + MHC II	II/1	1,31	0,21	0,15	2
	II/2	2,47	1,10	0,49	5
Milz					
OX62	II/1	2,29	0,32	0,23	2
	II/2	3,14	1,12	0,42	7
CD86	II/1	15,28	0,93	0,66	2
	II/2	20,36	4,03	1,52	7
MHC II	II/1	38,68	4,48	3,17	2
	II/2	47,72	8,12	3,07	7
RT1A^a	II/1	15,34	0,00	0,00	1
	II/2	9,86	1,52	0,76	4
OX62 + RT1A^{ab} + CD86	II/1	45,36	0,00	0,00	1
	II/2	30,50	8,42	4,21	4
OX62 + RT1A^{ab} + MHC II	II/1	26,40	0,00	0,00	1
	II/2	18,29	4,11	2,06	4

Tabelle 17. Expression DC-assoziiertes Antigenen in Zellen aus den Organen der Stufe II, wiedergegeben als prozentualer Anteil antigen-positiver Zellen an der Gesamtmenge gezählter Zellen. Mittelwerte mit Standardabweichungen und –fehlern.

4.8. ELISA der leukozytären Zytokinexpression

Aus den Zellkulturüberständen *in vitro* stimulierter Milzsuspensionen von Tieren der Stufe II wurden im ELISA (*Enzyme linked immunosorbent essay*) die Konzentrationen folgender Zytokine bestimmt:

IL-4 und IL-10	als anti-inflammatorische Zytokine der TH2-Zellen
IL-6	als pro-inflammatorisches Zytokin der Makrophagen
IFN- γ	als Indikator antigen-aktivierter TH1- und NK-Zellen
TNF- α	als Indikator pro-inflammatorischer TH1-Zell- und Makrophagenaktivität

In Gruppe II/2 waren tendenziell höhere Konzentrationen von IFN- γ , IL-4, IL-6 und IL-10 festzustellen. Die einzige Ausnahme bildete die Expression von TNF- α die in Gruppe I/1 tendenziell erhöht war. Bei Beurteilung dieser Tendenz muss jedoch die geringe Gruppengröße berücksichtigt werden (n=2). Keiner der gefundenen Unterschiede erreichte statistische Signifikanz.

In Tabelle 18 und Abbildung 27 finden sich die Einzelwerte und ein grafischer Vergleich der Gruppen.

Zytokinkonzentrationen der Milzleukozyten in Stufe II (ELISA)

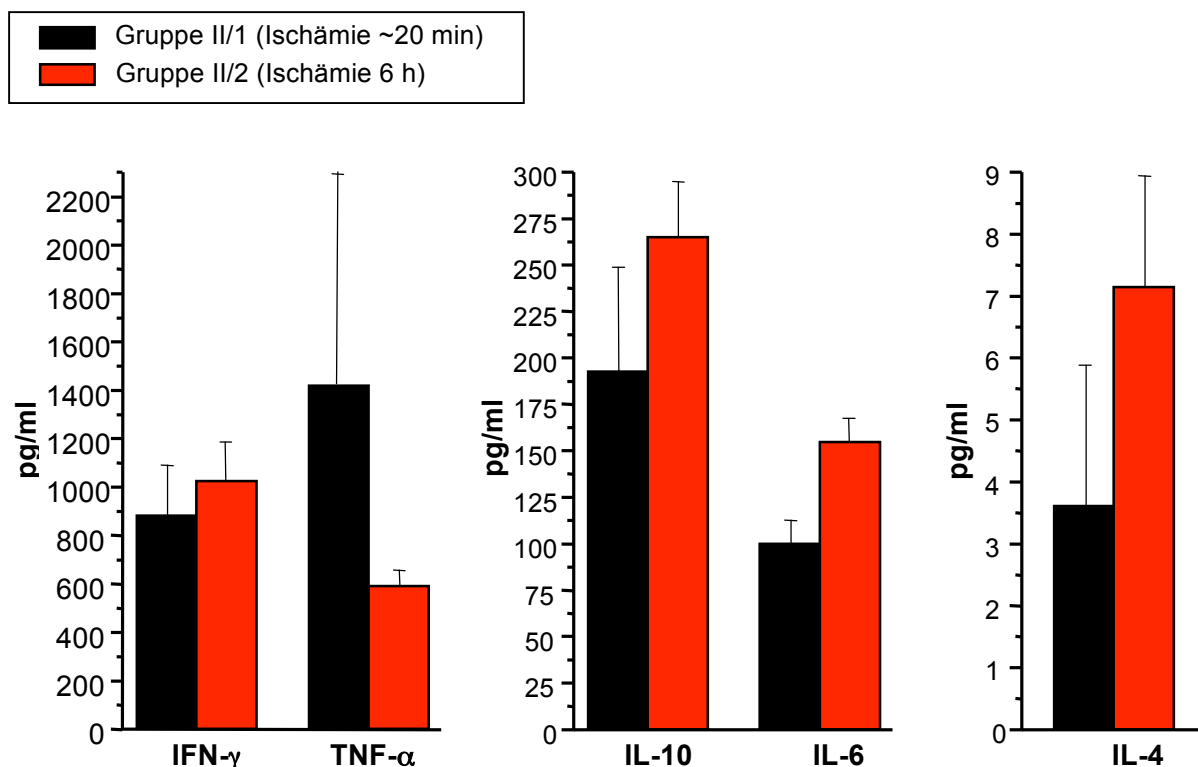


Abbildung 27. Zytokinexpression der Milzleukozyten 20 d nach NTx im ELISA; wiedergegeben als absolute Menge in pg/ml nach Synthesestimulation.

Zytokinproduktion der Milzleukozyten von Stufe II (in pg/ml)					
Zytokin	Gruppe	Mittelwert	SA	SF	n
IL-4	II/1	36,15	44,76	22,38	2
	II/2	71,38	67,17	17,95	7
IL-10	II/1	1924,75	1125,89	562,95	2
	II/2	2648,08	1071,79	297,26	6
IL-6	II/1	998,50	251,02	125,51	2
	II/2	1544,71	480,42	128,40	7
TNF- α	II/1	14188,25	17477,32	8738,66	2
	II/2	5906,36	2427,48	648,77	7
IFN- γ	II/1	8822,25	4136,47	2068,24	2
	II/2	10513,43	5679,43	1517,89	7

Tabelle 18. Zytokinproduktion der Leukozyten aus den Milzen der Tiere von Stufe II, wiedergegeben als relative Menge in pg/ml. Mittelwerte mit Standardabweichungen (SA), –fehlern (SF) und Tierzahl (n).

4.9. ELISPOT-Assay der leukozytären IFN- γ -Expression

Die IFN- γ -Expression ist als zuverlässiger Parameter antigen-spezifischer T-Zell-Aktivierung anerkannt (115). Aus den Milzen der Tiere von Stufe II wurden Leukozyten isoliert und im ELISPOT deren IFN- γ -Produktion (nach Restimulation mit Spenderantigenen) quantifiziert. Das Ergebnis wurde wiedergegeben als absolute Anzahl IFN- γ + T-Lymphozyten pro 1×10^6 Zellen der Gesamtpopulation an CD3+, bzw. CD4+ T-Zellen.

Ein tendenziell höherer Anteil IFN- γ -positiver T-Lymphozyten zeigte sich bei den Tieren der Gruppe II/2 (Leukozytenspender mit Transplantat verlängerter Ischämie). Diese Tendenz fand sich sowohl in Bezug auf die Gesamtheit aller gemessenen T-Zellen (CD3+), als auch bei der Subpopulation von TH1- und 2-Helferzellen (CD4+-Zellen). Statistische Signifikanz erreichten diese Unterschiede nicht.

Tabelle 18 sind die Einzelwerte und statistische Angaben zu entnehmen. Abbildung 28 (nächste Seite) zeigt die Werte im grafischen Vergleich.

Anzahl IFN-γ+ T-Lymphozyten einer Subpopulation im Transplantat von Stufe II (je 10^6 T-Zellen)					
Subpopulation	Gruppe	Mittelwert	SA	SF	n
CD4+ T-Lymphozyten	II/1	2539,00	1865,35	1319,00	2
	II/2	3874,67	1419,98	579,70	6
CD3+ T-Lymphozyten	II/1	1864,50	828,02	585,50	2
	II/2	2348,86	1119,33	423,07	7

Tabelle 19. Anzahl IFN- γ + in den Milzen der Tiere von Stufe II, wiedergegeben als absolute Anzahl pro eine Million Zellen der Gesamtpopulationen von CD3+ bzw. CD4+ T-Lymphozyten. Mittelwerte mit Standardabweichungen (SA), –fehlern (SF) und Tierzahl (n).

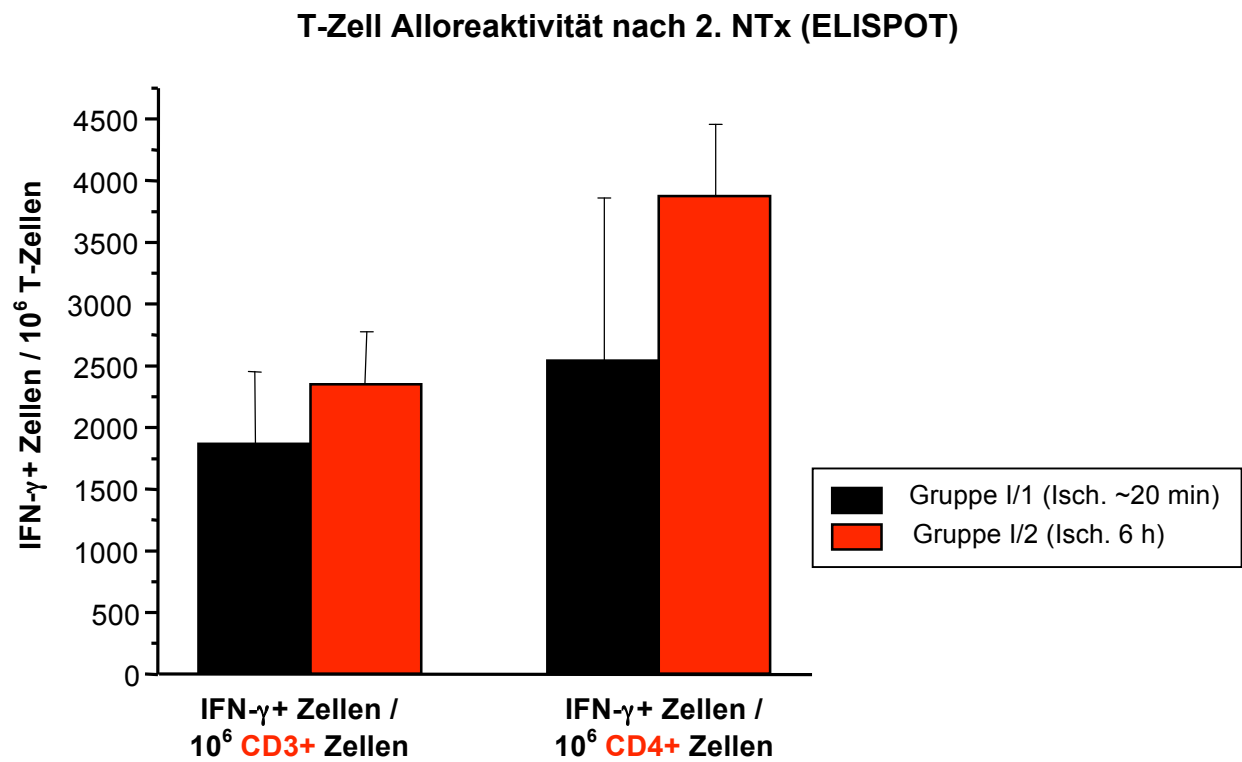


Abbildung 28. Alloreaktivität der Milzleukozyten 20 d nach 2. NTx im ELISPOT; wiedergegeben als Anzahl IFN- γ + Leukozyten pro 10^6 T-Lymphozyten.

5. Diskussion

Die Immuntherapie der Allotransplantatabstoßung richtet sich üblicherweise unspezifisch gegen Aktivierung, klonale Expansion oder Differenzierung von Effektor-T-Zellen. Im Tiermodell gelang es, die physiologischen Mechanismen der Immunhomöostase und Selbsttoleranz auszunutzen, um eine Toleranz auch gegenüber Alloantigenen zu schaffen; u.a. mittels des monoklonalen Antikörpers CTLA4-Ig.

Das Prinzip der Costimulations-Inhibition beruht auf der Tatsache, dass periphere T-Lymphozyten erst nach Signalübermittlung durch Vertreter der B7-CD28-Familie costimulatorischer Moleküle aktiv werden und expandieren. Diese Moleküle werden von antigen-präsentierenden Zellen (APC) zeitgleich mit dem prozessierten Alloantigen zur Bindung dargeboten und binden am CD28-Rezeptor der T-Zelle. Als bedeutendste APC im Rahmen der T-Zell-Aktivierung gelten Dendritische Zellen (DC). Die Präsentation durch DC ist unerlässlich sowohl für eine Antigen-spezifische Rejektion als auch die Ausbildung einer spezifischen Toleranz (116). Für letztere sind nach Transplantation insbesondere unreife, vom Spender stammende DC von Bedeutung (117). Die von DC und anderen APC übermittelten costimulatorischen Signale können jedoch auch inhibierend wirken. Inhibierende Signale gewährleisten physiologischer Weise die Transduktion hemmender Immunsignale zur Verhinderung überschießender Reaktionen und zur Gewährleistung einer Toleranz gegenüber Autoantigenen.

CTLA4-Ig vermittelt eine solche Inhibition durch zwei Mechanismen: Einerseits bindet CTLA4-Ig mit größerer Affinität an die aktivierenden B7-Rezeptoren der APC, als die CD-28 Rezeptoren der T-Zellen (indirekte Inhibition). Gleichzeitig hemmt CTLA4-Ig direkt (unabhängig von CD28) die Bindungen aktivierender Liganden an den T-Zellrezeptor.

Bei Blockade der Costimulation wird dem Modell von Tullius und Kollegen zufolge letztlich das Allotransplantat selbst kausal für die Entwicklung der Toleranz, indem es die Differenzierung toleranzerhaltender regulatorischer T-Zellen (Tregs) induziert (118). Als regulatorische T-Zellen werden vor allem CD4⁺CD25⁺ T-Zellen aufgefasst. Sie sind nach allgemeiner Ansicht die Träger einer erworbenen Allogentoleranz, unabhängig vom Mechanismus der Induktion (51). Ihre toleranzerhaltende Wirkung beruht einerseits auf Inhibition der IFN- γ -Produktion, die für eine Aktivierung der Effektor T-Zellen von Bedeutung ist. Andererseits wirken Tregs unmittelbar inhibierend auf zytotoxische T-

Lymphozyten (CTL). CD4+CD25+ Tregs sind darüber hinaus in der Lage, über unbekannte Mechanismen, CD25- T-Zellen zur Entwicklung immunsuppressiver Wirkung anzuregen (119). Obschon die genauen Funktionsprinzipien noch diskutiert werden, ist gesichert, dass die Persistenz von Tregs für eine Transplantattoleranz unabdingbar ist: Ein zuvor toleriertes Allotransplantat wird vom Empfänger abgestoßen, sobald dieser von CD4+CD25+ T-Zellen befreit wird (120).

Zu diesen komplexen antigen-abhängigen Mechanismen tritt der Ischämie-Reperfusionsschaden (I/R-Schaden) als antigen-unabhängige Determinante des Abstoßungsgeschehens hinzu. Nach Reanastomosierung und Freigabe des Blutflusses kommt es im Transplantat zu einer Inflammationsreaktion: Eine gesteigerte Chemokinproduktion und Adhäsionsmolekülexpression des Gefäßendothels initiiert die Infiltration neutrophiler Granulozyten. Ihnen folgen Monozyten, NK-Zellen und T-Zellen. Die bei Reperfusion am Endothel adhärierenden Leukozyten tragen dann durch Ausschüttung proinflammatorischer Zytokine zur Transplantatschädigung bei. Gleichzeitig reduzieren sie den Blutfluss in peritubulären Kapillaren. Die Vasa Recta verstopfen und es kommt zu erhöhter Endothelpermeabilität (121). Zusätzlich werden reaktive Sauerstoffverbindungen ausgeschüttet, die den Schaden aggravieren (73).

Im Rahmen dieser Arbeit wurde untersucht, welche Auswirkungen der antigen-unabhängige I/R-Schaden nach einer Empfängerbehandlung mit CTLA4-Ig entfaltet:

1. auf Transplantatfunktion, Empfängerüberleben und histomorphologische Organveränderungen
2. auf die Frequenz toleranzrelevanter T Zellen und (aktivierter) DC

Hierzu wurden zwei Empfängergruppen unterschiedlich langer Ischämiezeit verglichen (~20 min vs. 6 h kalte Ischämie). Proben der Empfänger wurden in zwei Stufen gewonnen: 100 d nach einer Transplantation mit CTLA4-Ig-Empfängerbehandlung sowie 20 d nach einer zweiten Transplantation auf einen neuen Empfänger, dem zuvor Milzleukozyten des toleranten Tieres der ersten Stufe transfiziert wurden (adoptive Toleranzübertragung). Die Übertragung der induzierten Toleranz erlaubte eine Differenzierung der Auswirkungen des I/R-Schadens im Rahmen der antigen-abhängigen Immunantwort: Die Tiere der Stufe II erhielten adoptiv transferierte Zellen von Transplantatempfängern, die unterschiedlichen Ischämiezeiten ausgesetzt waren (~20 min vs. 6 h). Die den Empfän-

gern der Stufe II transplantierten Nieren waren hingegen einheitlich nur kurzer Ischämie ausgesetzt (~20 min).

In den gewonnenen Proben wurden die Frequenzen CD3+ bzw. CD4+ T-Zellen, regulatorischer T-Zellen (CD4+CD25+), sowie unspezifische DC (OX62+) und aktivierte DC des Spenders (OX62+RT1A^{ab}+CD86+) bestimmt. Ergänzend wurden die Expressionsniveaus charakteristischer Interleukine der Immunantwort (IL-2, IL-4, IL-10, IFN- γ , TNF- α) untersucht, um Rückschlüsse auf die Alloreaktivität der T-Zellen bzw. den Aktivierungsgrad der DC ziehen zu können.

Überleben und Transplantatfunktion der Erstempfänger waren die klinischen Zielparame-ter in Stufe I dieser Untersuchung. Unerwarteter weise zeigte sich, dass das Empfängerüberleben nach verlängerter Ischämie (6h) signifikant besser war, als das nach kurzer. Der herrschenden Meinung folgend wurden Todesfälle zwischen dem 3. und 10. postoperativen Tag als Folge akuter Abstoßung im verwendeten Tiermodell (DA→Lew) gewertet. Der Anteil derartiger Todesfälle war in beiden Gruppen vergleichbar. In der Empfängergruppe mit kurzer Ischämie (Gruppe I/1) kam es jedoch zu einer signifikant erhöhten Sterberate bezogen auf die Gesamtdauer der Beobachtungszeit. Ein systematischer Fehler bei Gruppenzuordnung und Behandlung erscheint angesichts der widersprüchlichen Überlebensunterschiede naheliegend, kann jedoch ausgeschlossen werden: Die Zuordnung der Versuchstiere zu den Ischämiegruppen erfolgte randomisiert und unmittelbar vor Operation. Als kausal für das bessere Empfängerüberleben muss stattdessen eine geringere Immunschädigung des Transplantates nach verlängerter Ischämie angenommen werden. Hierfür sprechen auch die ermittelten Nierenfunktionsparameter: Der Tod der Empfänger von Gruppe I/1 (kurze Ischämie) ging regelmäßig mit schlechterer Nierenfunktion einher. Analog dem Empfängerüberleben waren umgekehrt die Werte von Proteinurie und Kreatininclearance in der Gruppe verlängerter Ischämie signifikant besser (statistische Signifikanz ab einem Zeitpunkt von einem, bzw. zwei Monaten nach NTx). Ob dieser Effekt sich nach Toleranztransfer auf Empfänger der Stufe II überträgt konnte nicht beurteilt werden. Aufgrund des kurzen Beobachtungszeitraumes von 20 Tagen wurden in Stufe II keine Funktionsparameter erhoben, die einen Vergleich ermöglichen würden.

Auch in der Histomorphologie zeigte sich eine geringere strukturelle Transplantatschädigung nach verlängerter Ischämie (Bewertung in Anlehnung an die etablierte Banff-Klassifikation chronischer Abstoßung). Statistische Signifikanz erreichte der Unter-

schied in der Banff-Kategorie der Tubulären Atrophie. Auch in den übrigen Kategorien zeigte sich noch der deutliche Trend: Die Transplantate verlängerter Ischämie (6 h) wiesen durchgehend schwächere morphologische Schädigungen auf. Bemerkenswert ist, dass nach Zweittransplantation keine vergleichbaren Unterschiede zu beobachten waren: Die Transplantate beider Gruppen der Stufe II wiesen einheitliche, moderate Schädigungsmuster auf (Beurteilung in Anlehnung an die Banff-Kriterien akuter Rejektion). Eine Ausnahme war Tier 23 der Gruppe II/2 (Zelltransfer von Erstempfänger mit 6h Ischämie). Hier fand sich das Bild einer hyperakuten Abstoßung. Insgesamt waren die Ergebnisse der Stufe II nach adoptivem Zelltransfer allerdings nur bedingt auswertbar, da nur 2 Tiere der Gruppe mit initial kurzer kalter Ischämie in die Auswertung einbezogen werden konnten.

Im hier verwendeten Tiermodell träte ohne Immunbehandlung spätestens 10 d nach Transplantation einer der Tod des Empfängers ein. In Stufe I hat die Behandlung mit CTLA4-Ig am 3. postoperativen Tag also zum Überleben der Versuchstiere bis zum Ende des Beobachtungszeitraums geführt und zwar unabhängig von der kalten Ischämiezeit der Transplantatniere. Insgesamt erscheint das toleranzinduzierende Potential einer alleinigen Gabe von CTLA4-Ig jedoch unzureichend. Mit einem Gesamtüberleben von 34,48% konnten in dieser Arbeit die positiven Ergebnisse anderer Arbeitsgruppen, die von einem Überleben bis zu 86% bei Monotherapie mit CTLA4-Ig nach NTx berichten, nicht nachvollzogen werden (120). Ein Grund hierfür kann in der differentiellen Affinität von CTLA4 zu den costimulatorisch wirkenden Rezeptortypen CD86 und CD80 der T-Zelle gesehen werden. CD86 und CD80 haben überlappende, aber nicht identische Funktionen. Beide binden CD28 im Rahmen antigen-abhängiger T-Zellaktivierung. CD86 wird konstitutiv von APCs exprimiert und bei Bedarf schnell hochreguliert. Die Synthese von CD80 erfolgt hingegen erst nach längerer Stimulation (122). Es konnte gezeigt werden, dass CD86 eine stärkere Bindungsaffinität zu CD28 besitzt, während CD80 bevorzugt CTLA4 bindet (123). Es wird angenommen, dass CD86 eher für die initiale Aktivierung CD4+ T-Zellen verantwortlich ist. CD80 hingegen soll im späteren Verlauf der Signalkaskade eine negative Rückkopplung vermitteln, die der Vermeidung überschießender Abstoßungsreaktionen dient (124). Infolge der Affinitätsunterschiede sind auch die Rekrutierungsvermögen der jeweiligen Bindungspartner zur immunologischen Synapse verschieden stark ausgeprägt: CD86 regt primär die CD28-Rekrutierung an, CD80 die von CTLA4.

Eine weitere Limitierung der therapeutischen Anwendbarkeit von CTLA4-Ig kann in alternativen Signalwege der Costimulation vermutet werden: Inzwischen sind eine Reihe costimulatorischer Ligandenpaare beschrieben. Diese Liganden vermögen sowohl aktivierende als auch inhibierende Signale zu vermitteln. Anhand struktureller Verwandtschaften werden sie in zwei Klassen zusammenfasst:

CD28:B7-Klasse: *aktivierend*: CD28:CD86(B7.2) > CD80(B7.1); ICOS:ICOS-L
 inhibierend: CTLA4:CD80 > CD86; PD-1:PD-L1/L2
 aktivierend und inhibierend: B7-H3:(Ligand unbekannt)

TNF-TNF-R-Klasse: *aktivierend*: CD154:CD40; 4-1BB:4-1BBL; CD134:CD134L,
 CD27:CD70

Neben diesen Kontakten zwischen T-Zellen und APC wurden eine Reihe weiterer Bindungen als Faktoren der Costimulation ausgemacht: Es wurden sowohl T-Zell/T-Zell- als auch T-Zell/B-Zell-Interaktionen nachgewiesen, die costimulatorisch wirksam sind (125, 126). Zusätzlichen Einfluss entfalten direkte Interaktionen zwischen T-Zellen und peripheren, nicht-lymphoiden Zellen des Endothels und Parenchyms (127). Die Vielschichtigkeit und Interdependenz der vorhandenen Mechanismen führte zur Einsicht, dass die resultierende Immunantwort nach Prozession eines Antigens weder monokausal bedingt, noch statisch in ihrer Qualität sein kann: Abstoßung oder Toleranz sind nicht irreversible Folgen singulärer Zellinteraktionen. Sie sind ein Fließgleichgewicht vielfältiger Zellinteraktionen (128).

Entsprechend geben viele Autoren mittlerweile einer Kombinationsbehandlung den Vorzug. Eine potente Toleranzinduktion wird insbesondere durch kombinierte Anwendung eines nicht-depletierenden Anti-CD4-Antikörpers (=Signal 1-Blockade) beschrieben; beispielsweise RIB5/2. Versuche mit RIB5/2, die zeitgleich zu dieser Arbeit von Hartmann und Kollegen durchgeführt wurden, unterstützen diese Vermutung: Bereits bei alleiniger Anwendung des Signal 1-Inhibitor RIB5/2 wurde in identischem Setting eine Überlebensrate von >60% erreicht (129). Eine weitere Steigerung scheint durch Kombination der beiden Mechanismen möglich, wie sie u.a. von Graser und Kollegen berichtet wird (130).

Ungeachtet der insgesamt schwach tolerogenen Wirkung der CTLA4-Ig-Behandlung, erscheint das schlechtere Überleben nach kurzer Ischämie im Rahmen dieser Arbeit widersprüchlich. Eine verlängerte Ischämie führt regelmäßig zu stärkeren Transplantat-

schäden und einem schlechteren Outcome von Transplantatfunktion und Empfängerüberleben. Funktionsparameter und Histologie beweisen aber, dass die Todesfälle ab 10 d post NTx Folge stärkerer Abstoßungsreaktionen sind. Ein Überleben über diese Zeit hinaus muss entsprechend als Erfolg der Immuntherapie gesehen werden.

Ein systematischer Fehler als Ursache dieser verstärkten Abstoßung erscheint plausibel, kann aber ausgeschlossen werden: Die Auswahl der Individuen und des Operationszeitpunktes erfolgte randomisiert. Auch ein artifizieller Effekt ist nicht anzunehmen. Die verwendeten Tiere stammten aus unterschiedlichen Würfen und wurden in zeitlichen Abständen von mehreren Monaten und mit verschiedenen Chargen CTLA4-Ig behandelt.

Im vorliegenden Fall korreliert eine verlängerte Ischämie mit einem protektiven Effekt auf das Transplantat bei Empfängerbehandlung mit CTLA4-Ig. Angesichts der Wirkmechanismen von CTLA4-Ig über B7- bzw. CD28-Bindung ist fraglich, ob dieser positive Effekt kausal auf die primär als schädlich bekannte Wirkung verlängerter Ischämie zurück geführt werden kann. Ein grundsätzliches Vorhandensein gegenregulatorischer Mechanismen des Organismus auf einen I/R-Schaden ist bekannt. Im Tiermodell und im Rahmen klinischer Studien konnte ein Nutzen ischämischer Präkonditionierung u.a. bei Herz-, Leber- und Lungenoperationen belegt werden (131). Gemeinsam ist den verschiedenen Protokollen das Prinzip kurzzeitiger warmer Ischämie (10 - 20 min) mit anschließender Normalperfusion. Erst nach dieser Reperfusion wird das Organ entnommen und der kalten Ischämie ausgesetzt. Hierbei sollen im Rahmen der kurzen warmen Ischämie verschiedene protektive Mechanismen für die folgende (längere) kalte Ischämie initiiert werden. Eine Präkonditionierung in diesem Sinn hat in der vorliegenden Arbeit nicht stattgefunden. Wenn eine protektive Interaktion der verlängerten Ischämie mit der CTLA4-Ig Behandlung stattgefunden hat, dann ausschließlich in der Differenzzeit von ~5,5 h kalter Ischämie zwischen den Gruppen I/1 und I/2. Ein Erklärungsversuch muss von der als erwiesen anzusehenden Tatsache ausgehen, dass Ischämie grundsätzlich schädigend auf Zellen wirkt. Konstruierbar erscheint daher ein Modell der Deletion schädigender Zytokine oder Effektorzellen, die nachteilig auf den von CTLA4-vermittelten Effekt wirken. Sie könnten im Laufe einer verlängerten Ischämie untergegangen sein. Einen Ansatz hierfür bieten die vorliegenden Ergebnisse jedoch nicht.

Unabhängig vom paradoxen Survival in Stufe I imponiert die fehlende Auswirkung des I/R-Schadens auf Transplantatmorphologie und Überleben der Empfänger von Stufe II.

Auffällig ist, dass beide Empfängergruppen der Stufe II den Beobachtungszeitraum von 20 Tagen überleben und einheitlich nur moderate Schädigungen in der Histologie aufweisen. Die adoptiv transferierten Leukozyten scheinen gleichstarke tolerogene Wirkung entfaltet zu haben. Die verschiedenen Ursprünge der transferierten Zellpopulationen von Empfängern mit kurzer oder verlängerter Ischämie blieben diesbezüglich ohne Bedeutung.

Die Transplantate der Stufe II waren keiner verlängerten Ischämie ausgesetzt. Im Umkehrschluss kann vermutet werden, dass die Immunreaktionen der Empfänger von Stufe I zu identischen Auswirkungen auf die T-Zellantwort geführt haben, unabhängig von verschiedenen Ischämiezeiten. Wenn dem so ist, stellen sich die Unterschiede in Überleben und Transplantatfunktion in Stufe II als alleinige Folge kurzer bzw. verlängerter Ischämie dar. Das Ausmaß der hier beobachteten Transplantatabstoßung wäre allein Folge des antigen-unabhängigen I/R-Schadens, der sich vor dem Hintergrund einer einflusslosen antigen-abhängigen T-Zellantwort abspielt.

Auch in den qualitativen Untersuchungen boten sich keine Anzeichen eines Unterschiedes in der antigen-abhängigen Immunantwort. In der immunhistochemischen Färbung bot sich ein unspezifisches Bild. Beide Gruppen der Stufe I wiesen einheitlich erhöhte Expressionen der untersuchten Antigene auf (CD4, CD8 und CD25 als lymphozyten-spezifisch, sowie ED1, OX62 und OX3 als APC-spezifisch). Qualitative Unterschiede in der Immunantwort sind hieran nicht festzumachen. In Stufe II verhielt es sich entsprechend: Bei insgesamt erhöhten Zellzahlen im Vergleich zur Ersttransplantation fanden sich keine quantitativen Unterschiede zwischen den Gruppen II/1 und II/2.

Nahezu identische T-Zellfrequenzen in der Transfersuspension und den Organen der Empfänger von Stufe II stützen die Annahme, dass der I/R-Schaden keine unmittelbaren Auswirkungen auf die gemessenen Marker antigen-abhängiger Immunantwort hat. Im FACS wurde die Expression der lymphozytenassoziierten Antigene CD3, CD4 und CD25 auf Leukozyten aus Milz, Blut, Lymphknoten und Transplantat untersucht. Bei Vorliegen einer Doppelsexpression von CD4+CD25+ wurde die gemessene Zelle als Treg angesehen. Die Frequenzen CD3+ bzw. CD4+ T-Zellsubpopulationen der Milz wiesen im Vergleich der Gruppen (~20 min vs. 6 h Ischämie) keine relevant erscheinenden Unterschiede auf. Insbesondere in der Frequenz regulatorischer T-Zellen, die allgemein als kritisch für die Toleranzinduktion gesehen werden, zeigte sich kein signifikanter Unterschied. Die Treg-Frequenzen der Empfänger von Stufe I blieben von der

Differenz der Ischämiezeiten unbeeinflusst. Dieses Ergebnis deckt sich mit einer älteren Untersuchung: Im Rahmen von Phase II-Studien mit der CTLA4-Ig-Variante LEA29Y wurden keine messbaren Veränderungen bei Anzahl und Aktivität regulatorischer T-Zellen beobachtet (132). Weder bei LEA29Y-Patienten noch bei gesunden Kontroll- oder Patienten mit rheumatoider Arthritis wurden Zelldepletierungen festgestellt (133).

Beim Vergleich mit dieser Arbeit muss jedoch die hinreichende Genauigkeit der verwendeten Treg-Marker kritisch beurteilt werden. Wie Yi et al. feststellen, sind gegenwärtig keine Oberflächenantigene bekannt, die exklusiv von regulatorischen T-Zellen exprimiert werden (134). Auch der zwischenzeitlich etablierte intrazelluläre Marker Foxp3 wird nicht exklusiv von CD4+CD25+ Tregs synthetisiert. Zudem scheint die Gruppe toleranzrelevanter regulatorischer T-Zellen nicht auf CD25+ T-Zellen beschränkt. Auch für CD4+CD25- T-Zellen wurden immunregulierende Wirkungen nachgewiesen, wenn auch von ca. 10fach geringerer Potenz (135). Zwischenzeitlich wurden regulatorische Wirkungen unterschiedlichen Ausmaßes bei fast allen T-Zellklassen beobachtet. So umfasst die Klasse regulatorischer T-Zellen im weiteren Sinne mittlerweile auch CD4+, CD8+, und CD4-CD8- T-Zellen (136). Die alleinige Verwendung des Markers CD25 erscheint demnach unzureichend und wurde zwischenzeitlich bei den meisten Autoren ergänzt um den Nachweis des Forkhead/winged-helix Family Transcriptional Repressor p3 (Foxp3). Einen weiteren Aspekt einer eventuell eingeschränkten Aussagekraft der vorliegenden Ergebnisse bezüglich Tregs liefern Hoffmann und Kollegen. Deren Ergebnisse lassen vermuten, dass im Rattenmodell vor allem naive CD45RA+CD25+ T-Zellen verantwortlich sind für die Expansion regulatorischer Zellen nach Allotransplantation (137). Im Rahmen dieser Arbeit können qualitative und quantitative Unterschiede in derartigen T-Zellpopulationen vorgekommen sein, die durch die gemachten Messungen nicht erfasst wurden. Da die CTLA4-Ig-Behandlung Überleben und Transplantatfunktion erfolgreich steigerte, ist denkbar dass eine nicht identifizierte Population regulatorischer T-Zellen hierfür verantwortlich war.

Auch die relativen T-Zell-Frequenzen der Transfersuspension, ließen keine signifikanten Unterschiede in der antigen-abhängigen Immunantwort erkennen. Unabhängig vom Ursprung der adoptiv transferierten Leukozyten waren die T-Zellsubpopulationen in den Organen der Empfänger von Stufe II tendenziell identisch. Lediglich der absolute Anteil CD3+ Zellen an der Gesamtleukozytenpopulation war in Gruppe II/2 tendenziell geringer. Isoliert erhöhte Frequenzen von Tregs fanden sich interessanterweise in zwei Or-

gangruppen (Lymphknoten und Transplantate) der Empfängergruppe II/2. Angesichts der geringen Tierzahl und der Beschränkung auf zwei Kompartimente ist dieser Unterschied jedoch nicht belastbar. Eine eingehende Untersuchung mit erhöhter Tierzahl erscheint hier angeraten.

Der absolut erhöhten Zahl CD3+T-Zellen entsprechend fand sich in Gruppe II/2 ein einheitlich erhöhtes Syntheseniveau der CD3+T-Zell-Zytokine IL-4, IL-6 und IL-10. Diese einheitlichen Niveaus erlauben keine Schlüsse auf qualitative Unterschiede in der antigen-abhängigen Immunantwort zwischen den Versuchsgruppen. Insbesondere, da die Muster der Zytokinexpression bei Abstoßung und auch bei Toleranzentwicklung bisher nur unzureichend beschrieben sind. Erhalten T-Zellen die aktivierenden Signale 1 und 2, setzt sich die Signalkaskade in Richtung Abstoßung fort: CD4+ T-Zellen (TH1- und TH2) und CD8+ T-Zellen (sowie NK-Zellen) synthetisieren und sezernieren spezifische Zytokine, bzw. schütten diese aus. Bei der Alloantigenabstoßung kommen Interferon Gamma (IFN- γ) und den Interleukinen 2, 4, 5 und 10 (IL-2, 4, 5, 10) besondere Bedeutung zu (47). Dabei ist das genaue Muster der Expression abhängig vom Subtyp der aktivierten CD4+ T-Zelle (TH1- oder TH2-Helferzelle): TH1-Zellen unterstützen die zelluläre Abstoßung durch Sekretion von INF- γ und IL-2, einem parakrinen Wachstums- und Differenzierungsfaktor. TH2-Zellen fördern vorwiegend die humorale Abwehr durch Sekretion von IL-4, IL-5 und IL-10 (138). Hingegen ist kaum bekannt, welche Zytokine im Verlauf der Toleranzentwicklung von Bedeutung sind. Die Ergebnisse verschiedener Tierversuche lassen annehmen, dass eine verminderte TH1-Antwort Bestandteil einer Toleranzinduktion ist (139, 140, 141, 142). Andere Arbeiten zeigten eine gleichzeitig stattfindende Hochregulierung der TH2-Antwort (143, 144). Hall und Kollegen gelang außerdem der Nachweis, dass die Expansion CD4+CD25+ T-Zellen, unabhängig vom Expressionsniveau an IL-4, IL-5 und TGF- β ist (145, 146). Insofern erscheinen die hier gefundenen vergleichbaren Syntheseniveaus von IL-4 und IL-5 in den Versuchsgruppen trotz qualitativer Unterschiede der Transplantatfunktion plausibel.

Eine hemmende Wirkung auf die Ausbildung einer Allotoleranz wurde für TNF- α nachgewiesen. TNF- α fördert die Reifung Dendritischer Zellen, die nur in unreifer Form CD4+CD25+ T-Zellen zur Ausbildung tolerogener Reaktionen stimulieren können. Eine Blockade des TNF- α -Rezeptors führte im Mausmodell zur Steigerung der Expansion suppressiver Tregs durch Vermittlung unreifer DC (147). Umgekehrt konnte in dieser Arbeit kein erhöhtes Expressionsniveau von TNF- α im Rahmen einer Abstoßung nach-

gewiesen werden. Hinweise auf eine Indikatoreigenschaft zur Abschätzung der Immunantwort liegen für TNF- α damit nicht vor und lassen sich auch auf Grundlage der vorliegenden Ergebnisse nicht vermuten.

Einen tendenziellen Unterschied wies die T-Zellalloreaktivität in den Gruppen II/1 und II/2 auf. Relativ zur Anzahl gefundener T-Zellen fand sich im ELISPOT ein erhöhter Anteil INF- γ produzierender T-Zellen bei Gruppe II/2. Synthese von INF- γ wird als reliabler Indikator antigen-abhängiger T-Zellaktivierung angesehen. Entsprechend ist in Gruppe II/2 von einer stärkeren T-zellvermittelten Abstoßung als in Gruppe II/1 auszugehen. Mangels Signifikanz und zusätzlicher qualitativer Marker bietet dieser Unterschied keine ausreichende Basis zur Erörterung möglicher Ursachen. Gleiches gilt für die FACS-Analyse der Dendritischen Zellen. Die ermittelten Frequenzen DC-assoziiierter Antigene (OX62, MHC II, CD86) erlauben keine Rückschlüsse auf etwaige Unterschiede bei Aktivität und Häufigkeit der DC zwischen den Gruppen der Stufe II. Zwar fand sich eine tendenziell höhere absolute Anzahl aktivierter, vom Spender stammender DC in Gruppe II/2, statistische Signifikanz erreichte sie jedoch nicht.

Insgesamt lassen die Untersuchungsergebnisse keinen Unterschied in der antigen-abhängigen Immunantwort zwischen den Gruppen der Stufe II annehmen. Für die Immunantwort sowohl der T-Zellen als auch der DC scheint es bedeutungslos, ob ein Empfänger der Stufe II vor Transplantation Leukozyten eines Empfängers mit kurzer oder verlängerter Ischämie erhielt. Einen belastbaren Grund zur Annahme, ein solcher Unterschied läge deshalb auch nicht vor, bieten diese Ergebnisse deshalb aber nicht. Einerseits liefert die geringe Gruppengröße der Stufe II nicht die Voraussetzungen für eine statistische Signifikanz. Vor allem aber wurden zwischenzeitlich neue, wesentliche Identifikationsmerkmale regulatorischer T-Zellen beschrieben. Die alleinige Doppelexpression der Antigene CD4⁺ und CD25⁺ kann daher nicht mehr als hinreichend genauer Marker toleranzrelevanter Tregs gesehen werden. Zukünftige Messungen erfordern zumindest den ergänzenden Nachweis des intrazellulären Foxp3 (148).

Trotz unzureichender Diskriminationsstärke lässt die vorgefundene Homogenität der T-Zellfrequenzen annehmen, dass zu vermutende Unterschiede der antigen-abhängigen Immunantwort begrenzt sind auf spezifische Subpopulationen CD3⁺ T-Zellen. Eine verlängerte Ischämie scheint nicht in der Lage, das relative Gesamtniveau CD4⁺CD25⁺ T-Zellen oder den alloantigenspezifischen Aktivierungsgrad CD3⁺ Zellen zu beeinflussen. Auch scheint der Anteil spendereigener, aktivierter DC im Empfänger nach einmal indu-

zierter Toleranz unabhängig von der Länge einer Ischämiezeit der Spenderleukozyten (respektive des Transplantats). Weiterführende Untersuchungen dieser Zusammenhänge sollten der Rolle regulatorischer T-Zellen, die nicht durch CD25-Expression gekennzeichnet sind, besondere Aufmerksamkeit schenken.

Die eingangs gestellten Fragen können schlussendlich wie folgt beantwortet werden:

1. Ein vergrößerter Ischämie-Reperfusionsschaden ist nicht in der Lage, die tolerogene Wirkung einer Empfängerbehandlung mit CTLA4-Ig auf Transplantatfunktion, Empfängerüberleben und histomorphologische Veränderungen nachteilig zu beeinflussen.
2. Nach adoptivem Transfer zeigen die Frequenzen toleranzrelevanter (insbesondere CD4+CD25+) T-Zellen und aktivierter, spendereigener Dendritischer Zellen sowie der Aktivierungsgrad alloantigen-spezifischer CD3+ T-Zellen keine negative Beeinflussung durch eine verlängerte Ischämie des Leukozytenspenders.

6. Zusammenfassung

Die Transplantation ist Therapie der Wahl terminaler Niereninsuffizienz. Trotz guter Einjahresraten ist die Langzeitfunktion der Transplantate jedoch unbefriedigend. Hauptursache hierfür ist die chronische Allograftnephropathie (CAN). Sie ist einerseits bedingt durch antigen-abhängige Immunreaktionen (akute und chronische Abstoßung); andererseits durch antigen-unabhängige Faktoren, wie den Ischämie-Reperfusionsschaden (I/R-Schaden). Zur definitiven Therapie antigen-abhängiger Faktoren wird langfristig die Induktion einer Transplantattoleranz angestrebt. Ein im Tiermodell vielversprechendes Modell hierfür ist der Einsatz monoklonaler Antikörper wie CTLA4-Ig. Unabhängig von einer eventuell erreichbaren Toleranzinduktion bliebe der I/R-Schaden als antigen-unabhängiger Faktor bestehen. Seine mögliche Interaktion mit einer Toleranzinduktion durch CTLA4-Ig und dessen Folgen für Transplantatfunktion und Empfängerüberleben sind bisher nicht beschrieben.

Die vorliegende Arbeit untersucht den Einfluss verlängerter Ischämie auf die Nierentransplantatfunktion und die antigen-abhängige Immunantwort nach Empfängerbehandlung mit CTLA4-Ig. Im etablierten DA→Lewis Tiermodell starker Histoinkompatibilität (akutes Abstoßungsmodell), wurde ein zweistufiger Versuch durchgeführt: In Stufe I erhielten zwei Empfängergruppen Transplantate nach kurzer oder verlängerter Kaltischämie (~20 min vs. 6 h). Beide Gruppen erhielten zur Toleranzinduktion eine Einzeldosis CTLA4-Ig. Nach 100 Tagen Beobachtungszeit wurden sie geopfert und ihre Leukozyten adoptiv auf neue Empfänger übertragen (Stufe II). Die Empfänger der Stufe II erhielten anschließend neue Transplantate mit einheitlich kurzer Ischämie (~20 min). Ihr alleiniger Unterschied bestand im Gruppenursprung der Spenderleukozyten. Nach einer Beobachtungszeit von 20 Tagen wurden die Tiere der Stufe II ebenfalls getötet.

In Stufe I wurden das Empfängerüberleben und die Transplantatfunktion anhand von Proteinurie und Kreatinin-Clearance ausgewertet. Am Ende der Beobachtungszeit wurden die Ersttransplantate histomorphologisch sowie immunhistochemisch hinsichtlich der Expression der Antigene CD4, CD8, und CD25, sowie ED1, OX62 und OX3 untersucht. Zusätzlich wurden T-Zellfrequenzen (CD3+, CD4+) und Frequenzen regulatorischer T-Zellen (CD4+, CD25+) in den transfuzierten Milzzellsuspensionen durchflusszytometrisch bestimmt.

Am Ende des zweiten Beobachtungszeitraumes wurden die Frequenzen von T-Zellen (CD3+, CD4+, CD25+) und DC (OX62+, CD86+, MHC II+) in den Transplantaten sowie peripher in Blut, Milz und Lymphknoten der Empfänger durchflusszytometrisch bestimmt. Eine Unterscheidung von Spender- und Empfänger-APC erfolgte mittels RT1A^{ab}, einem spezifischen Antigen gegen MHC Klasse II (Haplotyp RT1^a) auf Zellen des DA-Spenderstammes. In FACS-Mehrfachfärbungen wurden insbesondere die Frequenzunterschiede regulatorischer T-Zellen (doppelt positiv: CD4+CD25+) und aktivierter Spender-DC (dreifach positiv: OX62+RT1A^{ab}+CD86 oder OX62+RT1A^{ab}+MHC II) ermittelt. Als Indikator der Alloreaktivität wurde die IFN- γ -Synthese CD3+T-Zellen im ELISPOT untersucht. Zur Charakterisierung der T-Zellaktivität (Aktivierung vs. Anergie) wurde zudem die Expression der Zytokine IL-4, IL-6, IL-10 und TNF- α im ELISA gemessen.

Lediglich 34% der Versuchstiere von Stufe I überlebten den Beobachtungszeitraum von 100 Tagen. Unerwarteterweise war das Überleben der Empfänger von Transplantaten verlängerter Ischämie signifikant besser als das der Empfänger nach kurzer Ischämie (63,6% vs. 16,7%). Gleichzeitig waren sowohl die Funktionsparameter als auch der histomorphologische Organzustand in der Transplantatgruppe verlängerter Ischämie tendenziell besser, als in der kurzer Ischämie. Signifikante Unterschiede der Frequenzen der T-Zellsubpopulationen und der DC zeigten sich zwischen keinen Gruppen; weder in den Transfersuspensionen (Stufe I) noch in den Organen der Zweitempfänger (Stufe II). Die relativen Frequenzen waren in beiden Gruppen beider Stufen vergleichbar und blieben von einer verlängerten Ischämie unbeeinflusst (~20 min vs. 6 h). Lediglich die absolute Anzahl CD3+ T-Zellen war nach Zweittransplantation (Stufe II) in Gruppe II/2 tendenziell erhöht. Diese Tiere erhielten zuvor Spenderleukozyten von Erstempfängern eines Organs mit verlängerter Ischämie. Auch T-Zell-Alloreaktivität (ELISPOT) und die Zytokinmuster (ELISA) zeigten keine qualitativen Unterschiede zwischen den einzelnen Gruppen der beiden Stufen.

In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass eine verlängerte Ischämie keinen nachteiligen Einfluss auf Transplantatfunktion und Überleben nach Empfängerbehandlung mit CTLA4-Ig bei der Nierentransplantation hat. Ein Einfluss auf die Frequenzen und Aktivierungsgrade von CD3+ T-Zellen und Dendritischen Zellen, als Kenngrößen antigen-abhängiger Immunantwort, konnte nicht festgestellt werden.

7. Literaturverzeichnis

1. Morris PJ. Medical History: Transplantation - A Medical Miracle of the 20th Century. *N Engl J Med* 2004;19;351:2678-80
2. Vollmar AM, Gerbes AL. Historie und Status quo der Transplantationsmedizin. *Pharm Unserer Zeit* 2005;34:262-7
3. Kwon OJ, Kwak JY, Kang CM. The Impact of Gender and Age Matching for Long-Term Graft Survival in Living Donor Renal Transplantation. *Transplant Proc* 2005;37:720-28
4. Annual Report 2005. Leiden, The Netherlands: Eurotransplant International Foundation, 2005. (Accessed September 19, 2006, at http://www.eurotransplant.nl/files/annual_report/AR2005.pdf)
5. Schulak JA. What's New In General Surgery: Transplantation. *J Am Coll Surg* 2005;200:409-417
6. 2005 OPTN/SRTR Annual Report. Michigan, USA: US Transplant – Scientific Registry of Transplant Recipients. (Accessed September 19, 2006, at http://www.ustransplant.org/annual_reports/current/survival_rates.htm)
7. Wolfe RA, Ashby VB, Milford EL, Ojo AO, Ettenger RE, Agodoa LY, Held PJ, Port FK. Comparison of mortality in all patients on dialysis, patients on dialysis awaiting transplantation, and recipients of a first cadaveric transplant. *N Engl J Med* 1999;341:1725-30
8. Jofre R, Lopez-Gomez JM, Moreno F et al. Changes in quality of life after renal transplantation. *Am J Kidney Dis* 1998;32:93-100
9. Whiting JF, Woodward RS, Zavala EY et al. Economic cost of expanded criteria donors in cadaveric renal transplantation: analysis of Medicare payments. *Transplantation* 2000;70:755-60
10. Ekberg H, Tedesco-Silva H, Demirbas A et al. Reduced Exposure to Calcineurin Inhibitors in Renal Transplantation. *N Engl J Med* 2007;357:25
11. Meier-Kriesche HU, Schold JD, Kaplan B. Long-Term Renal Allograft Survival: Have we Made Significant Progress or is it Time to Rethink our Analytical and Therapeutic Strategies? *Am J Transplant* 2004;4:1289-95

12. Couslon MT, Jablonski P, Howden BO et al. Beyond Operational Tolerance: Effect of Ischemic Injury on Development of Chronic Damage in Renal Grafts. *Transplantation* 2005;80(3):353-61
13. Tullius SG, Volk HD, Neuhaus P. Transplantation of Organs from Marginal Donors. *Transplantation* 2001;72:1341-49
14. Martins PNA, Pratschke J, Pascher A. Age and Immune Response in Organ Transplantation. *Transplantation* 2005;79:127-32
15. Lechler RI, Sykes M, Thomson AW et al. Organ Transplantation – how much of the promise has been realized? *Nature medicine* 2005;11:605-13
16. Zhang R, Kumar P, Ramcharan T et al. Kidney Transplantation: The Evolving Challenges. *Am J Med Sci* 2004;328:156-61
17. Cornell LD, Colvin RB. Chronic allograft nephropathy. *Curr Opin Nephrol Hypertens* 2006;14:229-34
18. Nankivell BJ, Chapman JR. Chronic Allograft Nephropathy: Current Concepts and Future Directions. *Transplantation* 2006;81:643-54
19. Solez K, Vincenti F, Filo RS. Histopathologic findings from 2-year protocol biopsies from a U.S. multicenter kidney transplant trial comparing tacrolimus versus cyclosporine: a report of the FK506 Kidney Transplant Study Group. *Transplantation* 1998;66:1736
20. Nankivell BJ, Borrows RJ, Fung CL et al. Delta analysis of posttransplantation tubulointerstitial damage. *Transplantation* 2004;78:434
21. Nankivell BJ, Borrows RJ, Fung CL et al. The natural history of chronic allograft nephropathy. *N Engl J Med* 2003;349:2326
22. Cosio FG, Pelletier RP, Sedmak DD et al. Pathologic classification of chronic allograft nephropathy: pathogenic and prognostic implications. *Transplantation* 1999;67:690
23. Pratschke J, Neuhaus P, Tullius SG. What can be learned from brain-death models? *Transpl Int* 2005;18:15-21
24. Bolton EM, Gracie JA, Briggs JD et al. Cellular requirements for renal allograft rejection in the athymic nude rat. *J Exp Med* 1989;169:1931-46

25. Lederberg S. Genes and Antibodies. *Science* 1959;129:1649-53
26. Rothstein DM, Sayegh MH. T-cell costimulatory pathways in allograft rejection and tolerance. *Immunol Rev* 2003;196:85
27. Marrack P, Kappler J. The T cell receptor. *Science* 1987;238:1073-9
28. Davis MM, Boniface JJ, Reich Z et al. Ligand recognition by alpha beta T cell receptors. *Annu Rev Immunol* 1998;16:523-44
29. Page DM, Kane LP, Allison JP et al. Two signals are required for negative selection of CD4+CD8+ thymocytes. *J Immunol* 1993;15:1868
30. Linsley PS, Clark EA, Ledbetter JA. T-cell antigen CD28 mediates adhesion with B cells by interacting with activation antigen B7/BB-1. *Proc Natl Acad Sci USA* 1990;87:5031-5
31. Sayegh MH, Akalin E, Hancock WW et al. CD28-B7 blockade after alloantigenic challenge in vivo inhibits Th1 cytokines but spares Th2. *J Exp Med* 1995;181:1869-74
32. Lenschow DJ, Walunas TL, Bluestone JA. CD28/B7 system of T cell costimulation. *Annu Rev Immunol* 1996;14:233-58
33. Jenkins MK, Taylor PS, Norton SD et al. CD28 delivers a costimulatory signal involved in antigen-specific IL-2 production by human T cells. *J Immunol* 1991;147:2461
34. Alegre ML, Frauwirth KA, Thompson CB. T-cell regulation by CD28 and CTLA-4. *Nat Rev Immunol* 2001;1:220-28
35. Orabona C, Grohmann U, Belladonna ML et al. CD28 induces immunostimulatory signals in dendritic cells via CD80 and CD86. *Nat Immunol* 2004;5:1134-42
36. Linsley PS, Brady W, Urnes M, et al. CTLA-4 is a second receptor for the B cell activation antigen B7. *J Exp Med* 1991;174:561
37. Greenwald RJ, Freeman GJ, Sharpe AH. The B7 Family Revisited. *Annu Rev Immunol* 2005;23:515-48
38. Krummel MF, Allison JP. CD28 and CTLA-4 have opposing effects on the response of T cells to stimulation. *J Exp Med* 1995;182:459-65

39. Chambers CA, Kuhns MS, Allison JP. Cytotoxic T lymphocyte antigen-4 (CTLA-4) regulates primary and secondary peptidespecific CD4(+) T cell responses. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999;96:8603-8
40. Munn DH, Sharma MD, Mellor AL. Ligation of B7-1/B7-2 by human CD4+ T cells triggers indoleamine 2,3-dioxygenase activity in dendritic cells. *J Immunol* 2004;172:4100-10
41. Tang Q, Henriksen KJ, Boden EK et al. Cutting edge: CD28 controls peripheral homeostasis of CD4+CD25+ regulatory T cells. *J Immunol* 2003;171:3348-52
42. Boden EK, Tang Q, Bour-Jordan H et al. The role of CD28 and CTLA4 in the function and homeostasis of CD4+CD25+ regulatory T cells. *Novartis Found Symp* 2003;25:206-14
43. Sakaguchi S, Sakaguchi N, Asano M et al. Immunologic selftolerance maintained by activated T cells expressing IL-2 receptor alphachains (CD25). Breakdown of a single mechanism of self-tolerance causes various autoimmune diseases. *J Immunol* 1995;155:1151-64
44. Itoh M, Takahashi T, Sakaguchi N et al. Thymus and autoimmunity: production of CD25+CD4+ naturally anergic and suppressive T cells as a key function of the thymus in maintaining immunologic self-tolerance. *J Immunol* 1999;162:5317-26
45. Zhang Y, Liu C, Yang X et al. Role and mechanisms of CD4+CD25+ regulatory T cells in the induction and maintenance of transplantation tolerance. *Transplant Immunol* 2007;17:120-29
46. Yamada A, Chandraker A, Laufer TM et al. Recipient MHC class II expression is required to achieve long-term survival of murine cardiac allografts after costimulatory blockade. *J Immunol* 2001;167:5522-6
47. Hollander GA, Zuklys S, Forester E et al. On costimulatory signals and T cell tolerance: relevance for transplantation immunity. *Transplant Proc.* 1999; 31(1-2a)
48. Austrup F, Vestweber D, Borges E et al. P- and E-selectin mediate recruitment of T-helper-1 but not T-helper-2 cells into inflamed tissues. *Nature* 1997;385:81-3
49. Lederer JA, Liou JS, Kim S et al. Regulation of NF-kappa B activation in T helper 1 and T helper 2 cells. *J Immunol* 1996;156:56-63

50. Qin SX, Wise M, Cobbold SP et al. Induction of tolerance in peripheral T cells with monoclonal antibodies. *Eur J Immunol* 1990;20:2737-45
51. Qin S, Cobbold SP, Pope H et al. Infectious transplantation tolerance. *Science* 1993;259:974-77
52. Benjamin RJ, Waldmann H. Induction of tolerance by monoclonal antibody therapy. *Nature* 1986;320:449-51
53. Benjamin RJ, Qin SX, Wise MP et al. Mechanisms of monoclonal antibody-facilitated tolerance induction: a possible role for the CD4 (L3T4) and CD11a (LFA-1) molecules in self-non-self discrimination. *Eur J Immunol* 1988;18:1079-88
54. Lenschow DJ, Zeng Y, Thistlethwaite JR et al. Long-term survival of xenogeneic pancreatic islet grafts induced by CTLA4Ig. *Science* 1992;257:789
55. Linsley PS, Wallace PM, Johnson J et al. Immunosuppression in vivo by a soluble form of the CTLA-4 T cell activation molecule. *Science* 1992;257:792
56. Larsen CP, Elwood ET, Alexander DZ, et al. Long-term acceptance of skin and cardiac allografts after blocking CD40 and CD28 pathways. *Nature* 1996;381:434
57. Graca L, Waldmann H. Reprogramming the Immune System Using Antibodies. *Methods Mol Biol* 2006;333:247-67
58. Azuma H, Chandraker A, Nadeau K et al. Blockade of T-cell costimulation prevents development of experimental chronic renal allograft rejection. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996;93:12439-44
59. Chandraker A, Azuma H, Nadeau K et al. Late blockade of T cell costimulation interrupts progression of experimental chronic allograft rejection. *J Clin Invest* 1998;101:2309-18
60. Levisetti MG, Padrid PA, Szot GL et al. Immunosuppressive effects of human CTLA4Ig in a non-human primate model of allogeneic pancreatic islet transplantation. *J Immunol* 1997;159:5187-91
61. Birsan T, Hausen B, Higgins JP et al. Treatment with humanized monoclonal antibodies against CD80 and CD86 combined with sirolimus prolongs renal allograft survival in cynomolgus monkeys. *Transplantation* 2003;75:2106-13

62. Abrams JR, Lebowitz MG, Guzzo CA et al. CTLA4Ig-mediated blockade of T-cell costimulation in patients with psoriasis vulgaris. *J Clin Invest* 1999;103:1243–52
63. Abrams JR, Kelley SL, Hayes E et al. Blockade of T lymphocyte costimulation with cytotoxic T lymphocyte-associated antigen 4-immunoglobulin (CTLA4Ig) reverses the cellular pathology of psoriatic plaques, including the activation of keratinocytes, dendritic cells, and endothelial cells. *J Exp Med* 2000;192:681-94
64. Laskowski IA, Pratschke J, Wilhelm MJ et al. Anti-CD28 monoclonal antibody therapy prevents chronic rejection of renal allografts in rats. *J Am Soc Nephrol* 2002;13:519-27
65. Haspot F, Seveno C, Dugast AS et al. Anti-CD28 antibody-induced kidney allograft tolerance related to tryptophan degradation and TCR class II B7 regulatory cells. *Am J Transplant* 2005;5:2339-48
66. Vincenti F. What's in the pipeline? New immunosuppressive drugs in transplantation. *Am J Transplant* 2002;2:898-903
67. Larsen CP, Pearson TC, Adams AB et al. Rational development of LEA29Y (belatacept), a high-affinity variant of CTLA4-Ig with potent immunosuppressive properties. *Am J Transplant* 2005;5:443-53
68. Vincenti F, Larsen C, Durrbach A et al. Costimulation blockade with belatacept in renal transplantation. *N Engl J Med* 2005;353:770-81
69. Perico N, Cattaneo D, Sayegh MH, et al. Delayed graft function in kidney transplantation. *Lancet* 2004;364:1814-27
70. Edelstein CL, Ling H, Schrier RW. The nature of cell injury. *Kidney Int* 1997;51:1341-51
71. Shoskes DA, Xie Y, Gonzales-Cadavid NF. Nitric oxide synthetase activity in renal ischemia-reperfusion injury in the rat: implications for renal transplantation. *Transplantation* 1997;63:495-500
72. Lemos FBC, Ijzermans JNM, Zondervan PE et al. Differential expression of heme oxygenase-1 and vascular endothelial growth factor in cadaveric and living donor kidneys after ischemia-reperfusion. *J Am Soc Nephrol* 2003;14:3278-87

73. Haugen E, Nath KA. The involvement of oxidative stress in the progression of renal injury. *Blood Purif* 1999;17:58-65
74. Castaneda PM, Swiatecka-Urban A, Mitsnefers MM, et al. Activation of mitochondrial apoptotic pathways in human renal allografts after ischemia-reperfusion injury. *Transplantation* 2003;76:50-54
75. DeVries ME, Hosiawa KA, Cameron CM, et al. The role of chemokines and chemokine receptors in alloantigen-independent and alloantigen-dependent transplantation injury. *Sem Immunol* 2003;15:33-48
76. Chandrasekar B, Smith JB, Freeman GL. Ischemia-Reperfusion of rat myocardium activates nuclear factor-kappaB and induces neutrophil infiltration via lipopolysaccharide-induced CXC chemokine. *Circulation* 2001;103:2296-02
77. Sekido N, Mukaida N, Harada A, et al. Prevention of lung reperfusion injury in rabbits by a monoclonal antibody against interleukin-8. *Nature* 1993;365:654-57
78. Hoffmann SC, Kampen RL, Amur S, et al. Molecular and immunohistochemical characterization of the onset and resolution of human renal allograft ischemia-reperfusion injury. *Transplantation* 2002;74:916-23
79. Springer TA. Traffic signals for lymphocyte recirculation and leukocyte migration: the multistep paradigm. *Cell* 1994;76:301-14
80. Farhood A, McGuirre GM, Manning AM, et al. Intracellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) expression and its role in neutrophil induced ischemia-reperfusion injury in rat liver. *J Leuk Biol* 1995;57:368-74
81. Kelly KJ, Williams W, Colvin RB, et al. Antibody to intracellular adhesion molecule 1 protects the kidney against ischemic injury. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994;91:812 -16
82. Dragun D, Lukitsh I, Tullius SG, et al. Inhibition of intracellular adhesion molecule-1 with antisense deoxynucleotides prolongs renal isograft survival in the rat. *Kidney Int* 1998;2113-22
83. Schlichting CL, Schareck WD, Weis M. Renal ischemia-reperfusion injury: new implications of dendritic cell-endothelial cell interactions. *Transplant Proc* 2006;38:670-3

84. Alejandro V, Scandling JD, Sibley RK, et al. Mechanisms of filtration failure during postischemic injury of the human kidney. A study of the reperfused renal allograft. *J Clin Invest* 1995;95:820-31
85. Finn WF, Hak LJ, Grossmann SH. Protective effect of prostacyclin on postischemic acute renal failure in the rat. *Kidney Int* 1987;32:479-87
86. Wilhelm SM, Simonson MS, Robinson AV, et al. Endothelin up-regulation and localization following renal ischemia and reperfusion. *Kidney Int* 1999;55:1011-18
87. Inman SR, Plott WK, Pomilee RA, et al. Endothelin-receptor blockage mitigates the adverse effect of preretrieval warm ischemia on posttransplantation renal function in rats. *Transplantation* 2003;75:1655-59
88. Fisher B, Lee S. Microvascular surgical techniques in research, with special references to renal transplantation in the rat. *Surgery* 1965;58:904-14
89. Pahlavan PS, Smallegange C, Adams MA et al. Kidney Transplantation Procedures In Rats: Assessments, Complications, and Management. *Microsurgery* 2006. Published online 16 June 2006 at www.interscience.wiley.com. DOI 10.1002/micr.20260
90. Zimmermann FA, Butcher GW, Davies HS et al. Techniques for orthotopic liver transplantation in the rat and some studies of the immunologic responses to fully allogenic liver grafts. *Transplant Proc* 1979;11:571
91. Günter E, Walter L. The major histocompatibility complex of the rat (*Rattus norvegicus*). *Immunogenetics* 2001; 53:520-42
92. Davidson TS, Longnecker DS, Hickey WF. An Experimental Model of Autoimmune Pancreatitis in the Rat. *Am J Pathol* 2005;166:729-36
93. Choi HK, Stowe N, Novick AC. Comparison of end-to-end and telescoped arterial anastomoses in renal transplantation in rats. *J Microsurg* 1981;3:85-88
94. Savas CP, Nolan MS, Lindsey NJ et al. Renal transplantation in the rat - a new simple, non-suture technique. *Urol Res* 1985;13:91-93
95. Schumacher M, Van Vliet BN, Ferrari P. Kidney transplantation in rats: an appraisal of surgical techniques and outcome. *Microsurgery* 2003;23:387-394

96. Vogt P. Mikrochirurgische Transplantationsmodelle bei der Ratte. Dtsch tierärztl Wschr 1987;95:257
97. Weight SC, Furness PN, Nicholson ML. New model of renal warm ischemia-reperfusion injury for comparative functional, morphological and pathophysiological studies. Br J Surg 1998;85:1669-73
98. Lee S. An improved technique of renal transplantation in the rat. Surgery 1967;61:771-73
99. Osterwitz H, Althaus P, May G et al. Microvascular surgery in experimental and clinical kidney transplantation. Int Urol Nephrol 1983;15:347-57
100. Luxton RW, Patel P, Keir G et al. A micro method for measuring total protein in cerebrospinal fluid by using benzethonium chloride in microtiter plate wells. Clin Chem 1989;35:1731-34
101. Joint Working Group of Refinement of the BVA/FRAME/RSPCA/UFAW 1993: Removal of Blood from Laboratory Mammals and Birds. Laboratory Animals 1993;27:1-22
102. Bartels H, Bohmer M, Heierli C. Serum creatinine determination without protein precipitation Clin Chem Acta 1972;37:193-97
103. Racusen LC, Solez K, Colvin RB et al. The Banff 97 working classification renal allograft pathology. Kidney Int 1999;55:713-23
104. Tanaka T, Kyo M, Kokado Y et al. Correlation between the Banff 97 classification of renal allograft biopsies and clinical outcome. Transpl Int 2004;17:59-64
105. Cordell JL, Falini B, Erber WW et al. Immunoenzymatic labelling of monoclonal antibodies using immune complexes of alkaline phosphatase and monoclonal anti-alkaline phosphatase (APAAP complexes). J Histochem Cytochem 1984;32:219-29
106. Hulett HR, Bonner WA, Barrett J et al. Cell sorting: Automated separation of mammalian cells as a function of intracellular fluorescence. Science 1969;166:747-49
107. Bonner WA, Hulett HR, Sweet RG et al: Fluorescence activated cell sorting. Rev Sci Instrum 1972;43:404-9

108. Czerkinsky CC, Andersson G, Ekre HP et al. Reverse ELISPOT assay for clonal analysis of cytokine production I. Enumeration of gamma-interferone-secreting cells. *J Immunol Methods* 1988;110:29–36.
109. Cox JH, Ferrari G, Janetzki S. Measurement of cytokine release at the single cell level using the ELISPOT-Assay. *Methods* 2006;38:274-82
110. Valujskikh A, Heeger P. Enzyme-linked immunosorbent spot (ELISPOT) assay for detection of alloreactive cytokine-reacting cells-detailed methods. *Graft* 2001;4:195
111. Kaplan EL, Meier P. Nonparametric estimation from incomplete observations. *J Am Stat Ass* 1958;53:457-81
112. Parmar MK, Machin D. *Survival analysis – a practical approach* John Wiley & Sons, Chichester, New York 1995
113. Mann HB, Whitney DR. On a test of whether one of two random variables is stochastically larger than the other. *Ann Math Statist* 1947;18:50-60
114. Diamond JR, Tilney NL, Frye J, et al. Progressive albuminuria and glomerulosclerosis in a rat model of renal allograft rejection. *Transplantation* 1992;54:710
115. Letsch A, Scheibenbogen C. Quantification and characterization of specific T-cells by antigen-specific cytokine production using ELISPOT assay or intracellular cytokine staining. *Methods* 2003;31:143-9
116. Young JW, Merad M, Hart DNJ. Dendritic Cells in Transplantation and Immune-Based Therapies. *Biol Blood Marrow Transplant* 2007;13:23-32
117. Kim YS, Yang SH, Kang HG et al. Distinctive role of donor strain immature dendritic cells in the creation of allograft tolerance. *Int Immunol* 2006;18:1771-7
118. Tullius SG, Lehmann M, Reutzel-Selke A et al. The allograft by itself induces regulatory T cells - immunosuppression needs to spare this mechanism to induce tolerance. 2007; unveröffentlicht
119. Zheng SG, Wang JH, Gray JD et al. Natural and Induced CD4+CD25+ Cells Educate CD4+CD25- Cells to Develop Suppressive Activity: The Role of IL-2, TGF- β , and IL-10. *J Immunol* 2004;172:5213–21

120. Graca L, Cobbold SP, Waldmann H. Identification of regulatory T cells in tolerated allografts. *J Exp Med* 2002;195:1641–6
121. Bonventre JV, Colvin RB. Adhesion molecules in renal disease. *Curr Opin Nephrol Hypertens* 1996;5:254–61
122. Kim KS, Denton MD, Chandraker A et al. CD28-B7-mediated T cell costimulation in chronic cardiac allograft rejection: Differential role of B7–1 in initiation versus progression of graft arteriosclerosis. *Am J Pathol* 2001;158:977-86
123. Pentcheva-Hoang T, Egen JG, Wojnoonski K et al. B7–1 and B7–2 selectively recruit CTLA-4 and CD28 to the immunological synapse. *Immunity* 2004;21:401-13
124. Hancock WW, Sayegh MH, Zheng XG et al. Costimulatory function and expression of CD40 ligand, CD80, and CD86 in vascularized murine cardiac allograft rejection. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996;93:13967-72
125. Yamada A, Salama AD, Sayegh MH. The role of novel T cell costimulatory pathways in autoimmunity and transplantation. *J Am Soc Nephrol* 2002;13:559
126. Ito T, Ueno T, Clarkson MR et al. Analysis of the Role of Negative T Cell Costimulatory Pathways in CD4 and CD8 T Cell-Mediated Alloimmune Responses in Vivo. *J Immunol* 2005;174:6648-56
127. Kroczeck RA, Mages HW, Hutloff A. Emerging paradigms of T-cell costimulation. *Curr Opin Immunol* 2004;16:321
128. Clarkson MR, Sayegh MH. T-Cell Costimulatory Pathways in Allograft Rejection and Tolerance. *Transplantation* 2005;80:555-63
129. Hartmann. unveröffentlicht
130. Graser E, Risch K, Linsley PS et al. Synergism of CTLA4-IG and Anti-CD4 in a Rat Kidney Transplant Model Monoclonal Antibody Treatment. *Transplant Proc* 1997;29:1307-09
131. Ambros JT, Herrero-Fresneda I, Borau OG. Ischemic preconditioning in solid organ transplantation: from experimental to clinics. *Transplant Int* 2007;20:219–29
132. Hirose K, Posselt AM, Stock PG et al. Treatment of kidney transplant patients with the novel co-stimulatory blocker LEA29Y and anti-IL2 receptor antibody does not impede the development of regulatory T-cells. *Am J Transplant* 2004;4:442

133. Moreland LW, Alten R, Van den Bosch F et al. Costimulatory blockade in patients with rheumatoid arthritis: A pilot, dose-finding, double-blind, placebo-controlled clinical trial evaluating CTLA-4Ig and LEA29Y eighty-five days after the first infusion. *Arthritis Rheum* 2002;46:1470-79
134. Yi H, Zhen Y, Jiang L et al. The Phenotypic Characterization of Naturally Occurring Regulatory CD4+CD25+ T Cells. *Cell Mol Immunol* 2006; 3:189-95
135. Graca L, Thompson S, Lin CY et al. Both CD4(+)CD25(+) and CD4(+)CD25(-) regulatory cells mediate dominant transplantation tolerance. *J Immunol* 2002;168: 5558-67
136. Yong T, Chang L, Xiao YM et al. Role and mechanisms of CD4+CD25+ regulatory T cells in the induction and maintenance of transplantation tolerance. *Transplant Immunol* 2007;17:120–29
137. Hoffmann P, Eder R, Boeld TJ et al. Only the CD45RA+ subpopulation of CD4+CD25high T cells gives rise to homogeneous regulatory T-cell lines upon in vitro expansion. *Blood* 2006;108:4260-67
138. Mosmann TR, Cherwinski H Bond MW et al. Two types of murine helper T cell clone. I. Definition according to profiles of lymphokine activities and secreted proteins. *J Immunol* 1986;136:2348-57
139. Burdick JF, Clow LW. Rejection of primarily vascularized heart grafts. III. Depression of the interleukin 2 mechanism early after grafting. *Transplantation* 1990;50:476-81
140. Dallman MJ, Shiho O, Page TH et al. Peripheral tolerance to alloantigen results from altered regulation of the interleukin 2 pathway. *J Exp Med* 1991;173:79-87
141. Bugeon L, Cuturi MC, Hallet MM et al. Peripheral tolerance of an allograft in adult rats - characterization by low interleukin-2 and interferon-gamma mRNA levels and by strong accumulation of major histocompatibility complex transcripts in the graft. *Transplantation* 1992;54:219-25
142. Dallman MJ. Cytokines and transplantation: Th1/Th2 regulation of the immune response to solid organ transplants in the adult. *Curr Opin Immunol* 1995;7(5): 632-8

143. Takeuchi T, Lowry RP, Konieczny B et al. Heart allografts in murine systems. The differential activation of Th2-like effector cells in peripheral tolerance. *Transplantation* 1992;53:1281-94
144. Siegling A, Lehmann M, Riedel H et al. A nondepleting anti-rat CD4 monoclonal antibody that suppresses T helper 1-like but not T helper 2-like intragraft lymphokine secretion induces long-term survival of renal allografts. *Transplantation* 1994;57:464-7
145. Hall BM, Plain KM, Verma ND et al. Transfer of Allograft Specific Tolerance Requires CD4+CD25+ T Cells but Not Interleukin-4 or Transforming Growth Factor- β and Cannot Induce Tolerance to Linked Antigens. *Transplantation* 2007;83:1075-84
146. Plain KM, Boyd R, Verma ND et al. Transplant tolerance associated with a Th1 response and not broken by IL-4, IL-5, and TGF- β blockade or Th1 cytokine administration. *Transplantation* 2007;83:764-73
147. Wang Q, Liu Y, Wang J et al. Induction of allospecific tolerance by immature dendritic cells genetically modified to express soluble TNF receptor. *J Immunol* 2006;177:2175-85
148. Marson A, Kretschmer K, Frampton GM et al. Foxp3 occupancy and regulation of key target genes during T-cell stimulation. *Nature* 2007;445:931-5
149. Owen RD, Davis HP et al. Quintuplet calves and erythrocyte mosaicism. *J Hered* 1946;37:291-97

8. Glossar

APAAP	Alkalische Phosphatase Anti-Alkalische Phosphatase
APC	Antigen presenting cell; i.Z.m. (→)FACS auch: Allophycocyanin
BCIP	5-Brom-4-Chlor-Indolylphosphat
CAN	Chronic allograft nephropathy
CD	Cluster of differentiation
ConA	Concanavalin A
CTLA4	Cytotoxic T-lymphocyte antigen 4; auch: CTLA-4 oder CD152
CyA	Cyclosporin A
DA	Dark Agouti
DC	Dendritic cell
ELISA	Enzyme-linked immunosorbent assay; auch: EIA
ELISPOT	Enzyme-linked immunospot assay.
FACS®	<i>Fluorescence activated cell sorting</i> , geschützte Handelsmarke der Firma Becton Dickinson für das Durchflusszytometrie-Verfahren.
FCS	Fetal calf serum
FITC	Fluoreszeinisothiocyanat; auch: Fluorescein
Foxp3	Forkhead/winged-helix family transcriptional repressor p3
H&E	Hämatoxylin-Eosin
HRP	Horse radish peroxidase
ICAM	Intercellular adhesion molecule
IDO	Indoleamin-2,3-Dioxygenase
IFN- γ	Interferon gamma
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
I/R-Schaden	Ischämie-Reperfusionsschaden

LFA	Leukocyte function antigen
LPS	Lipopolysaccharid
mAk	monoklonale Antikörper
MHC	Major histocompatibility complex
NTB	Nitro blue tetrazolium
PBS	Phosphate buffered saline
PE	Phycoerythrin
PerCP	Peridinin Chlorophyllprotein
PMA	Phorbol Myristat Acetat
PMBC	Peripheral mononuclear blood cells
RPMI	Roswell Park Memorial Institute (Medium)
TCR	T cell receptor
TGF- β	Tumor growth factor beta
Treg	regulatory T cell
TNF- α	Tumornekrosefaktor alpha
UW-Lsg.	University of Wisconsin-Lösung
VCAM	Vascular cell adhesion molecule

9. Publikationsverzeichnis

1. **Brandenburg P**, Reutzel-Selke A, Hartmann J, Jurisch A, Francuski M, Pascher A, Neuhaus P, Tullius SG, Pratschke J. Mechanismen der Toleranzinduktion: Anti-CD4 (Rib 5/2) vs. CTLA4-Ig. Chirurgisches Forum 2007. 26:251
2. **Brandenburg P**, Reutzel-Selke A, Hartmann J, Jurisch A, Francuski M, Pascher A, Neuhaus P, Tullius SG, Pratschke J. Mechanismen der Toleranzinduktion: Anti-CD4 (Rib 5/2) vs. CTLA4-Ig. Transplantationsmedizin 2006. 18:67-8
3. Reutzel-Selke A, Hartmann J, **Brandenburg P**, Jurisch A, Francuski M, Pascher A, Neuhaus P, Tullius SG, Pratschke J. Einfluß der kalten Ischämiezeit auf die Toleranzinduktion. Transplantationsmedizin 2006. 18:165-6
4. **Brandenburg P**, Hartmann J, Reutzel-Selke A, Jurisch A, Francuski M, Neuhaus P, Tullius SG, Pratschke J. Mechanisms of tolerance induction: Anti-CD4 (Rib 5/2) vs. CTLA4-Ig. European Journal of Medical Research 2006. 11(Supplement II):141-2
5. Hartmann J, **Brandenburg P**, Reutzel-Selke A, Jurisch A, Francuski M, Neuhaus P, Tullius SG, Pratschke J. Impact of prolonged cold ischemia on transplantation tolerance. European Journal of Medical Research 2006. 11(Supplement II):144

10. Danksagung

Herrn Professor Dr. Stefan G. Tullius (Division of Transplantation, Brigham and Women's Hospital, Harvard Medical School) danke ich für die Überlassung des Themas; Herrn PD Dr. Johann Pratschke für die wissenschaftliche Betreuung.

Mein besonders herzlicher Dank gilt Frau Dr. Anja Reuztel-Selke und Frau Anke Jurisch, ohne deren unschätzbare Unterstützung diese Arbeit nicht möglich gewesen wäre.

Frau PD Dr. Isabella Schmitt-Knosalla vom Institut für Medizinische Immunologie der Charité und Herrn Prof. Anil K. Chandraker, M.B.Ch.B., der Harvard Medical School, danke ich für die unentgeltliche Überlassung von CTLA4-Ig.

Für kollegiale Hilfe bedanke ich mich bei Herrn Dr. Paulo N. Martins und Frau Dr. Maja Francuski.

Ich bedanke mich zudem herzlich bei Herrn PD Dr. Christian Grosse-Siestrup und den Mitarbeitern der Forschungseinrichtung für Experimentelle Medizin der Charité für die Unterstützung bei der Versuchstierbetreuung.

Ebenso gilt mein Dank Herrn Prof. Dr. R. Felix und den Ärzten und MTRA der Klinik für Strahlenheilkunde der Charité am Campus Virchow-Klinikum.

Auch bei Herrn Professor Dr. R. Tauber und den Mitarbeitern des Zentrallabors der Charité Campus Virchow-Klinikum bedanke ich mich für die gute Zusammenarbeit.

Frau Dr. Sybill Heßler (Bristol-Myers Squibb Deutschland) sei gedankt für die freundlichen Auskünfte.

Schließlich gilt mein Dank der Medizinischen Fakultät der Charite-Universitätsmedizin Berlin. Sie unterstützte diese Arbeit mit Mitteln der universitären Forschungsförderung.

11. Lebenslauf

Aus Datenschutzgründen ist der Lebenslauf nicht in digitaler Fassung verfügbar.

12. Eidesstattliche Erklärung

Ich, Paul Brandenburg, erkläre an Eides statt, dass ich die vorgelegte Dissertationschrift mit dem Thema: „Der Einfluss verlängerter Ischämie auf Nierentransplantatfunktion und antigen-abhängige Immunantwort nach Empfängerbehandlung mit CTLA4-Ig“ selbst verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt, ohne die (unzulässige) Hilfe Dritter verfasst und auch in Teilen keine Kopie anderer Arbeiten dargestellt habe.

Berlin, 7. Mai 2008

Paul Brandenburg