

Aus der Klinik für Chirurgie
und dem Institut für Medizinische Immunologie
der Medizinischen Fakultät Charité – Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

Operationale Toleranz im Langzeitverlauf
nach Lebertransplantation

Operational tolerance in the long-term follow-up
after liver transplantation

zur Erlangung des akademischen Grades
Doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Fabian Bergner

aus Berlin

Datum der Promotion: 4. Juni 2021

Inhaltsverzeichnis

Abbildungsverzeichnis	1
Tabellenverzeichnis	2
Abkürzungsverzeichnis	3
Abstract (deutsch)	5
Abstract (englisch)	6
1. Einleitung	7
1.1 Die Lebertransplantation (LTX)	7
1.2 Immunologische Komplikationen	7
1.3 Immunsuppression nach LTX	10
1.3.1 Wirkungen und Nebenwirkungen der Immunsuppression	12
1.3.1.1 Calcineurininhibitoren	13
1.3.1.2 Mycophenolat	13
1.3.1.3 mTOR-Inhibitoren	14
1.3.2 Gleichgewicht zwischen Rejektion und Nebenwirkungen der Prophylaxe	14
1.4 Operationale Toleranz	15
1.4.1 Bestimmung des Toleranzniveaus	15
1.4.2 CD4 ⁺ CD25 ⁺ FoxP3 ⁺ regulatorische T-Zellen	16
1.4.3 Transkriptionsfaktor FoxP3	17
1.4.4 Epigenetische Regulierung der TSDR von FoxP3	18
1.5 Zielsetzung und Fragestellung	19
2. Methodik	21
2.1 Allgemeines Studiendesign und Einschlusskriterien	21
2.2 Einteilung in Studiengruppen	21
2.3 Patientencharakteristika	22
2.4 Blutentnahme	24
2.5 Laborchemische Routineparameter	24
2.6 Experimentelle Bestimmung der relativen FoxP3-TSDR-Demethylierung	25
2.6.1 Materialien	25
2.6.2 Isolierung der DNS	26
2.6.3 Bisulfitierung der isolierten DNS	27
2.6.4 Quantifizierung des Demethylierungsstatus	29
2.7 Datenanalyse und statistische Methoden	30

3. Ergebnisse	32
3.1 Studienkohorte	32
3.2 Klinische Parameter	32
3.2.1 Demografische und therapeutische Parameter	32
3.2.2 Rejektionsepisoden	36
3.2.3 Sonografische Befunde	37
3.2.4 Histologische Befunde	38
3.2.5 Klinische Laborwerte	39
3.2.6 Leberwerte	45
3.3 Frequenz der CD4⁺ T-Zellen mit demethylierter TSDR	46
3.3.1 Demethylierung der TSDR	46
3.3.2 Evaluation möglicher Einflussfaktoren	47
4. Diskussion	48
4.1 Wahl des Studiendesigns	48
4.2 Diskussion der Ergebnisse	49
4.2.1 Demografische Parameter als Prädiktoren operationaler Toleranz	49
4.2.2 Einfluss früherer Rejektionsepisoden	51
4.2.3 Histologische Befunde und operationale Toleranz	52
4.2.4 Allgemeine klinische Laborwerte als mögliche Prädiktoren	54
4.2.5 Leberwerte und operationale Toleranz	55
4.2.6 Demethylierung der TSDR als Prädiktor operationaler Toleranz	56
5. Schlussfolgerungen und Ausblick	59
Literaturverzeichnis	60
Eidesstattliche Versicherung	74
Lebenslauf	75
Publikationsliste	76
Danksagung	77
Bescheinigung der statistischen Beratung	78

Abbildungsverzeichnis

		Seite
Abbildung 1	Methylierungsreaktion	19
Abbildung 2	Bisulfitierungsreaktion	27
Abbildung 3	Aufteilung der Studienpopulation auf die Studiengruppen	32
Abbildung 4	Zeitabstand zwischen Transplantation und Studieneinschluss	33
Abbildung 5	Patientenalter bei Transplantation	34
Abbildung 6	Anzahl der Rejektionsepisoden im ersten Jahr nach Transplantation	37
Abbildung 7	Inflamationsgrad des Transplantats nach Desmet und Scheuer	38
Abbildung 8	Fibrosestadium des Transplantats nach Desmet und Scheuer	39
Abbildung 9	Absolute Thrombozytenzahl	40
Abbildung 10	Absolute Lymphozytenzahl	41
Abbildung 11	Absolute Granulozytenzahl	41
Abbildung 12	Absolute Zahl der CD3 ⁺ Zellen im peripheren Blut	42
Abbildung 13	Absolute Zahl der CD8 ⁺ Zellen im peripheren Blut	43
Abbildung 14	Absolute Zahl der CD4 ⁺ Zellen im peripheren Blut	43
Abbildung 15	ASAT-Enzymaktivitäten im Serum	45
Abbildung 16	ALAT-Enzymaktivitäten im Serum	45
Abbildung 17	Frequenz der CD4 ⁺ T-Zellen mit demethylierter TSDR	47

Tabellenverzeichnis

		Seite
Tabelle 1	Häufigkeiten und klinische Präsentation der Rejektionen im Langzeitverlauf nach Lebertransplantation	9
Tabelle 2	Bestimmung des Rejektionsgrades nach Banff-Schema	10
Tabelle 3	Definition der Studiengruppen	22
Tabelle 4	Desmet-Scheuer Score der Inflammation	24
Tabelle 5	Desmet-Scheuer Score der Fibrose	24
Tabelle 6	Klassifikation der Nierenfunktion nach eGFR	25
Tabelle 7	Bisulfitierungs-Protokoll im Thermocycler	28
Tabelle 8	Teilvolumina des Reaktionsansatzes der Real Time PCR	29
Tabelle 9	Demografische und therapeutische Daten	35
Tabelle 10	Anzahl der Rejektionsepisoden	36
Tabelle 11	Resistance-Index (RI) der Arteria hepatica und maximale Flussgeschwindigkeit (V_{max}) der Vena portae	37
Tabelle 12	Histologische Befunde	38
Tabelle 13	Klinische Laborparameter	44
Tabelle 14	Leberwerte	46

Abkürzungsverzeichnis

A.	Arteria
ALAT	Alaninaminotransferase
AP	alkalische Phosphatase
ASAT	Aspartataminotransferase
BMI	Body Mass Index
CD	cluster of differentiation
CNI	Calcineurininhibitoren
CpG	Cytosin-phosphat-Guanin
CRP	C-reaktives Protein
Ct	Cycle threshold
CyA	Cyclosporin A (Talspiegel)
DNMT	DNA-Methyltransferasen
DNS	Desoxyribonukleinsäure
DSA	donorspezifische Antikörper
EC-MPS	enteric-coated mycophenolate sodium
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
eGFR	geschätzte glomeruläre Filtrationsrate
et al.	und andere
EVR	Everolimus (Talspiegel)
FK506	Tacrolimus (Talspiegel)
FoxP3	forkhead box protein P3
GC	Glucocorticoide
gGT	Gammaglutamyltransferase
HCC	Hepatozelluläres Karzinom
HCV	Hepatitis-C-Virus
HLA	humane Leukozyten-Antigene
IS	Immunsuppression
iTreg	induzierte Treg-Zellen
LTX	Lebertransplantation
MHC	major histocompatibility complex
MMF	Mycophenolatmofetil
mRNS	Messenger-Ribonukleinsäure

mTOR	mammalian (mechanistic) target of rapamycin complex 1
n	Anzahl
n.v.	nicht vorhandene Daten
NF-kappaB	nuclear factor-kappa B
NFAT	nuclear factor of activated T cells
nTreg	natürliche Treg-Zellen
PCR	polymerase chain reaction
PTLD	post-transplant lymphoproliferative disorder
RI	Resistance-Index
RUNX1	runt-related transcription factor 1
Teff	Effektor T-Zelle(n)
TET	ten-eleven translocation Demethylase
TGF- β	transforming growth factor beta
Treg	regulatorische T-Zelle(n)
TSDR	Treg-specific demethylated region
TX	Transplantat
U	Unit (Enzymeinheit)
UpM	Umdrehungen pro Minute
V.	Vena
Vmax	maximale Flussgeschwindigkeit

Abstract (deutsch)

Hintergrund: Organtransplantierte Patienten benötigen regelhaft eine immunsuppressive Dauertherapie. Es zeigte sich jedoch, dass einige Patienten im Langzeitverlauf nach Lebertransplantation auch komplett auf diese verzichten können, ohne dass es zu Abstoßungsreaktionen kommt. Bisher existieren keine hinreichend validierten Biomarker zur Identifizierung dieser „operational toleranten“ Patienten. Epigenetische Modifikationen der „Treg-specific demethylated region“ (TSDR) im Foxp3-Genlocus von CD4⁺ T-Zellen stellten sich in anderen Arbeiten als vielversprechend heraus. Ziel dieser Arbeit war es, charakteristische Besonderheiten operational toleranter Patienten zu identifizieren und zudem Hinweisen nachzugehen, dass ein komplettes Absetzen der Immunsuppression durch subklinische Entzündungsprozesse den Zustand des Transplantats beeinträchtigen kann.

Methodik: Die vorliegende Arbeit untersuchte innerhalb der Berliner Kohorte operational tolerante Patienten (TOL) im Vergleich zu Patienten mit stabiler Transplantatfunktion unter immunsuppressiver Therapie einer minimalen Dosierung (MIN), einer Standard-Dosierung (ST) und einer hohen Dosierung (HD) sowie zu nicht toleranten Patienten, die eine späte Rejektion zeigten (REJ). Alle Patienten erhielten eine orthotope post mortem Lebertransplantation vor mindestens fünf Jahren. Es erfolgte die Erhebung allgemeiner klinischer, histologischer, sonografischer und laborchemischer Parameter sowie die experimentelle Bestimmung der Frequenz an „stabilen“ regulatorischen CD4⁺ T-Zellen mit demethylierter TSDR als potenzieller Marker im peripheren Blut.

Ergebnisse: Die Studienkohorte umfasste 61 Patienten (8 TOL, 12 MIN, 28 ST, 7 HD, 6 REJ). Die TOL-Gruppe neigte häufiger zur Thrombozytopenie und zeigte im Vergleich zu der ST-Gruppe (191 (63-406) /nl) statistisch signifikant weniger Thrombozyten (134 (43-216) /nl; $p = 0,044$). Bei der TOL-Gruppe war eine Tendenz zu einer erhöhten Frequenz an CD4⁺ T-Zellen mit demethylierter TSDR (4,8 (2,9-15,1) %; $p = 0,539$) erkennbar. Unter allen Patienten zeigten diejenigen der MIN-Gruppe die geringste histologische Inflammationsausprägung ($p = 0,039$). Außerdem fielen die Patienten der MIN-Gruppe (ASAT: 27 (18-38) U/l, ALAT: 19 (10-33) U/l) und der ST-Gruppe (ASAT: 26 (10-63) U/l, ALAT: 19 (11-70) U/l) durch die geringsten Transaminasenaktivitäten im Serum auf, während die Patienten der TOL-Gruppe höhere ASAT-Werte (35 (23-48) U/l; versus MIN: $p = 0,072$ bzw. versus ST: $p = 0,084$) und auch höhere ALAT-Werte (29 (14-50) U/l; versus MIN: $p = 0,212$ bzw. versus ST: $p = 0,388$) aufwiesen.

Schlussfolgerung: Die erhobenen Daten der Transaminasenaktivität und histologischen Inflammation deuten darauf hin, dass eine minimale Dosis dem vollständigen Absetzen im Hinblick auf den Transplantatzustand überlegen sein könnte. Um dies endgültig zu belegen, sind weitere Untersuchungen an größeren Kohorten notwendig.

Abstract (englisch)

Background: Patients with organ transplants regularly require lifelong immunosuppressive therapy. However, it has been shown that in the long term some liver transplant patients can withdraw their immunosuppression without any rejection. To date, there are no sufficiently validated biomarkers to identify these "operationally tolerant" patients. Epigenetic modifications of the "Treg-specific demethylated region" (TSDR) in the *Foxp3* gene locus of CD4⁺ T cells have proved promising in other studies. The aim of this work was to identify characteristic features that are associated with operational tolerance and to examine if a complete cessation of immunosuppression can impair the condition of the transplant by subclinical inflammatory processes.

Methods: The present study investigated within the Berlin cohort operationally tolerant patients (TOL) in comparison to patients with stable graft function under immunosuppressive therapy of minimal dose (MIN), standard dose (ST), and high dose (HD) as well as to non-tolerant patients showing late rejection (REJ). All patients received orthotopic post mortem liver transplantation at least five years ago. General clinical as well as histological, sonographic and laboratory parameters were assessed and the frequency of "stable" regulatory CD4⁺ T cells with TSDR-demethylation was determined experimentally as a potential marker in peripheral blood.

Results: The study cohort included 61 patients (8 TOL; 12 MIN; 28 ST; 7 HD; 6 REJ). The TOL group was more prone to thrombocytopenia and showed statistically significant lower platelet counts (134 (43-216) /nl; $p = 0.044$) compared to the ST group (191 (63-406) /nl). The TOL group presented a tendency towards an increased frequency of CD4⁺ T cells with demethylated TSDR (4.8 (2.9-15.1) %; $p = 0.539$). Out of all groups, the MIN group showed the lowest histological inflammation rate ($p = 0.039$). In addition, patients in the MIN group (ASAT: 27 (18-38) U/l, ALAT: 19 (10-33) U/l) and the ST group (ASAT: 26 (10-63) U/l, ALAT: 19 (11-70) U/l) showed the lowest serum transaminase activity, while patients in the TOL group showed higher ASAT values (35 (23-48) U/l; $p = 0.072$ versus MIN and $p = 0.084$ versus ST) and also higher ALAT values (29 (14-50) U/l; $p = 0.212$ versus MIN and $p = 0.388$ versus ST).

Conclusion: The data collected suggest that a minimum dose may be superior to complete weaning with respect to the graft status measured by transaminase activity and histological inflammation. However, further studies on larger cohorts are necessary to provide definitive evidence of this.

1. Einleitung

1.1 Die Lebertransplantation (LTX)

Die Leber ist das zentrale Organ des menschlichen Stoffwechsels und leistet eine überlebenswichtige Funktion in Synthese, Metabolisierung und Entgiftung von Proteinen, Nährstoffen und wesentlichen Blutbestandteilen. Aus diesem Grund ist ein Leben ohne hinreichende Leberfunktion auf Dauer nicht möglich. Je nach Schweregrad und Verlauf einer Leberfunktionsstörung kommt es zu verschiedenen Symptomen wie beispielsweise Aszites, Ikterus, Gerinnungsstörungen bis hin zum hepatischen Koma [1].

Das chronische irreversible Organversagen entsteht in der überwiegenden Zahl der Fälle in einem schleichend progredienten Prozess und stellt das Endstadium verschiedener Lebererkrankungen dar. Zu den häufigsten Ursachen zählen in Deutschland die viralen Hepatitiden B und C sowie die alkoholische und nicht-alkoholische Steatohepatitis [1, 2]. Daneben kann, vor allem durch eine Paracetamol-Intoxikation oder virale Hepatitis, ein akutes Organversagen entstehen. Ein kleinerer Teil der Organtransplantationen begründet sich durch angeborene Fehlbildungen und Stoffwechselstörungen [2, 3]. Unter bestimmten Bedingungen stellen auch bösartige Neubildungen der intrahepatischen Gallenwege oder der Leber, wie hepatozelluläre Karzinome (HCC) innerhalb der Mailand-Kriterien, eine Indikation zur Lebertransplantation dar [2, 3].

Es gibt verschiedene extrakorporale Leberersatzverfahren, die jedoch nur einen Teil der Leberfunktion kompensieren und auch nur limitiert angewendet werden können. Bei einer irreversiblen Leberinsuffizienz ist die LTX die einzige kurative Behandlungsoption. Doch impliziert diese andererseits auch eine Reihe von postoperativen Komplikationen und Risiken. Neben chirurgisch-technischen und perioperativen Komplikationen sowie einer Rekurrenz der Grunderkrankungen sind in der frühen Phase sowie im Langzeitverlauf vor allem immunologische Komplikationen von eminenter Bedeutung.

1.2 Immunologische Komplikationen

Das Immunsystem schützt den Organismus vor Infektionen und der Entartung körpereigener Zellen. Dazu bedarf es der Differenzierung zwischen eigenen und fremden antigenen Strukturen, die wie ein Fingerabdruck detektiert werden können und

mit einem komplexen Erkennungs- und Signaltransduktionssystem zahlreicher Immunzellen und Immunfaktoren interagieren [4].

Den wesentlichen Anteil der LTX machen Allotransplantationen aus, bei denen eine Übertragung zwischen zwei Menschen stattfindet, die sich genetisch unterscheiden [3, 4]. Dadurch wird das Immunsystem des Empfängers naturgemäß mit körperfremden Genmerkmalen des Donors konfrontiert, indem sich die Oberflächenmerkmale eines Allotransplantats von denen der körpereigenen Zellen unterscheiden. Darauf reagieren die Immunzellen des Empfängers je nach Ausprägung der Inkompatibilität und immunologischen Potenz mit einer entzündlichen Reaktion unterschiedlicher Intensität gegen die Zellen des Lebertransplantats. Diese Reaktion bezeichnet man als Transplantatabstoßung oder Rejektion [3, 4].

Insbesondere zwei Antigentypen tragen eine relevante Rolle für Rejektionen. Zum einen sind das die Blutgruppenantigene des AB0-Systems, welche sich neben den Blutzellen auch auf allen übrigen Körperzellen befinden. Zum anderen sind es die humanen Leukozyten-Antigene (HLA). Dabei handelt es sich um zwei Klassen von Glykoproteinen, die in den äußeren Zellmembranen verankert sind und durch die Gene des „major histocompatibility complex“ (MHC) codiert werden [4]. Das HLA-Klasse-I-Molekül, welches zelleigene Antigene präsentiert, wird durch alle kernhaltigen Körperzellen und damit auch durch Leberzellen exprimiert. Das HLA-Klasse-II-Molekül kommt auf antigenpräsentierenden Zellen vor, die darüber phagozytierte Antigene zeigen [4]. Die individuelle Expression verschiedener MHC-Genorte und -Allele bewirkt eine spezifische Signatur der Zellen, die fast wie ein Fingerabdruck zwischen den meisten Menschen variiert [4].

Man unterscheidet nach ihrer Genese drei Klassen von Rejektionen: die hyperakute, die akute und die chronische Rejektion. Die hyperakute Rejektion tritt ausschließlich unmittelbar nach Transplantation auf und ist dank des präoperativen Testens auf präformierte Antikörper heute selten geworden [5, 6]. Im Langzeitverlauf sind es vor allem akute [7] sowie chronische Rejektionen (Tabelle 1) [8, 9].

Tabelle 1: Häufigkeiten und klinische Präsentation der Rejektionen im Langzeitverlauf nach Lebertransplantation (LTX)

Rejektion	Häufigkeit	Zeitpunkt	Klinische Präsentation
Akut	20 bis 40 % der Patienten [7]	in den ersten drei Wochen nach LTX oder durch inadäquate Immunsuppression auch im Langzeitverlauf [5]	akutes Organversagen mit einem Anstieg der Leberenzyme, jedoch selten eindeutige klinische Symptome, möglicherweise Fieber, Oberbauchschmerz und allgemeines Krankheitsempfinden [5, 10, 11]
Chronisch	etwa 5 % der Patienten [8, 11]	Monate bis Jahre nach LTX [9, 11]	schleichender Funktionsverlust mit zunehmender Cholestase und entsprechenden Laborwerten [8, 12]

Pathophysiologisch leisten sowohl bei der akuten als auch chronischen Rejektion alloreaktive T-Zellen einen wesentlichen Beitrag der Immunantwort des Empfängers auf ein Allograft [4]. Ihre Aktivierung kann über zwei verschiedene Mechanismen erfolgen. Einerseits ist es die direkte Allogenerkennung, welche auf antigenpräsentierenden Zellen des Spenders beruht, die mit dem Organ transplantiert worden sind. Sie präsentieren ihre alloge HLA-Strukturen in den sekundären lymphatischen Organen und können so passende (alloreaktive) naive T-Zellen des Empfängers zu T-Effektorzellen (Teff) aktivieren. Dabei erkennen die CD4⁺ T-Zellen Moleküle der HLA-Klasse-II, während den CD8⁺ T-Zellen Moleküle der HLA-Klasse-I angeboten werden [4, 13, 14]. Andererseits findet eine indirekte Allogenerkennung statt. Hierbei nehmen antigenpräsentierende Zellen des Empfängers, etwa durch die Lyse einer Spenderzelle, allogene HLA-Proteine auf und bieten diese als Peptid-Antigene mit körpereigenen HLA-Rezeptoren den T-Zellen an [4, 13, 14].

Neben zellulären Mechanismen gibt es auch Hinweise auf die zusätzliche Bedeutung donorspezifischer Antikörper (DSA) für die Genese der akuten sowie chronischen Rejektion [15-18]. Dabei können insbesondere DSA der Klasse II in Zusammenhang mit einem höheren Risiko für Abstoßungsreaktionen gebracht werden, wobei die zu Grunde liegenden Mechanismen noch unzureichend untersucht sind [19, 20].

Im Fall der akuten Rejektion kommt es infolge der Immunreaktion zu einem Angriff und Untergang von Lebertransplantatzellen [4, 21]. Vor dem Hintergrund der gegensätzlichen Behandlungsziele ist differenzialdiagnostisch zur akuten Rejektion die Entzündung im Rahmen einer akuten oder exazerbierten Virusinfektion auszuschließen [7]. Goldstandard zur Sicherung der Verdachtsdiagnose einer akuten Rejektion ist die

histopathologische Beurteilung. Charakteristische Zeichen sind ein gemischtzelliges portales Infiltrat, das nach Banff-Klassifikation graduiert wird (Tabelle 2), sowie eine Gallenwegsinflammation und ein entzündliches Infiltrat des Endothels der Portalvenen [7, 22, 23].

Tabelle 2: Bestimmung des Rejektionsgrades nach Banff-Schema [22]

Beurteilung	Histologischer Befund
Fraglich	portale Infiltrate, die unzureichend einer akuten Rejektion entsprechen
Mild	Infiltrate in wenigen Portalfeldern, intakte Grenzlamellen
Mäßig	Infiltrate in den meisten bis allen Portalfeldern, intakte Grenzlamellen
Schwer	Infiltrate affektieren alle Portalfelder und greifen auf Leberläppchen über (Grenzflächenhepatitis) sowie perivenuläre Hepatozytennekrose

Im Fall der chronischen Rejektion führt die Aktivierung alloreaktiver T-Zellen zu einer chronischen Entzündung der Gallenwegs- und Gefäßendothelien, die im Verlauf zu einer irreversiblen Fibrose des Transplantats führt. Während klinisch nur sehr diskret ein schleichend-progredienter Verlust der Transplantatfunktion auffallen kann, zeigen sich histopathologisch charakteristischerweise eine obliterative Arteriopathie, ein Verlust der kleinen Gallengänge und eine Duktopenie in der Mehrheit der Portalfelder sowie eine Fibrosierung bis zur irreversiblen Zirrhose [8, 9, 24, 25].

1.3 Immunsuppression nach LTX

Um das Risiko einer akuten und chronischen Rejektion zu minimieren, benötigt im Allgemeinen jeder transplantierte Patient lebenslang eine kontinuierliche Immunsuppression. Diese Erkenntnis und die Verfügbarkeit entsprechender Substanzen begleiteten die Transplantationsmedizin jedoch nicht von Beginn an. Als in der ersten Hälfte des 20. Jahrhunderts, katalysiert durch den Ersten und Zweiten Weltkrieg, gehäuft der Versuch unternommen wurde, Organe zwischen verschiedenen Menschen zu übertragen, stellten sich noch regelhaft frustrane Verläufe ein [26]. 1943 konnten Gibson und Medawar grundlegende Mechanismen der Rejektion näher beschreiben und im Jahr 1958 identifizierte Jean Dausset die ersten humanen Histompatibilitätsantigene, wofür er später den Nobelpreis für Medizin erhielt [27, 28]. Es kristallisierte sich immer mehr heraus, dass der Fallstrick der Transplantationsmedizin nicht in chirurgischen oder technischen Hindernissen lag, die mit der Zeit immer besser überwunden werden konnten, sondern in der

immunologischen Problematik der Rejektion und es entwickelte sich ein Verständnis für den Bedarf einer immunsuppressiven Therapie. Doch die Auswahl verfügbarer therapeutischer Optionen war zunächst überschaubar. 1959 transplantierte Murray eine Niere zwischen zweieiigen Zwillingen mit unterschiedlichem Erbgut und konnte mit Hilfe von Kortison und Ganzkörperbestrahlung die erste erfolgreiche Allotransplantation publizieren [26, 29].

Seither verbesserte sich die immunsupprimierende Therapie. Das Angebot wurde um eine Reihe potenter und nebenwirkungsärmerer Medikamente erweitert. Insbesondere die Einführung des Cyclosporins als erstes selektives Immunsuppressivum in den 70er-Jahren und nachfolgend des Tacrolimus in den 80er-Jahren trugen maßgeblich dazu bei, dass sich die LTX zu einer etablierten Behandlungsmethode entwickelte [26, 30, 31] und tragen noch heute dazu bei, dass die 1-Jahres-Überlebensraten bei > 80 % und 3-Jahres-Überlebensraten bei ca. 75 % liegen [32].

Da die Rejektionsneigung mit zunehmendem Transplantatalter sinkt, werden drei zeitliche Phasen nach der Transplantation unterschieden. In der intra- bzw. unmittelbar postoperativen Phase bedarf es einer hoch dosierten Immunsuppression, um eine frühe Rejektion zu vermeiden. Wenige Monate nach der Transplantation kann diese in der Regel zunehmend auf das Niveau der langfristigen Erhaltungstherapie gesenkt werden, die auf die Vermeidung einer späten akuten sowie chronischen Rejektion abzielt [30].

Die Wahl der Kombination und Dosis der Immunsuppressiva folgt allgemeinen Empfehlungen, unterscheidet sich aber zentrumspezifisch und wird vor allem im Langzeitverlauf nach individuellem Bedarf in Abhängigkeit des Transplantat- und Patientenalters, der Art der Grunderkrankung, der Nierenfunktion, der Art der Kombinationstherapie sowie von Biopsiebefunden und Hinweisen auf eine Rejektion angepasst [30].

Die wesentliche Säule der immunsuppressiven Langzeittherapie bilden nach wie vor die Calcineurininhibitoren (CNI) [30, 33]. Aufgrund individueller Überlegungen des Risikoprofils und hinsichtlich der Minimierung auftretender Nebenwirkungen oder Komplikationen wird eine reduzierte Dosis der CNI oft mit Mycophenolatmofetil (MMF) oder einem „mammalian target of rapamycin complex 1“ (mTOR)-Inhibitor kombiniert [34-38]. Glucocorticoide (GC) gehören zu den ältesten und bis heute eingesetzten Immunsuppressiva. Aufgrund ihrer eher unspezifischen Wirkung und einem erheblichen Nebenwirkungsspektrum werden sie jedoch für die Prophylaxe einer Rejektion im Langzeitverlauf zunehmend ausgetauscht [39-43].

1.3.1 Wirkungen und Nebenwirkungen der Immunsuppression

Auch die modernen Medikamente haben unerwünschte Begleitwirkungen. Da die erfreulicherweise gestiegenen Überlebenszeiten eine kumulative Exposition bedingen, rücken die immunsuppressiven Komplikationen des Langzeitverlaufs verstärkt in den Vordergrund [35, 44].

Die Einnahme höher dosierter Immunsuppressiva in den ersten Monaten nach Transplantation geht im Allgemeinen mit einer erhöhten Infektionsneigung einher [45, 46]. Da eine Hemmung der T-Zell-vermittelten Rejektion zugleich zu einer Hemmung der T-Zell-vermittelten Abwehr von Pathogenen führt, treten gehäuft opportunistische Infektionen durch Bakterien, Pilze, Protozoen oder Viren auf [45, 47]. Sobald im Langzeitverlauf die immunsuppressive Therapie reduziert werden kann, sinkt die Inzidenz opportunistischer Infektionen [45, 47, 48]. Gleichwohl können beispielsweise ein Herpes Zoster, eine virale Hepatitis und allgemeine ambulant erworbene Infektionen im Unterschied zur Normalbevölkerung einen schwereren Verlauf nehmen [6, 10, 35].

Weiterhin zeigten mehrere Studien, dass mit kumulierter Dauer und Intensität einer therapeutischen Immunsuppression das Risiko für verschiedene maligne Tumore steigt [49-53]. Gegenüber der Normalbevölkerung besteht für Patienten unter Immunsuppression ein 2,6- bis 4,3-faches Risiko der de-novo Entstehung eines malignen Tumors [49, 52, 53], wobei Non-Hodkin-Lymphome und Hauttumore wie Plattenepithelkarzinome sowie Kaposi-Sarkome am Häufigsten beobachtet wurden [49, 52-54].

Zu der gehäuften Entstehung maligner Tumore tragen zweierlei Mechanismen bei. Zum einen besitzt das Immunsystem nicht nur eine Funktion für die Pathogenabwehr, sondern auch eine tragende Rolle bei der Erkennung und Beseitigung entarteter Körperzellen. Zum anderen geht das zuvor genannte erhöhte Infektionsrisiko auch mit einer höheren Inzidenz onkogener Viren wie bestimmter Herpes- oder humaner Papillomaviren einher, wodurch gehäuft assoziierte maligne Erkrankungen auftreten [51]. Beispiele hierfür sind das Epstein-Barr-Virus-assoziierte Auftreten der „post-transplant lymphoproliferative disorder“ (PTLD) sowie das Humane-Herpesvirus-8-assoziierte Kaposi-Sarkom, das in einer Studie gegenüber der Normalbevölkerung eine mehr als 100-fache Steigerung der Inzidenz zeigte [51].

Das Spektrum der Nebenwirkungen immunsuppressiver Therapeutika umfasst neben der erhöhten Infektionsgefahr und dem gesteigerten Risiko der Malignomentstehung

weitere substanzklassenabhängige Nebenwirkungen, die für die gängigsten Immunsuppressiva im Folgenden ausgeführt werden.

1.3.1.1 Calcineurininhibitoren

Zu den CNI gehören die beiden Wirkstoffe Tacrolimus (FK506) und Cyclosporin A (CyA). Sie hemmen durch eine Komplexbildung mit FKBP12 (im Fall von FK506) bzw. Cyclophilin (im Fall von CyA) im Zytoplasma von T-Zellen die Serinphosphatase Calcineurin. Dadurch wird die Signaltransduktion des T-Zellrezeptors zum Transkriptionsfaktor „nuclear factor of activated T cells“ (NFAT) unterbrochen, was die Transkription von Interleukin-2 inhibiert und folglich die T-Zellproliferation minimiert, welche von Interleukin-2 abhängig ist [4, 30].

Dosisabhängige Nebenwirkungen umfassen in den meisten Fällen eine erhebliche Nephrotoxizität, Tremor, Kopfschmerzen sowie die Entwicklung einer arteriellen Hypertonie, Hyperlipidämie und diabetischen Stoffwechsellage [30, 55-59]. Insbesondere die CNI-assoziierte Nephropathie betrifft einen erheblichen Anteil von etwa 20 % der Patienten fünf Jahre nach LTX, wie Sharma et al. und Ojo et al. zeigten [57, 58]. Im Fall von nicht beherrschbaren Nebenwirkungen lässt sich die Dosis der CNI reduzieren, indem die Medikation um ein weiteres Immunsuppressivum ergänzt wird. Vordergründig sind dies Mycophenolat und die mTOR-Inhibitoren, doch auch diese Substanzen gehen mit beträchtlichen Nebenwirkungen einher [34-38].

1.3.1.2 Mycophenolat

Verschiedene Darreichungsformen dieser Substanzgruppe umfassen MMF und „enteric-coated mycophenolate sodium“ (EC-MPS). Beide stellen Prodrugs dar, die im Organismus zum aktiven Metaboliten Mycophenolsäure aktiviert werden [60]. Diese bewirkt in Lymphozyten eine nicht-kompetitive Hemmung des Schlüsselenzyms der de-novo-Synthese des Purinnukleotiden Guanosinmonophosphat, die Inosinmonophosphat-Dehydrogenase. Da die sich schnell teilenden Lymphozyten auf diese zur Nukleinsäuresynthese angewiesen sind, wird so die Lymphozytenproliferation inhibiert [60, 61].

Zu den häufigen Nebenwirkungen gehören Übelkeit, Erbrechen, Diarrhö oder Bauchschmerzen sowie eine Myelosuppression mit Leukozytopenie und

Thrombozytopenie [11, 61-64]. Zudem besitzt Mycophenolsäure eine hohe Teratogenität, die eine Anwendung bei Frauen im gebärfähigen Alter einschränkt [65].

1.3.1.3 mTOR-Inhibitoren

Wie die CNIs hemmen auch die mTOR-Inhibitoren Everolimus und Sirolimus die Signaltransduktion des T-Zellrezeptors und damit die Interleukin-2-abhängige T-Zellproliferation. Sie erreichen dies, indem die Kinase mTOR in T-Lymphozyten inhibiert und damit der Zellzyklus arretiert wird [66, 67]. Der antiproliferative Effekt der mTOR-Inhibitoren wirkt im Gegensatz zu anderen immunsuppressiven Substanzklassen zudem protektiv auf die Malignomentstehung, sodass eine Kombination aus CNIs und mTOR-Inhibitor bei lebertransplantierten Patienten mit HCC bevorzugt Anwendung findet [68-70].

Die häufigsten dosisabhängigen Nebenwirkungen der mTOR-Inhibitoren sind Nephrotoxizität, Myelosuppression, Hyperlipidämie, arterielle Hypertonie, periphere Ödeme, das Neuauftreten eines Diabetes mellitus sowie eine verzögerte Wundheilung [5, 30, 71].

1.3.2 Gleichgewicht zwischen Rejektion und Nebenwirkungen der Prophylaxe

Aufgrund der zum Teil schweren Nebeneffekte kann die immunsuppressive Therapie im Langzeitverlauf die Morbidität und Mortalität des transplantierten Patienten wesentlich beeinflussen [5, 6, 10, 35]. Aus diesem Grund hat die Reduktion der Dosis und damit der immunsuppressionsassoziierten Nebenwirkungen hohe Priorität in der Nachbetreuung lebertransplantierten Patienten. Dabei ist das Austarieren der optimalen Dosis stets ein Balanceakt zwischen der Vermeidung einer Rejektion einerseits und der Vermeidung von unerwünschten Arzneimittelwirkungen sowie Toxizität der immunsuppressiven Medikation andererseits [67]. Zudem hat die Vermeidung einer unnötig hohen Dosis auch einen positiven ökonomischen Effekt, denn die Medikamentenkosten belaufen sich pro Patient und Jahr im Durchschnitt auf 10.000 bis 14.000 US\$ [72].

1.4 Operationale Toleranz

Das Dosis-Optimum unterscheidet sich interindividuell sehr. Es gibt Patienten, die nach der LTX lebenslang eine hohe Dosis benötigen, während einige Patienten im Langzeitverlauf komplett auf immunsuppressive Medikamente verzichten können, ohne dass es zu einer Rejektion kommt.

Der Begriff „Immuntoleranz“ wird in der Transplantationsmedizin definiert durch die ausbleibende Reaktion des Immunsystems eines immunkompetenten Transplantatempfängers auf Antigene eines spezifischen Spenders, welche durch die Akzeptanz eines weiteren Organs des gleichen Spenders und Rejektion eines Organs eines Dritten nachgewiesen werden kann [14, 72-74]. Da diese Prüfung an Patienten nicht vertretbar ist, spricht man im klinischen Kontext stattdessen von der sogenannten „operationalen Toleranz“, wenn ein Transplantatempfänger ein allogenes Transplantat dauerhaft ohne Immunsuppression und mit stabiler Transplantatfunktion akzeptiert [14, 74, 75].

Im Jahr 1993 wurde bei lebertransplantierten Patienten erstmals eine operationale Toleranz beschrieben, die infolge mangelnder Adhärenz beobachtet werden konnte [76]. Die Zusammenschau der neueren Absetzstudien legt nahe, dass ca. 20 bis 30 % der stabilen Patienten keinerlei Immunsuppression benötigen, ohne dass es zu Rejektionen kommt [10, 72, 77-83]. Allerdings handelte es sich entsprechend des Ziels eines vollständigen Absetzens jeweils um ein selektiertes Patientenkollektiv, das nicht die Gesamtpopulation der Lebertransplantierten darzustellen vermag, für die der Anteil vermutlich geringer ausfällt [14, 40, 84].

1.4.1 Bestimmung des Toleranzniveaus

Obwohl die genauen Mechanismen des Phänomens der Toleranz noch nicht abschließend erklärt sind, konnten bisher einige klinische Charakteristika gezeigt werden, die mit der Toleranz assoziiert sind und daher gute Kandidaten für einen Absetzversuch (Weaning) kennzeichnen. Dazu gehören insbesondere die Zeit nach der Transplantation [10, 18, 73, 75, 84-87] sowie ein Patientenalter > 60 Jahre [10, 78, 85, 88] oder ein höheres Alter bei Transplantation [75], das männliche Geschlecht [10, 83], wenige bis keine Rejektionen in der Vergangenheit [18, 75, 85, 86], das Fehlen von Autoimmunerkrankungen [18, 85, 86, 89-91], eine hohe Übereinstimmung der HLA-Typen zwischen Spender und Empfänger [83, 85, 90], eine erfolgreiche Dosisreduktion

der immunsuppressiven Therapie in den ersten Wochen nach Transplantation [85, 86], eine stabile Transplantatfunktion [85] und eine normale bis minimal inflammatorisch veränderte Leberhistologie [18, 90, 92].

Die bisher wenigen kontrollierten Weaningstudien untersuchten auf Grundlage dieser Einschlusskriterien jeweils einen lediglich kleinen Teil der Gesamtpopulation der Lebertransplantierten [14]. Dennoch konnte beobachtet werden, dass der überwiegende Teil der Patienten im Verlauf eines Weanings eine Rejektion erleidet. Daran zeigt sich, dass die Studien trotz der vorhandenen Selektionsparameter einer Trial-and-Error-Methode folgen. Zwar können die meisten Rejektionen folgenlos abgefangen werden, doch wurde in der Literatur auch von Patienten berichtet, bei denen die akute Rejektionsepisode zu einem Transplantatverlust führte [14, 75]. Es bleibt zudem nicht auszuschließen, dass das Transplantat nach einer überstandenen Rejektionsepisode einen dauerhaften subklinischen Schaden davonträgt [75, 93, 94].

Obwohl es zum Schlüsselforschungsfeld der letzten Jahre wurde, fehlen aktuell noch immer hinreichende Marker, die immuntolerante Patienten identifizieren und von solchen unterscheiden können, die keine Immuntoleranz entwickeln.

Bei der Suche nach Charakteristika toleranter Patienten rückten besonders regulatorische T-Zellen in den Fokus der Forschung [5, 73, 95].

1.4.2 CD4⁺ CD25⁺ FoxP3⁺ regulatorische T-Zellen

Unter den CD4⁺ T_H gibt es eine besondere Subpopulation, welche die Aktivität anderer Immunzellen, insbesondere konventioneller T-Zellen, hemmen kann und die entsprechend „regulatorische T-Zellen“ (Treg) genannt wird [4, 96]. Man unterscheidet verschiedene Gruppen der Treg, von denen besonders gut untersucht und klinisch relevant die CD4⁺ CD25⁺ FoxP3⁺ Treg sind. Diese lassen sich wiederum nach ihrem Bildungsort in zwei Typen unterscheiden. Natürliche Treg (nTreg) entstehen im Thymus aus autoreaktiven T-Zellen [97, 98]. Induzierte Treg (iTreg) entstehen unter Einfluss von „transforming growth factor beta“ (TGF-β) in den sekundär lymphatischen Geweben aus naiven T-Zellen [66, 99].

Die Treg sind als supprimierende Gegenspieler wichtig für die Aufrechterhaltung der Immunhomöostase [100]. Eine Überfunktion der Treg ist möglicherweise an einem Immunescape von Tumorzellen beteiligt und eine Unterfunktion oder ein Fehlen der

Treg kann Autoimmunkrankheiten oder bei organtransplantierten Patienten Rejektionen auslösen [96, 98, 101]. Die Hemmung der CD4⁺ CD25⁻ T-Zellen, welche Rejektionen verursachen, macht die Quantifizierung der Treg zu einem potenziellen Marker zur Identifikation von operational toleranten Patienten. Im Mausmodell konnte gezeigt werden, dass Toleranz gegenüber allogenen Transplantaten abhängig von CD4⁺ CD25⁺ FoxP3⁺ Treg ist [102, 103]. Auch für nierentransplantierte Patienten [104-106] und lebertransplantierte Patienten [95, 107, 108] gibt es Hinweise, dass regulatorische CD4⁺ CD25⁺ T-Zellen einen Mechanismus der Organtoleranz darstellen und ihre Anzahl bei toleranten Patienten höher ausfällt.

Zur Identifikation und Quantifizierung einer Zellpopulation eignen sich grundsätzlich spezifische Bestandteile oder Eigenschaften, die konstant exprimiert werden und als Marker verwendet werden können. Für die Treg wurden im Wesentlichen zwei phänotypische Besonderheiten beschrieben. Sie werden durch die Oberflächenmarker CD3, CD4, die alpha-Untereinheit des Interleukin-2-Rezeptors (CD25) und die niedrige Expression des Interleukin-7-Rezeptors (CD127) charakterisiert [97, 98, 109]. Leider werden diese Oberflächenmarker auch von aktivierten T-Zellen exprimiert, sodass sie sich nicht für eine genaue Quantifizierung der Treg eignen [110, 111]. Die zweite Besonderheit der Treg besteht in der Expression des Transkriptionsfaktors „forkhead box protein P3“ (FoxP3), der bis heute Gegenstand intensiver Forschung ist.

1.4.3 Transkriptionsfaktor FoxP3

Essenziell für die Entwicklung und Funktion der CD4⁺ CD25⁺ Treg ist der Transkriptionsfaktor FoxP3 [66, 101, 112]. Nur die stabile FoxP3-Expression sorgt für die supprimierende Funktion der Treg [105, 113-115].

FoxP3 besitzt drei funktionell relevante Domänen. Eine C-terminale forkhead-Domäne, welche nach Homodimerisierung die Desoxyribonukleinsäure (DNS) im Zellkern zu binden vermag, um für ca. 700 bis 1400 Zielgene als Transkriptionsfaktor zu dienen und zusätzlich eine Zink-Finger- sowie eine Leucin-Zipper-Domäne, die weitere Zielgene durch die Interaktion mit anderen Cofaktoren wie NFAT, „runt-related transcription factor 1“ (RUNX1) oder „nuclear factor-kappa B“ (NF-kappaB) ansteuern [97, 112, 116, 117]. Auf diese Weise aktiviert FoxP3 in den Treg die Expression antiinflammatorischer Gene und supprimiert die Expression proinflammatorischer Gene. Dies führt über eine Supprimierung proinflammatorischer Zytokine wie Interleukin-2, Interleukin-4 und

Interferon-gamma sowie über direkten Zell-Zellkontakt zur Hemmung von Teff [66, 97, 105, 112, 116].

FoxP3 ist nicht exklusiv bei Treg zu finden. Neben CD4⁺ CD25⁺ Treg exprimieren auch aktivierte nicht-regulatorische T-Zellen und in geringerem Maße auch andere Zellen wie invariante natürliche Killerzellen, CD11b⁺ F4/80⁺ CD68⁺ Makrophagen oder Tumorzellen transient FoxP3 [97, 101, 110, 117].

1.4.4 Epigenetische Regulierung der TSDR von FoxP3

Um den wechselnden Anforderungen des Immunsystems gerecht zu werden, muss die Expression von FoxP3 different reguliert werden. Dies geschieht auf allen Ebenen vom Gen bis zum fertigen Protein [97]. Posttranslationale Proteinmodifikationen in Form von Acetylierung, Phosphorylierung, Ubiquitinierung und posttranskriptionelle Modifikationen der FoxP3-mRNS durch alternatives Splicing, transkriptionelle Modifikationen in Form von Wechselwirkungen mit Cofaktoren und Signalkaskaden sowie in besonderem Maße epigenetische Modifikationen regulieren die Expression und erzeugen Genprodukte mit verschiedenen Spezifikationen [97].

Die Epigenetik befasst sich mit Mechanismen, die durch eine Veränderung der DNS-Kondensation die Genexpression beeinflussen, ohne in die Basensequenz der DNS einzugreifen [118, 119]. Epigenetische Modifikationen basieren auf Deacetylierungen von Histonen oder der Verknüpfung einer Methylgruppe mit Cytosinbasen der DNS an Cytosin-Guanin-Dinukleotiden (CpG), die gehäuft in sogenannten CpG-Inseln regulatorischer Regionen vorkommen [118-120].

Der Methylierungsstatus scheint die Schlüsselrolle für die Expression des FoxP3-Gens einzunehmen [110, 115, 121]. Eine solche Methylierung hemmt die Expression von FoxP3. Eine Demethylierung fördert die Expression des Gens [115, 118, 119, 121]. Katalysiert durch spezifische DNS-Methyltransferasen (DNMT) kann Cytosin an der 5-Position methyliert vice versa durch spezifische Demethylasen wie einen Komplex der „ten-eleven translocation“ Demethylase (TET) demethyliert und so die Genaktivität beeinflusst werden [97, 118, 120, 122, 123] (Abbildung 1).

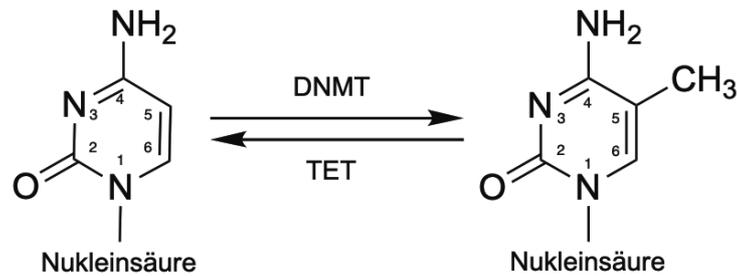


Abbildung 1: Methylierungsreaktion.
 Methylierung des Cytosins durch DNS-Methyltransferasen (DNMT) und Demethylierung des 5-Methyl-Cytosins durch die „ten-eleven translocation“ Demethylase (TET) (modifiziert nach [123]).

Das FoxP3-Gen besteht strukturell aus elf codierenden und drei nicht-codierenden Exons [97, 117]. Letztere sind entscheidend für die Expression des Gens, denn sie dienen der Bindung von Transkriptionsfaktoren. Der zweiten dieser nicht-codierenden Sequenzen kommt zudem eine besondere Bedeutung zu. Sie beinhaltet CpG-Motive, die durch Methylierung eine epigenetische Modifikation erfahren können [97]. Diese Region, die auch „Treg cell-specific demethylated region“ (TSDR) genannt wird, liegt bei nTreg nahezu vollständig demethyliert vor und resultiert in einer stabilen Expression von FoxP3 in nTreg [110, 121]. Baron et al. konnten zeigen, dass diese hochgradige Demethylierung spezifisch für nTreg ist. Dagegen besitzen iTreg nur eine partielle Demethylierung und andere Zellen wie die nicht-regulatorischen Teff, die nach Aktivierung auch transient FoxP3 exprimieren, allenfalls eine geringe Demethylierung der TSDR [101, 110]. Daraus lässt sich die Hypothese ableiten, dass sich lebertransplantierte Patienten mit operationaler Toleranz und eventuell Patienten mit minimaler Immunsuppression durch einen erhöhten Anteil der CD4⁺ Zellen mit einer Demethylierung der TSDR identifizieren und von solchen unterscheiden lassen, die keine Immuntoleranz entwickelt haben und eine normale oder sogar starke Immunsuppression benötigen.

1.5 Zielsetzung und Fragestellung

Bisher konnte eine erste Studie von Revilla-Nuin et al. lediglich an einer spanischen Kohorte lebertransplantierten Patienten bestätigen, dass solche mit fehlender Toleranz, die zuvor durch einen Absetzversuch identifiziert wurden, im Vergleich zu den operational Toleranten eine geringere Demethylierung der TSDR aufwiesen [87].

Daten zur Demethylierung der TSDR an stabilen lebertransplantierten Patienten unter immunsuppressiver Therapie wurden bisher nicht veröffentlicht. Diese könnten potenziell Aufschluss darüber geben, ob bestimmte Patienten den Toleranten ähneln und somit gute Kandidaten für ein Weaning im Langzeitverlauf wären, ob Patienten mit niedrig dosierter Immunsuppression Ähnlichkeiten zu den toleranten Patienten bei gleich wenig Toxizität aufweisen oder ob es Anzeichen für ein Transplantatschaden bei komplettem Absetzen gibt.

Ziel dieser Arbeit war es, Unterschiede der klinischen Patientendaten und des Transplantatzustandes sowie die Frequenz der CD4⁺ T-Zellen mit demethylierter TSDR im Foxp3-Genlocus in Abhängigkeit der Immuntoleranz zu untersuchen, um eine unnütze Exposition gegenüber immunsuppressiven Medikamenten durch die frühzeitige, bedarfsadaptierte und individuelle Bewertung des Risikos für eine Rejektion zu vermeiden.

Gegenstand der vorliegenden Studie waren folgende konkrete Fragen:

- 1) Welche klinischen Besonderheiten besitzt die Berliner Kohorte an operational toleranten Patienten? Sind operational tolerante Patienten älter und weisen andere Grunderkrankungen auf?
- 2) Ist die Berliner Kohorte durch eine erhöhte Frequenz an CD4⁺ T-Zellen mit demethylierter TSDR gekennzeichnet?
- 3) Weisen Patienten mit minimaler Immunsuppression auch Charakteristika operational toleranter Patienten auf?
- 4) Gibt es Anzeichen dafür, dass eine minimale Immunsuppression sicherer als komplettes Absetzen ist?

2. Methodik

2.1 Allgemeines Studiendesign und Einschlusskriterien

Für die vorliegende Studie wurden alle lebertransplantierten Patienten mit einem Nachsorgetermin in der Ambulanz Campus Virchow Klinikum der Charité - Universitätsmedizin Berlin zu einem wöchentlichen Stichtag im Zeitraum vom 4. Januar 2018 bis 5. Dezember 2018 gemäß der Ein- und Ausschlusskriterien evaluiert und in chronologischer Reihenfolge prospektiv eingeschlossen, wenn folgende Einschlusskriterien erfüllt waren: Mindestalter 18 Jahre, orthotope post mortem LTX und Mindestabstand nach Transplantation fünf Jahre. Ausgeschlossen wurden Patienten mit der zusätzlichen Transplantation eines weiteren Organs sowie Patienten, die eine oder mehrere der folgenden Erkrankungen aufwiesen: autoimmun-bedingte Lebererkrankungen, autoimmune Systemerkrankungen, angeborene oder erworbene Immundefekte, lymphatische Erkrankungen wie eine PTLD.

Alle Patienten wurden über die Zielsetzung sowie den Umfang der Studie aufgeklärt und willigten schriftlich in die Verarbeitung ihrer personenbezogenen Daten sowie Blutproben ein. Es erfolgte eine biometrische Fallzahlplanung und die Studie wurde durch die Ethikkommission der Charité befürwortet (EA2/127/17). Die Satzung der Charité zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis und die Deklaration von Helsinki wurden gewahrt.

2.2 Einteilung in Studiengruppen

Für die Untersuchung der Fragestellungen wurde die Studienpopulation auf Grundlage der Dosis ihrer immunsuppressiven Therapie sowie unter Berücksichtigung einer klinischen und laborchemischen Einschätzung in fünf Gruppen eingeteilt (Tabelle 3).

Tabelle 3: Definition der Studiengruppen

Gruppe	I	II	III	IV	V
Benennung	Operational tolerante Gruppe	Minimal-Gruppe	Standard-Gruppe	Hochdosis-Gruppe	Rejektions-Gruppe
Akronym	TOL	MIN	ST	HD	REJ
Definition	stabile TX-Funktion und > 6 Monate ohne IS, keine akute Rejektion > 6 Monate nach LTX	stabile TX-Funktion und unter minimaler Dosis der IS*	stabile TX-Funktion und unter Standarddosis der IS*	stabile TX-Funktion und unter hoher Dosis der IS*	zum Zeitpunkt mit akuter später Rejektion > 5 Jahre nach LTX und histologischer Bestätigung
FK506 oder CyA	-	< 3 < 50	3 - 5 50 - 100	> 5 > 100	+ / -
EVR oder MMF	-	< 3 ≤ 1	3 - 5 > 1	> 5 > 1	+ / -
GC	-	-	+ / -	+ / -	+ / -

TX = Transplantat, IS = Immunsuppression, LTX = Lebertransplantation, FK506 = Tacrolimusspiegel (ng / ml) gemittelt über die letzten sechs Monate, CyA = Spiegel des Cyclosporins A (ng / ml) gemittelt über die letzten 6 Monate, EVR = Everolimusspiegel (ng / ml) gemittelt über die letzten sechs Monate, MMF = Methyl-Mycofenolat (g/die) gemittelt über die letzten 6 Monate, GC = Glucocorticoide, * = aufgrund Grundlage der klinischen Einschätzung sowie ggf. früherer Rejektionsepisoden.

2.3 Patientencharakteristika

Mit Einschluss des/der Patienten/in wurden zunächst folgende klinische Daten aus der elektronischen Patientenakte erhoben:

- allgemeine Patienten- und Transplantatcharakteristika: Geburtsdatum bzw. Alter (Jahre), Geschlecht, Datum der Transplantation bzw. Alter bei der Transplantation (Jahre) und Alter des Transplantats (Jahre) definiert als Zeitabstand zwischen Transplantation und Studieneinschluss,
- Hintergrund der Transplantation: Notwendigkeit einer Retransplantation, Vorhandensein eines HCC vor Transplantation, ätiologische Grunderkrankung aufgeteilt in vier Gruppen (nutritiv-toxisch inklusive alkohol-toxisch, Virushepatitiden B oder C, angeboren, kryptogen),
- Komorbiditäten:
 - o Body Mass Index (BMI) berechnet nach der Formel $BMI = \text{Körpergewicht (kg)} / \text{Körpergröße}^2 \text{ (m}^2\text{)}$,

- Vorhandensein eines Diabetes mellitus und Notwendigkeit einer Insulinsubstitution,
- Vorhandensein diagnostizierter Lungenerkrankungen (Asthma, chronisch obstruktive Lungenerkrankung) sowie Herz-Kreislaufkrankungen (arterielle Hypertonie, Herzinsuffizienz, koronare Herzkrankheit, Myokardinfarkt, apoplektischer Insult, periphere arterielle Verschlusskrankheit),
- die Zeit ohne immunsuppressive Therapie (Jahre und Monate) für die operational toleranten Patienten sowie die immunsuppressive Medikation der letzten sechs Monate mit Erfassung des Medikamententyps, der MMF-Dosis [g/die] bzw. des aktuellen Blutspiegels von CNI (ng/ml) und mTOR-Inhibitoren (ng/ml) als Talspiegel, abgenommen im steady state,
- Rejektionshistorie: Anzahl vor Studienbeginn durchgemachter Rejektionsepisoden mit der Differenzierung von Rejektionen innerhalb des ersten Jahres und nach dem ersten Jahr post transplantationem,
- Befund der letzten sonografischen Untersuchung der Leber: Qualität der Transplantatdurchblutung, vorliegende Stenosen, Resistance-Index (RI) der A. hepatica nach der Formel $RI = (\text{systolische Spitzengeschwindigkeit} - \text{mittlere systolische Geschwindigkeit}) / \text{systolische Spitzengeschwindigkeit}$ sowie die maximale Flussgeschwindigkeit (V_{max}) der Venae portae (cm/s); in Anlehnung an Girometti et al. sowie Chopra et al. für den RI der Bereich 0,5 bis 0,75 und für die $V_{max} < 80$ cm/s als Normwerte [124, 125],
- Befund der letzten, maximal zehn Jahre zurückliegenden Routinebiopsie des Lebertransplantats außerhalb klinischer Rejektionsepisoden mit Erfassung des Fibrorestadiums und des Inflammationsgrades gemäß der Klassifikation nach Desmet et al. (Tabellen 4 und 5) [24, 25] sowie des Verfettungsgrades (%).

Tabelle 4: Desmet-Scheuer Score der Inflammation (modifiziert nach Schirmacher et al.[25])

Grad	Histologische Ausprägung der Entzündung
0	keine entzündliche Infiltration
1	geringe portale Entzündungszellinfiltration, keine oder minimale azinäre Parenchymzelluntergänge oder Entzündungszellinfiltrate, keine Grenzzonenhepatitis
2	geringe bis mäßige portale Entzündungszellinfiltration, geringe, fokale Grenzzonenhepatitis, einzelne parenchymatöse Einzelzellnekrosen, keine Gruppennekrosen
3	mäßige bis schwere portale Entzündungszellinfiltration, erhebliche Grenzzonenhepatitis, zahlreiche azinäre Einzelzellnekrosen, evtl. einzelne Gruppennekrosen, keine Brückennekrosen oder panlobulären Nekrosen
4	schwere portale Entzündungszellinfiltration und Grenzzonenhepatitis, schwere azinäre Entzündung mit Gruppennekrosen und evtl. Brückennekrosen oder panlobulären Nekrosen

Tabelle 5: Desmet-Scheuer Score der Fibrose (modifiziert nach Schirmacher et al.[25])

Stadium	Histologische Ausprägung der Fibrose
0	keine Fibrose
1	portale Faservermehrung, keine Septenbildung
2	inkomplette oder komplette portoportale Fasersepten bei erhaltener Architektur
3	septenbildende Faservermehrung mit Architekturstörung, ohne Anhalt für einen kompletten zirrhotischen Umbau
4	Zirrhose mit diffusem, vollständigen und irreversiblen Parenchymbau, Bindegewebssepten ersetzen benachbarte Lobuli, Regeneratknötchen

2.4 Blutentnahme

Die venösen Patientenproben wurden im Rahmen der routinemäßigen Nachkontrollen in der Lebertransplantationsambulanz Campus Virchow Klinikum der Charité - Universitätsmedizin Berlin abgenommen. Die laborchemischen, klinischen Routineparameter wurden durch das Labor Berlin analysiert. Für die experimentelle Fragestellung wurden zusätzlich 5 ml venöses EDTA-Blut gewonnen. Dieses wurde pseudonymisiert etikettiert und im Anschluss innerhalb von maximal vier Stunden bei -20 °C eingefroren, um die Proben später zeitgleich zu analysieren.

2.5 Laborchemische Routineparameter

Im Rahmen der Kontrolluntersuchungen wurden folgende Werte durch das Labor Berlin standardmäßig bestimmt und für die aufgeführte Analyse beurteilt: Hämoglobin (g/dl), Leukozytenzahl (pro nl), Thrombozytenzahl (pro nl), Monozytenzahl (pro nl),

Proteinase K	QIAGEN GmbH (Hilden, Deutschland)
FastStart Universal Probe Master (ROX)	Roche Applied Science (Mannheim, Deutschland)
lambda-DNS	New England Biolabs (Frankfurt, Deutschland)
Primer MSP1 und Sonde q776nm FAM-BHQ1 (nicht-methylierte Variante)	Epiontis (Berlin, Deutschland)
Primer MSP1m und Sonde q776m VIC-BHQ1 (methylierte Variante)	Epiontis (Berlin, Deutschland)
Microzentrifuge 5415R	Eppendorf AG (Hamburg, Deutschland)
Nanodrop UV Spektrofotometer	Thermo Fisher Scientific Inc. (Waltham, USA)
SpeedVac	Eppendorf AG (Hamburg, Deutschland)
7500 Real-Time PCR System (TaqMan) und 7500 Software v2.3	Life Technologies Ltd. (Carlsbad, USA)
peqSTAR 96 universal (Thermocycler)	peqlab Biotechnologie GmbH (Erlangen, Deutschland)

2.6.2 Isolierung der DNS

Unter Verwendung des „QIAamp DNA Mini Kits“ wurde die DNS durch eine spezielle Silicamembran, welche sich durch eine reversible Bindung von DNS auszeichnet, effektiv isoliert.

Nach dem Auftauen der Blutproben wurden jeweils 400 µl EDTA-Blut in 1,5 ml Eppendorf-Reaktionsgefäße überführt und nacheinander mit der Protease und dem Lyse-Puffer versetzt. Die Inkubationszeit der enzymatischen Lyse betrug 10 Minuten bei 56 °C, während der die Zellbestandteile inklusive der DNS freigesetzt wurden. Nach dem Zusetzen von 400 µl Ethanol, wurden die Proben in Aufreinigungssäulen (QIAamp Spin Column) überführt, die eine spezielle Silicamembran enthielten. Diese Membran band die im Alkohol gelöste DNS. Die übrige Lösung lief während einer Zentrifugation

für eine Minute mit einer Geschwindigkeit von 16.100 x g (13.200 UpM) durch und wurde verworfen. Es folgten zwei Waschschriffe mit 500 µl des Puffers AW1 und im Anschluss 500 µl des Puffers AW2, um restliche Moleküle von der Membran zu entfernen, bis ausschließlich die DNS gebunden vorlag. Mit 50 µl destilliertem Wasser wurde die DNS eluiert. Um möglichst keine Rest-DNS mit der Membran zu verwerfen, wurde das Eluat ein zweites Mal auf die Membran pipettiert und zentrifugiert. Anschließend lag die isolierte DNS in 50 µl Lösung vor. Die enthaltene DNS-Konzentration wurde mit dem Nanodrop UV-Spektrofotometer bestimmt. Bei Konzentrationen von < 50 ng/µl wurden die Proben mit einer Vakuum-Zentrifuge (SpeedVac) für 15 Minuten auf ca. 25 µl konzentriert, um für jede Probe eine ausreichende Menge für die nachfolgende Bisulfitierungsreaktion verwenden zu können.

2.6.3 Bisulfitierung der isolierten DNS

Zur Differenzierung des Methylierungszustandes der CpG-Inseln in der TSDR wurde die Bisulfitierungsmethode angewendet, mit der unmethylierte Cytosinbasen in Uracilbasen umgewandelt wurden, während die methylierten Cytosinbasen unverändert blieben [127, 128]. Nach Denaturierung der DNS bei 95 °C wurden dazu die unmethylierten Cytosinbasen in Anwesenheit von Natriumbisulfit (NaHSO₃) am C6-Atom sulfoniert und anschließend am C4-Atom zu Uracilsulfonat desaminiert, um zuletzt unter Alkalisierung das C6-Atom zu desulfonieren (Abbildung 2) [127-129].

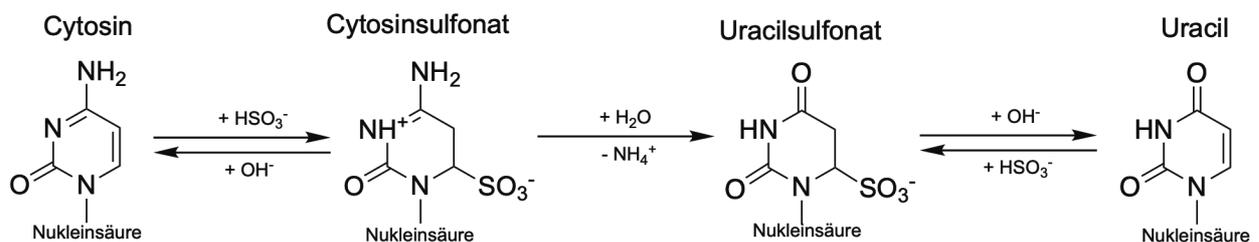


Abbildung 2: Bisulfitierungsreaktion (modifiziert nach [127, 129]).

Auf diese Weise wurde der Unterschied des Methylierungsstatus in einen Sequenzunterschied gewandelt, der sich in einem nächsten Schritt durch eine sequenzspezifische Quantifizierung abbilden ließ.

Unter Verwendung des „EpiTect Bisulfite Kits“ setzte sich der Reaktionsansatz aus 20 µl DNS-Eluat + 85 µl Bisulfit-Mix + 35 µl DNS-Protection Puffer zusammen und ergab jeweils 140 µl Lösung. Die Sulfonierung und Desaminierung der denaturierten DNS fand im Thermocycler nach dem in Tabelle 7 dargestellten Protokoll statt.

Tabelle 7: Bisulfitierungs-Protokoll im Thermocycler

	Dauer	Temperatur
Denaturierung	5 Minuten	95 °C
Inkubation	25 Minuten	60 °C
Denaturierung	5 Minuten	95 °C
Inkubation	85 Minuten	60 °C
Denaturierung	5 Minuten	95 °C
Inkubation	175 Minuten	60 °C
Halten	unbestimmt	20 °C

Anschließend wurde die bisulfitierte DNS für die Desulfonierung umgepuffert, erneut unter Verwendung einer Silicamembran gereinigt und isoliert. Zu dem bisulfitierten Produkt wurden 560µl Puffer BL zugefügt. Das Gemisch wurde auf eine EpiTect-Spinsäule pipettiert, anschließend für eine Minute bei 16.100 x g (13.200 UpM) zentrifugiert und das Eluat verworfen. In einem ersten Waschschrift wurden 500 µl des Waschpuffers BW auf die Säule gegeben, diese für eine Minute bei 16.100 x g (13.200 UpM) zentrifugiert und das durchgelaufene Eluat verworfen. Anschließend wurden 500 µl des Desulfonationspuffers BD auf die Membran gegeben und der Deckel für eine 15-minütige Inkubationszeit geschlossen. Nach Zentrifugation für eine Minute bei 16.100 x g (13.200 UpM) wurde das durchgelaufene Eluat erneut verworfen. Hiernach wurde der Waschschrift mit Waschpuffer BW zweimal wiederholt. Die EpiTect-Spinsäulen wurden in neue 1,5 ml Eppendorf-Reaktionsgefäße umgesetzt und 4 Minuten bei 16.100 x g (13.200 UpM) zentrifugiert, anschließend wieder in neue 1,5 ml Eppendorf-Reaktionsgefäße umgesetzt und mit geöffnetem Deckel für 5 Minuten bei 56 °C inkubiert, um Reste des Eluats möglichst vollständig zu entfernen. Zur Elution der DNS von der Membran wurden zunächst 25 µl des Puffers EB aufgebracht und bei 16.100 x g (13.200 UpM) zentrifugiert, um diesen Schritt mit 12 µl Elutionspuffer EB erneut durchzuführen. Im Anschluss lag die sequenzmodifizierte DNS aufgereinigt in Lösung vor.

2.6.4 Quantifizierung des Demethylierungsstatus

In diesem letzten Schritt erfolgte die quantitative Detektion der methylierten (unverändert Cytosin) und der nicht-methylierten Variante (nach Bisulfiterung Uracilbasen tragend) der TSDR durch eine Real Time PCR mit jeweils sequenzspezifischen Primern und Sonden. Die verwendeten DNS-Sonden besaßen eine zur jeweiligen Zielsequenz komplementäre Basenabfolge sowie am 5' Ende einen fluoreszierenden Reporter und am 3' Ende einen Quencher, der in räumlicher Nähe zum Reporter mittels Förster-Resonanz-Energietransfer das Fluoreszenzsignal unterdrückte [130].

Während der PCR wurden wiederholt Denaturierungsphasen bei 95 °C und Amplifizierungsphasen bei 61 °C durchlaufen. Sofern die jeweilige Zielsequenz vorhanden war, synthetisierte die Taq-Polymerase ausgehend vom 5' Ende des gebundenen Primers einen komplementären DNS-Strang. Im Verlauf traf sie auf jene Zielsequenz, an welche bereits die Sonde gebunden hat. Unter Einsatz der Exonukleaseaktivität der Taq-Polymerase wurde die Sonde segmental hydrolysiert, sodass der Reporter und der Quencher voneinander getrennt wurden und frei in der Lösung vorlagen. Das charakteristische Signal des Reporters konnte nun nicht mehr durch den Quencher unterdrückt werden und wurde proportional zur Anzahl entstehender PCR-Produkte detektiert. Mit jedem Zyklus stieg die Gesamtkonzentration freier Reporter exponentiell und damit die Stärke des Signals, das nach jedem Verdopplungszyklus gemessen wurde [130]. Der Reaktionsansatz wird in Tabelle 8 aufgeführt.

Tabelle 8: Teilvolumina des Reaktionsansatzes der Real Time PCR

Gesamter Reaktionsansatz	20 µl
DNS	6 µl
Lambda DNS (50 ng/µl)	2 µl
Primer (30 pmol/µl)	1 µl
Sonde (30 pmol/µl)	1 µl
Mastermix (zweifach konzentriert)	10 µl

Um Pipettierungenauigkeiten auszugleichen, wurden jeweils eine Dreifachbestimmung der nicht-methylierten Variante, eine Zweifachbestimmung der methylierten Variante sowie jeweils eine Doppelbestimmung für die Standardkurvenpunkte durchgeführt.

Letztere wurden durch Standardproben bekannter Konzentration erzeugt, die mit 12.500, 2.500, 500, 100 und 20 enthaltenen Kopien eine Verdünnungsreihe bildeten und bei jedem Versuchsdurchgang mitliefen.

Im TaqMan durchliefen die Proben eine initiale Denaturierungsphase von 10 Minuten bei 95 °C und anschließend 50 Zyklen mit je 15 Sekunden bei 95 °C und 60 Sekunden bei 61 °C. Die Anzahl der Zyklen, nach denen die Signalstärke das erste Mal einen vorgegebenen Wert oberhalb des Grundrauschens (threshold) übersteigt, wird „Cycle threshold“ (Ct-Wert) genannt. Dieser wurde manuell gesetzt und die Dreifach- bzw. Zweifach-Ct-Werte wurden gemittelt. Je höher die Anzahl amplifizierter DNS-Fragmente pro Zyklus liegt, desto rascher wird die entsprechende Signalstärke erreicht, sodass sich der Ct-Wert antiproportional zur Anzahl der Zielsequenz in der untersuchten DNS verhält. Aus der logarithmischen Korrelation der ermittelten Standard-Ct-Werte mit den zugehörigen Standard-Konzentrationen konnte eine Standardfunktion abgeleitet werden, mit der sich aus den Ct-Werten aller Proben die Anzahl der methylierten bzw. nicht-methylierten Zielsequenzen genau quantifizieren ließ. Die ermittelte Kopienzahl der nicht-methylierten Variante wurde mit der Gesamtzahl aus methylierter und nicht-methylierter Variante ins Verhältnis gesetzt, um den prozentualen Anteil der nicht-methylierten DNS zur Gesamt-DNS zu erhalten. Für weibliche Patienten musste die errechnete Demethylierungsrate verdoppelt werden, da sich das FoxP3-Gen auf dem X-Chromosom befindet und bei Frauen ein X-Chromosom durch vollständige Methylierung inaktiviert vorliegt [131]. Da nur CD4⁺ T-Zellen FoxP3 exprimieren können, wurde der ermittelte Prozentwert auf die Anzahl der CD4⁺ Zellen im Blut bezogen, um die Frequenz an CD4⁺ FoxP3⁺ regulatorischen T-Zellen zu ermitteln.

2.7 Datenanalyse und statistische Methoden

Unterschiede zwischen den Studiengruppen wurden für quantitative Variablen mit dem Kruskal-Wallis-Test und für qualitative Variablen mit dem Chi-Quadrat-Test auf signifikante Unterschiede geprüft. Vergleiche der operational toleranten Gruppe mit jeweils einer der anderen Gruppen wurden mit dem Mann-Whitney-U-Test durchgeführt (zweiseitige asymptotische Signifikanz). Dabei wurde zur Anpassung des Alpha-Niveaus bei multiplen Testen die Korrektur des Signifikanzniveaus nach Bonferroni angewendet. Zur Überprüfung eines linearen Zusammenhangs wurden Korrelationsanalysen nach Spearman berechnet. Für alle Analysen wurde ein

Signifikanzniveau von 0,05 festgesetzt, um zu entscheiden, ob ein Unterschied statistisch signifikant ist. Alle statistischen Analysen wurden mit dem Programm SPSS (Statistical Package for the Social Sciences, 2016, Version 24, IBM, Chicago, USA) durchgeführt. Chemische Strukturformeln wurden mit dem Programm ChemDraw (Version 16.0.1.4, PerkinElmer, Waltham, USA) erstellt.

3. Ergebnisse

3.1 Studienkohorte

Es konnten 66 Patienten rekrutiert werden. Von diesen mussten fünf Patienten ausgeschlossen werden, da bei einem der Patienten eine Autoimmunerkrankung, bei drei der Patienten ein Posttransplantationslymphom identifiziert werden konnte und einer der Patienten ein Lebertransplantat als Leberlebendspende erhielt. Die übrigen 61 Patienten, die in die Studie eingeschlossen werden konnten, teilten sich auf die vorab definierten fünf Gruppen auf (Abbildung 3).

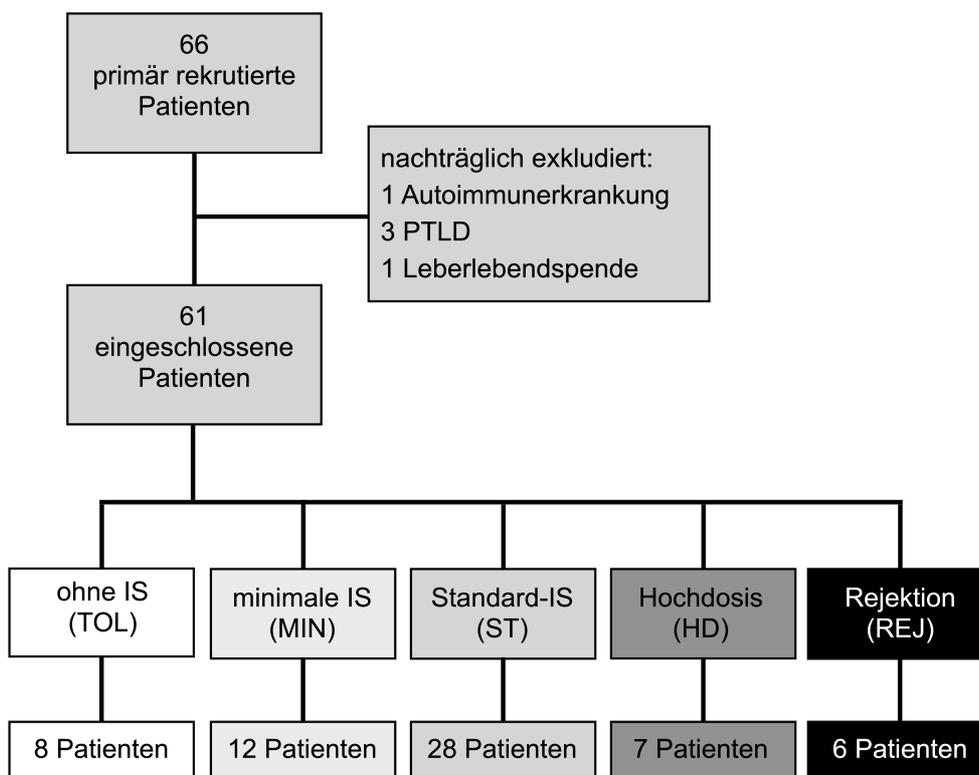


Abbildung 3: Aufteilung der Studienpopulation auf die Studiengruppen.
PTLD = post-transplant lymphoproliferative disorder, IS = Immunsuppression,
TOL = operational tolerante Patienten, MIN = Patienten mit minimaler IS,
ST = Patienten mit Standard-Dosis einer IS, HD = Patienten mit hoher Dosis einer IS, REJ = Patienten mit später Rejektion.

3.2 Klinische Parameter

3.2.1 Demografische und therapeutische Parameter

Innerhalb der TOL-Gruppe lag die kürzeste Zeit seit dem Absetzen der Immunsuppression bei 6,3 Monaten, die längste Zeit bei 174 Monaten und im Median

betrug sie 17,6 Monate. Aus der REJ-Gruppe erhielten zwei Patienten vor der Blutgewinnung eine Urbanosonstoßtherapie.

Hinsichtlich der demografischen und therapeutischen Parameter zeigten sich keine signifikanten Unterschiede der fünf Gruppen mit Ausnahme des Zeitabstands zwischen Transplantation und Studieneinschluss ($p = 0,018$) sowie der verwendeten Immunsuppressionsschemata ($p < 0,001$).

Die Patienten der REJ-Gruppe wurden im Median vor 7,6 Jahren (6,4-14,6 Jahre) transplantiert und zeigten damit den geringsten Zeitabstand nach Transplantation aller Gruppen (Abbildung 4). Insbesondere gegenüber der TOL-Gruppe mit einem medianen Alter von 17,1 Jahren (7,7-26,2 Jahre) zeigte sich eine Tendenz zu einem kürzeren Zeitabstand ($p = 0,080$). Darüber hinaus unterschieden sich die Patienten der TOL-Gruppe weder signifikant von denen der ST-Gruppe (15,7 (8,9-29,2) Jahre; $p > 0,999$) noch der MIN-Gruppe (12,5 (5,9-28,8) Jahre; $p > 0,999$) oder der HD-Gruppe (17,8 (11,8-19,2) Jahre; $p > 0,999$).

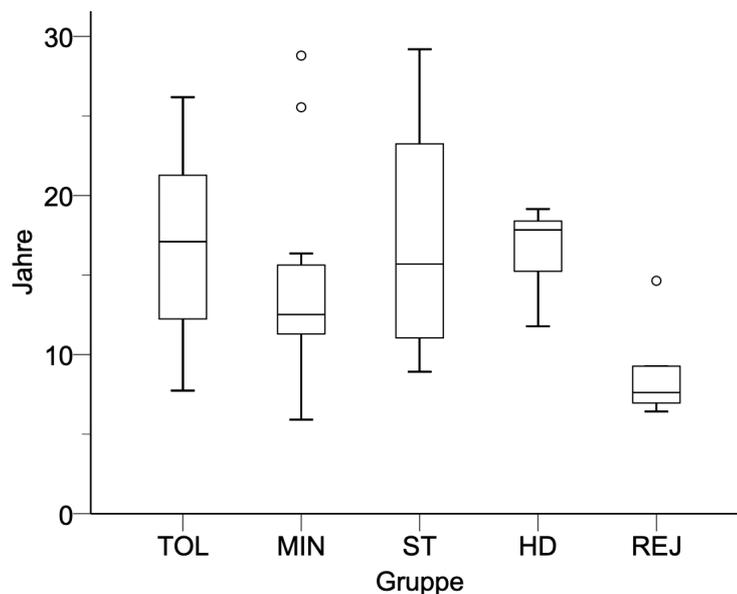


Abbildung 4: Zeitabstand zwischen Transplantation und Studieneinschluss ($p = 0,018$).

Hinsichtlich des Lebensalters der Patienten ($p = 0,838$) und des Alters bei der Transplantation ($p = 0,073$) zeigte sich zwischen den fünf Gruppen kein signifikanter Unterschied. Dennoch fällt auf, dass die Patienten der REJ-Gruppe zu den Ältesten der Kohorte gehörten (66 (59,9-70,8) Jahre) und in einem höheren Alter transplantiert worden sind (56,7 (52,1-62,8) Jahre), während die Patienten der TOL-Gruppe zum

Studienzeitpunkt (61,7 (28,7-75,0) Jahre) und zum Zeitpunkt der Transplantation (46,4 (15,5-63,5) Jahre) zu den jüngsten Patienten zählten (Abbildung 5).

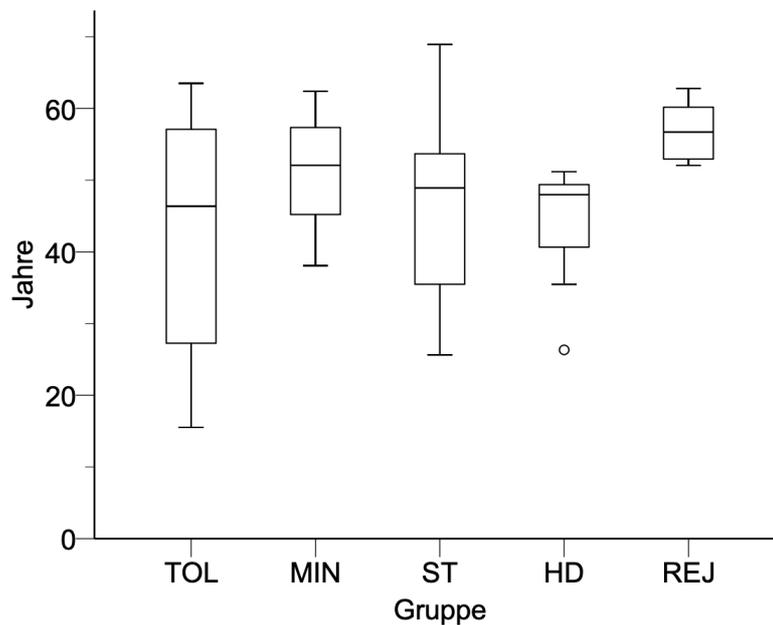


Abbildung 5: Patientenalter bei Transplantation ($p = 0,073$).

Bezüglich des Vorhandenseins eines HCC vor Transplantation zeigte sich im Vergleich aller Gruppen kein signifikanter Unterschied ($p = 0,072$). Die Patienten der REJ-Gruppe wiesen im Vergleich zu denen der TOL-Gruppe häufiger, aber nicht signifikant, ein HCC auf (66,7 % versus 25,0 %; $p = 0,532$). Die TOL-Gruppe unterschied sich hinsichtlich des Vorhandenseins eines HCC darüber hinaus weder signifikant von der ST-Gruppe (14,3 %; $p > 0,999$) noch der MIN-Gruppe (16,7 %; $p > 0,999$) oder der HD-Gruppe (14,3 %; $p > 0,999$).

Der Retransplantationsstatus zeigte im Vergleich aller Gruppen keinen signifikanten Unterschied ($p = 0,074$). Die Patienten der REJ-Gruppe wurden im Vergleich zu den Patienten der TOL-Gruppe, wenn auch nicht signifikant, deutlich häufiger retransplantiert (33,3 % versus 0 %; $p = 0,356$). Die TOL-Gruppe unterschied sich hinsichtlich des Retransplantationsstatus weder signifikant von der ST-Gruppe (3,6 %; $p > 0,999$) noch der MIN-Gruppe (8,3 %; $p > 0,999$) oder der HD-Gruppe (0 %; $p > 0,999$).

Die Verteilungen der übrigen demografischen und therapeutischen Charakteristika aller fünf Gruppen sind in der Tabelle 9 zusammengefasst.

Tabelle 9: Demografische und therapeutische Daten

	Gesamt (n = 61)	TOL (n = 8)	MIN (n = 12)	ST (n = 28)	HD (n = 7)	REJ (n = 6)	p-Wert
Geschlecht - männlich - weiblich	44 (72,1) 7 (27,9)	6 (75,0) 2 (25,0)	8 (66,7) 4 (33,3)	22 (78,6) 6 (21,4)	5 (71,4) 2 (28,6)	3 (50,0) 3 (50,0)	0,689
Alter¹	64,5 (28,7-85,1)	61,7 (28,7-75,0)	66,4 (56,0-74,2)	63,4 (35,3-85,2)	66,8 (40,6-68,2)	66,0 (59,9-70,8)	0,838
Alter bei LTX¹	50,3 (15,5-68,9)	46,4 (15,5-63,5)	52,0 (38,1-62,4)	48,9 (25,6-68,9)	48,0 (26,3-51,2)	56,7 (52,1-62,8)	0,073
Zeit seit LTX¹	14,6 (5,9-29,2)	17,1 (7,7-26,2)	12,5 (5,9-28,8)	15,7 (8,9-29,2)	17,8 (11,8-19,2)	7,6 (6,4-14,6)	0,018*
Grund- erkrankung - nutritiv-toxisch - viral - angeboren - kryptogen	18 (29,5) 34 (55,7) 4 (6,6) 5 (8,2)	1 (12,5) 5 (62,5) 0 2 (25,0)	3 (25,0) 8 (66,7) 0 1 (8,3)	12 (42,9) 13 (46,4) 1 (3,6) 2 (7,1)	2 (28,6) 3 (42,9) 2 (28,6) 0	0 5 (83,3) 1 (16,7) 0	0,123 0,189 0,401 0,080 0,379
HCC	13 (21,3)	2 (25,0)	2 (16,7)	4 (14,3)	1 (14,3)	4 (66,7)	0,072
Retransplantiert	4 (6,6)	0	1 (8,3)	1 (3,6)	0	2 (33,3)	0,074
IS-Schema ohne IS CNI mono CNI + MMF CNI + mTOR-I MMF mono CNI+MMF+GC MMF + GC	8 (13,1) 19 (31,1) 27 (44,3) 1 (1,6) 4 (6,6) 1 (1,6) 1 (1,6)	8 (100) 0 0 0 0 0 0	0 5 (41,7) 7 (58,3) 0 0 0 0	0 9 (32,1) 14 (50,0) 0 3 (10,7) 1 (3,6) 1 (3,6)	0 2 (28,6) 4 (57,1) 1 (14,3) 0 0 0	0 3 (50,0) 2 (33,3) 0 1 (16,7) 0 0	< 0,001* < 0,001* 0,261 0,076 0,098 0,450 0,878 0,878
BMI²	25,4 (18,7-40,5)	28,5 (21,3-40,5)	23,5 (18,7-32,3)	25,0 (19,6-38,6)	26,0 (20,2-33,8)	25,7 (24,3-31,2)	0,676
Nierenfunktion G1 G2 G3 G4 G5	18 (29,5) 22 (36,1) 20 (32,8) 0 1 (1,6)	3 (37,5) 4 (50,0) 1 (12,5) 0 0	3 (25,0) 4 (33,3) 5 (41,7) 0 0	6 (21,4) 12 (42,9) 9 (32,1) 0 1 (3,6)	3 (42,9) 1 (14,3) 3 (42,9) 0 0	3 (50,0) 1 (16,7) 2 (33,3) 0 0	0,844
Diabetes mellitus	17 (27,9)	3 (37,5)	4 (33,3)	7 (25,0)	2 (28,6)	1 (16,7)	0,904
Insulin- substitution	10 (16,4)	2 (25,0)	2 (16,7)	5 (17,9)	1 (14,3)	0	0,795
Lungen- erkrankung	8 (13,1)	0	1 (8,3)	5 (17,9)	1 (14,3)	1 (16,7)	0,722
Herz-Kreislauf- Erkrankung	32 (52,5)	6 (75,0)	5 (41,7)	17 (60,7)	2 (28,6)	2 (33,3)	0,245

Alle metrischen Daten werden als Median (Minimum-Maximum) und alle nominalen Daten werden als absolute Zahlen (prozentualer Anteil) angegeben, p-Werte für den Vergleich aller Studiengruppen angegeben, signifikante Ergebnisse mit * gekennzeichnet, ¹ in Jahren, ² in kg pro Quadratmeter, LTX = Lebertransplantation, HCC = hepatozelluläres Karzinom, IS = Immunsuppression, CNI = Calcineurininhibitoren, MMF = Mycophenolat Mofetil, mTOR-I = mammalian target of rapamycin complex 1-Inhibitor, GC = Glucocorticoide, BMI = Body Mass Index, n = Anzahl der Patienten.

3.2.2 Rejektionsepisoden

Von insgesamt 20 retrospektiv registrierten Rejektionsepisoden vor Studieneinschluss konnten die meisten histologisch gesichert werden. Lediglich für vier Rejektionsepisoden von Patienten der ST-Gruppe fand sich keine histologische Sicherung. Die entsprechenden Daten zeigt Tabelle 10.

Tabelle 10: Anzahl der Rejektionsepisoden

	Gesamt (n = 61)	TOL (n = 8)	MIN (n = 12)	ST (n = 28)	HD (n = 7)	REJ (n = 6)	p-Wert
Vor Studie							0,451
0	47 (77,0)	6 (75,0)	11 (91,7)	22 (78,6)	5 (71,4)	3 (50,0)	
1	9 (14,8)	2 (25,0)	1 (8,3)	4 (14,3)	1 (14,3)	1 (16,7)	
2	4 (6,6)	0	0	1 (3,6)	1 (14,3)	2 (33,3)	
3	1 (1,6)	0	0	1 (3,6)	0	0	
Im 1. Jahr							0,083
0	53 (86,9)	7 (87,5)	12 (100)	25 (89,3)	6 (85,7)	3 (50,0)	
1	6 (9,8)	1 (12,5)	0	3 (10,7)	1 (14,3)	2 (33,3)	
2	2 (3,3)	0	0	0	0	1 (16,7)	

Alle Daten werden als absolute Zahlen (prozentualer Anteil) angegeben, p-Werte für den Vergleich aller Studiengruppen angegeben, n = Anzahl der Patienten.

Die Patienten der REJ-Gruppe durchliefen in der Vorgeschichte der Studie mehr Rejektionsepisoden als die Patienten der anderen Gruppen. Im Vergleich aller Gruppen zeigte sich jedoch kein signifikanter Unterschied ($p = 0,451$). Auch im Vergleich der TOL-Gruppe zur REJ-Gruppe ergab dieser Unterschied keine Signifikanz ($p = 0,900$).

Bei der Differenzierung früher Rejektionen im ersten Jahr und Rejektionsepisoden im Langzeitverlauf zeigten sich tendenziell differierende Werte im Vergleich aller Gruppen ($p = 0,083$), wobei die Patienten der REJ-Gruppe im ersten Jahr nach Transplantation die höchsten Rejektionsraten und die Patienten der MIN-Gruppe die geringste Rejektionsrate aufwiesen (Abbildung 6). Die Patienten der TOL-Gruppe unterschieden sich hinsichtlich der Anzahl an Rejektionsepisoden im ersten Jahr nach Transplantation weder signifikant von denen der MIN-Gruppe ($p = 0,884$) noch der ST-Gruppe ($p > 0,999$), der HD-Gruppe ($p > 0,999$) oder der REJ-Gruppe ($p = 0,488$).

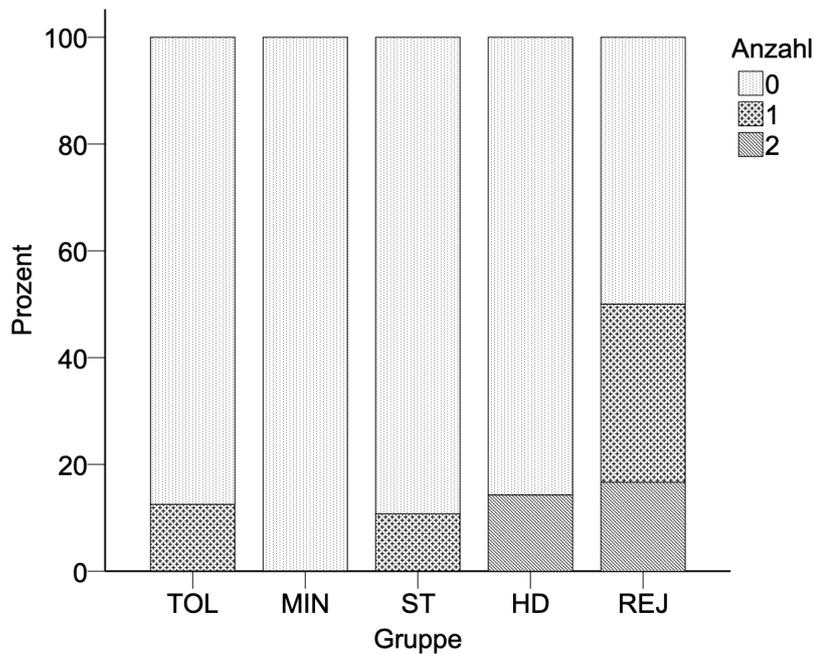


Abbildung 6: Anzahl der Rejektionsepisoden im ersten Jahr nach Transplantation ($p = 0,083$).

3.2.3 Sonografische Befunde

Keiner der untersuchten Patienten zeigt in den retrospektiv betrachteten Routine-sonografien eine beeinträchtigte Transplantatdurchblutung oder eine Gefäßstenose. Der Widerstandsindex der Arteria hepatica zeigte tendenziell höhere Werte in der ST-Gruppe, ohne eine statistische Signifikanz aufzuweisen ($p = 0,312$). Die maximalen Flussgeschwindigkeiten der Vena portae unterschieden zwischen den fünf Gruppen zwar signifikant ($p = 0,026$), jedoch befanden sich sämtliche Werte des Patientenkollektivs im Bereich der Normwerte (Tabelle 11).

Tabelle 11: Resistance-Index (RI) der Arteria hepatica und maximale Flussgeschwindigkeit (Vmax) der Vena portae

	Gesamt (n = 61)	TOL (n = 8)	MIN (n = 12)	ST (n = 28)	HD (n = 7)	REJ (n = 6)	p-Wert
RI der A. hepatica	0,67 (0,35-1,00)	0,61 (0,46-0,74)	0,69 (0,35-0,83)	0,70 (0,46-1,00)	0,70 (0,57-0,76)	0,59 (0,46-0,82)	0,312
n.v.	1	0	0	0	1	0	
normwertig ¹	37 (48,3)	7 (87,5)	8 (66,7)	13 (46,4)	5 (83,3)	4 (66,7)	0,367
Vmax der V. portae (cm/s)	19,5 (8,0-45,0)	18,8 (10,0-23,9)	19,0 (8,0-25,1)	22,7 (13,2-45,0)	17,9 (17,0-23,0)	15,1 (12,8-25,0)	0,026*
n.v.	0	0	0	0	0	0	
normwertig ²	61 (100)	8 (100)	12 (100)	28 (100)	7 (100)	6 (100)	

Alle metrischen Daten werden als Median (Minimum-Maximum) und die Normwertigkeit als absolute Zahlen (prozentualer Anteil) angegeben, p-Werte für den Vergleich aller Studiengruppen angegeben, signifikante Ergebnisse mit * gekennzeichnet, n.v. = nicht vorhandene Daten, n = Anzahl der Patienten, Normwerte: ¹ 0,5-0,75, ² < 80 cm/s.

3.2.4 Histologische Befunde

Von insgesamt 89 % der Patienten existierten Biopsiebefunde. Die entsprechenden Ergebnisse sind in Tabelle 12 zusammengefasst.

Tabelle 12: Histologische Befunde

	Gesamt (n = 61)	TOL (n = 8)	MIN (n = 12)	ST (n = 28)	HD (n = 7)	REJ (n = 6)	p-Wert
Fibrosestadium							0,565
0	8 (14,8)	1 (16,7)	2 (16,7)	4 (16,7)	0	1 (16,7)	
1	21 (38,9)	1 (16,7)	4 (33,3)	9 (37,5)	4 (66,6)	3 (50,0)	
2	22 (36,1)	4 (66,7)	6 (50,0)	10 (41,7)	1 (16,6)	1 (16,7)	
3	2 (3,7)	0	0	0	1 (16,6)	1 (16,7)	
4	1 (1,9)	0	0	1 (4,2)	0	0	
n.v.	7 (11,5)	2 (3,3)	0	4 (14,3)	1 (14,3)	0	
Inflammationsgrad							0,039*
0	23 (37,7)	2 (33,3)	6 (50,0)	12 (50,0)	3 (50,0)	0	
1	19 (31,1)	2 (33,3)	6 (50,0)	8 (33,3)	1 (16,6)	2 (33,6)	
2	8 (13,1)	1 (16,7)	0	4 (16,7)	0	3 (50,0)	
3	4 (6,6)	1 (16,7)	0	0	2 (33,3)	1 (16,7)	
4	0	0	0	0	0	0	
n.v.	7 (11,5)	2 (3,3)	0	4 (14,3)	1 (14,3)	0	
Verfettung (%)	10,0 (0-90)	10,0 (0-50)	12,5 (0-30)	10,0 (0-90)	10,0 (0-80)	17,5 (0-40)	0,981
n.v.	8 (13,1)	3 (37,5)	0	4 (14,3)	1 (14,3)	0	

Alle nominalen Daten werden als absolute Zahlen (prozentualer Anteil) und alle metrischen Daten werden als Median (Minimum-Maximum) angegeben, p-Werte für den Vergleich aller Studiengruppen angegeben, signifikante Ergebnisse mit * gekennzeichnet, n.v. = nicht vorhandene Daten, n = Anzahl der Patienten.

Der Inflammationsgrad nach Desmet und Scheuer unterschied sich signifikant zwischen den fünf Gruppen ($p = 0,039$). Dabei zeigten unter allen Patienten diejenigen der MIN-Gruppe die geringste Inflammationsausprägung (Abbildung 7).

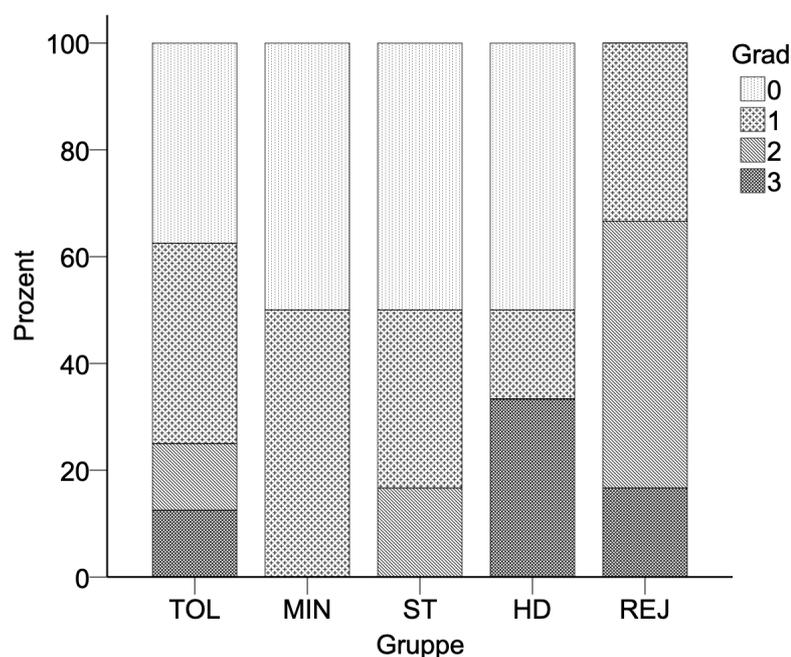


Abbildung 7: Inflammationsgrad des Transplantats nach Desmet und Scheuer ($p = 0,039$).

Die Patienten der TOL-Gruppe zeigten keinen signifikanten Unterschied der Inflammation im direkten Vergleich zu denen der anderen vier Gruppen (versus MIN-Gruppe $p > 0,999$, versus ST-Gruppe $p > 0,999$, versus HD-Gruppe $p > 0,999$, versus REJ-Gruppe $p = 0,428$).

Hinsichtlich des Fibrorestadiums zeigte sich kein signifikanter Unterschied im Vergleich der fünf Gruppen auf ($p = 0,565$, Abbildung 8). Die Patienten der MIN-Gruppe wiesen hinsichtlich der Fibrosierung des Transplantats vergleichbare Werte wie operational tolerante Patienten auf ($p > 0,999$). Die Patienten der TOL-Gruppe unterschieden sich ebenfalls nicht statistisch signifikant von den übrigen Gruppen (jeweils $p > 0,999$).

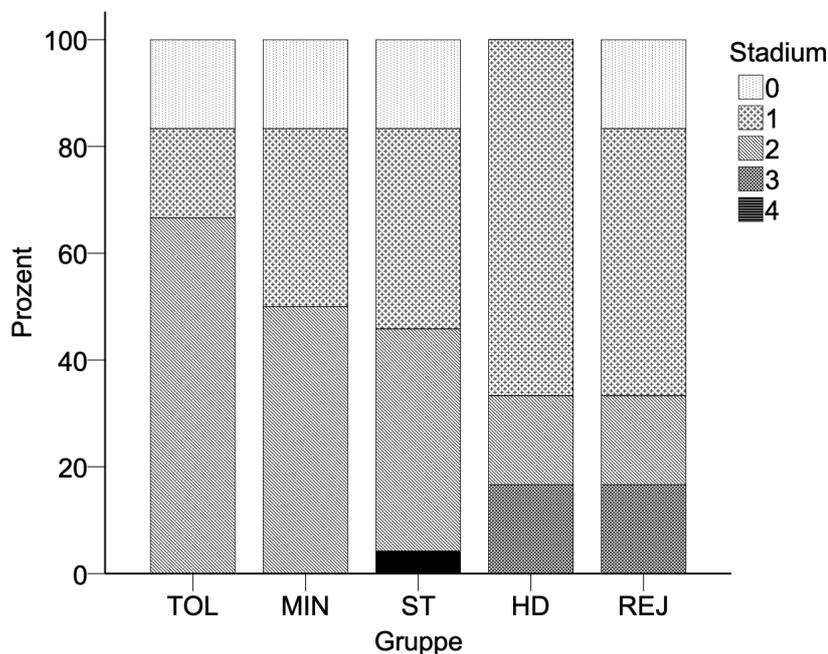


Abbildung 8: Fibrorestadium des Transplantats nach Desmet und Scheuer ($p = 0,565$).

3.2.5 Klinische Laborwerte

Die Zahl der Thrombozyten im peripheren Blut zeigte im Vergleich aller fünf Gruppen weder absolut gemessen ($p = 0,070$, Abbildung 9) noch hinsichtlich der Normwertigkeit ($p = 0,051$) einen statistisch signifikanten Unterschied. Jedoch neigten Patienten der TOL-Gruppe im Vergleich zu denen anderer Gruppen häufiger zur Thrombozytopenie (62,5 %). Insbesondere im direkten Vergleich der TOL-Gruppe (134 (43-216) pro nl) mit der ST-Gruppe (191 (63-406) pro nl) zeigten sich statistisch signifikant weniger Thrombozyten bei Patienten der TOL-Gruppe ($p = 0,044$). Die Patienten der TOL-

Gruppe unterschieden sich darüber hinaus weder signifikant von denen der MIN-Gruppe (173 (122-355) pro nl; $p = 0,360$) noch der HD-Gruppe (150 (101-298) pro nl; $p > 0,999$) oder der REJ-Gruppe (206 (152-265) pro nl; $p = 0,112$).

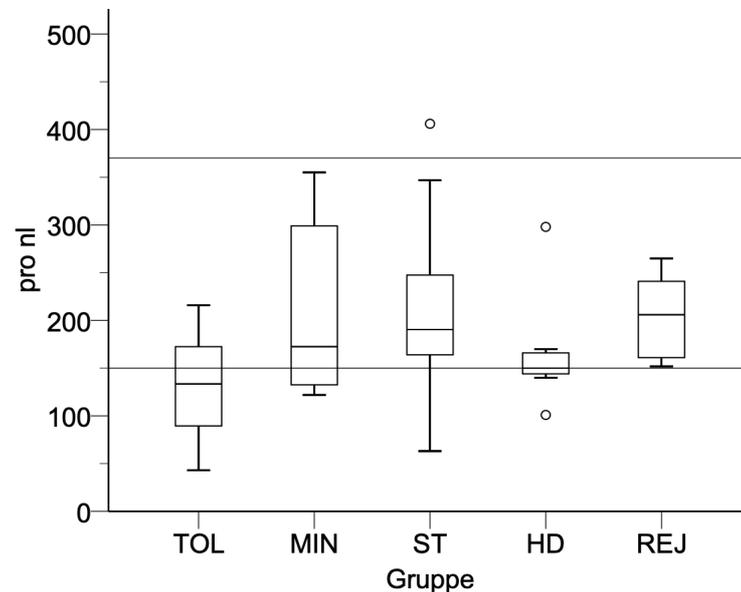


Abbildung 9: Absolute Thrombozytenzahl ($p = 0,070$).
Horizontale Linien markieren den Normbereich.

Die Zahl der Lymphozyten im peripheren Blut zeigte keinen statistisch signifikanten Unterschied im Vergleich aller Gruppen ($p = 0,080$). Es war jedoch eine Tendenz zu höheren Werten der Patienten der TOL-Gruppe (2,12 (0,99-2,46) pro nl) zu erkennen, während sich die Werte der übrigen Patienten im Bereich des unteren Normwertes bewegten (Abbildung 10). Insbesondere zeigten die Patienten der TOL-Gruppe eine Tendenz zu höheren Leukozytenzahlen im Vergleich zu denen der ST-Gruppe (1,21 (0,42-4,13) pro nl; $p = 0,060$). Die Patienten der TOL-Gruppe unterschieden sich darüber hinaus weder signifikant von denen der MIN-Gruppe (1,39 (0,83-2,93) pro nl; $p = 0,432$) noch der HD-Gruppe (1,53 (0,88-2,32) pro nl; $p > 0,568$) oder der REJ-Gruppe (1,36 (0,77-1,71) pro nl; $p = 0,344$).

Unter Berücksichtigung des Normbereiches zeigte sich ein signifikanter Unterschied zwischen allen Gruppen ($p = 0,014$). Signifikant mehr Patienten der TOL-Gruppe (85,7 %) wiesen im Vergleich zur ST-Gruppe (18,5 %) eine Lymphozytenzahl im Normbereich auf ($p = 0,004$). Hinsichtlich normwertiger Lymphozytenzahlen unterschied sich die TOL-Gruppe hingegen nicht signifikant von der MIN-Gruppe (33,3 %; $p = 0,128$), der HD-Gruppe (57,1 %; $p > 0,999$) oder der REJ-Gruppe (33,3 %; $p = 0,344$).

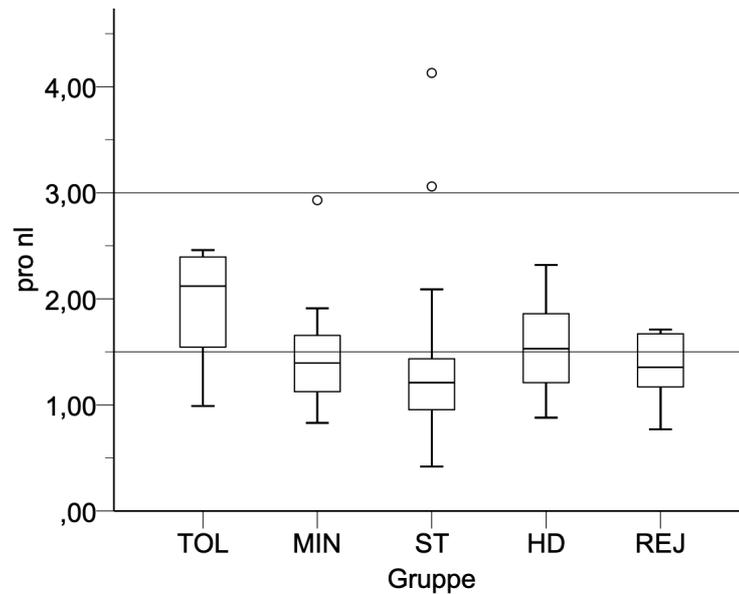


Abbildung 10: Absolute Lymphozytenzahl ($p = 0,080$).
Horizontale Linien markieren den Normbereich.

Die Zahl der Granulozyten zeigte einen signifikanten Unterschied im Vergleich aller fünf Gruppen ($p = 0,038$). Dabei unterschieden sich die Patienten der TOL-Gruppe (3,67 (2,54-4,87) pro nl) signifikant von den Patienten der REJ-Gruppe (5,66 (3,77-8,77) pro nl; $p = 0,040$). Die Patienten der TOL-Gruppe unterschieden sich darüber hinaus weder signifikant von denen der MIN-Gruppe (4,72 (2,07-7,99) pro nl; $p = 0,540$) noch der ST-Gruppe (4,41 (1,61-7,81) pro nl; $p = 0,692$) oder der HD-Gruppe (2,80 (2,00-6,08) pro nl; $p > 0,999$). Die Betrachtung der stabilen Patienten unter Immunsuppression (MIN, ST, HD) zeigte folgenden Trend: Je höher die Immunsuppressionsdosis, desto niedriger fiel die Anzahl der Granulozyten aus (Abbildung 11).

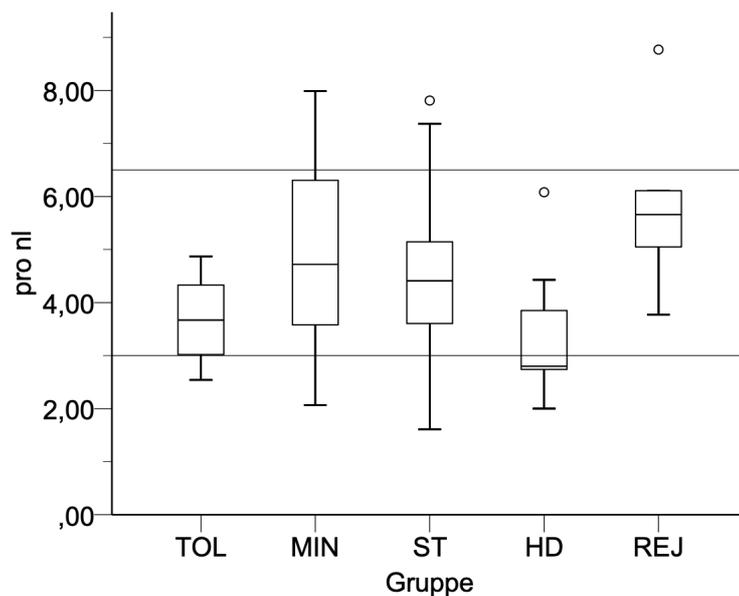


Abbildung 11: Absolute Granulozytenzahl ($p = 0,038$).
Horizontale Linien markieren den Normbereich.

Die absolute Zahl der CD3⁺ Zellen im peripheren Blut zeigte einen signifikanten Unterschied im Vergleich aller Gruppen ($p = 0,018$). Dabei wiesen die Patienten der TOL-Gruppe (1,55 (0,75-1,97) pro nl) im Median höhere Werte auf als die übrigen Gruppen, deren Median jeweils im Bereich des unteren Normwertes lag (Abbildung 12). Die Patienten der TOL-Gruppe unterschieden sich signifikant von den Patienten der ST-Gruppe (0,83 (0,13-1,92) pro nl; $p = 0,016$), jedoch nicht signifikant von denen der MIN-Gruppe (1,06 (0,70-2,39) pro nl; $p = 0,308$), der HD-Gruppe (0,97 (0,70-1,63) pro nl; $p = 0,256$) oder der REJ-Gruppe (0,89 (0,38-1,18) pro nl; $p = 0,088$).

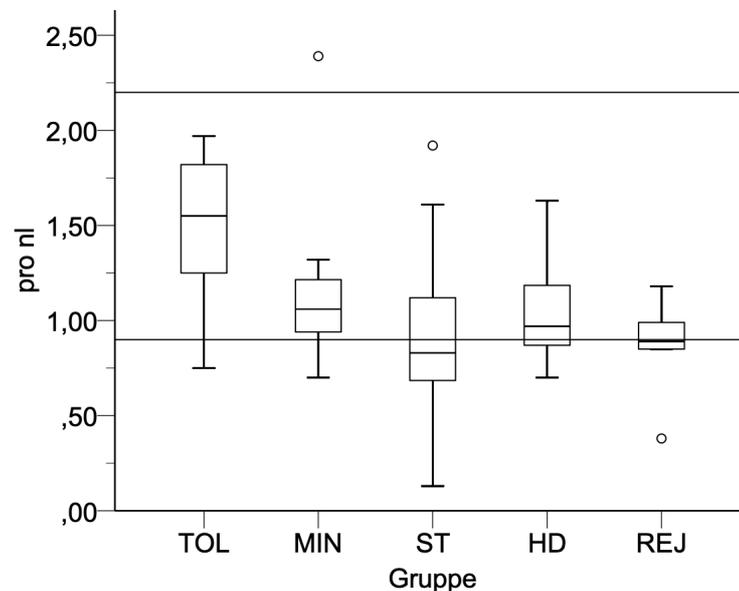


Abbildung 12: Absolute Zahl der CD3⁺ Zellen im peripheren Blut ($p = 0,018$).
Horizontale Linien markieren den Normbereich.

Die absolute Zahl der CD8⁺ Zellen im peripheren Blut zeigte einen signifikanten Unterschied im Vergleich aller fünf Gruppen ($p = 0,039$, Abbildung 13). Die Patienten der TOL-Gruppe (0,70 (0,32-0,96) pro nl) unterschieden sich signifikant von den Patienten der ST-Gruppe (0,34 (0,04-0,77) pro nl; $p = 0,012$), jedoch nicht signifikant von denen der MIN-Gruppe (0,37 (0,18-0,82) pro nl; $p = 0,184$), der HD-Gruppe (0,36 (0,23-0,78) pro nl; $p = 0,336$) oder der REJ-Gruppe (0,35 (0,14-0,56) pro nl; $p = 0,128$).

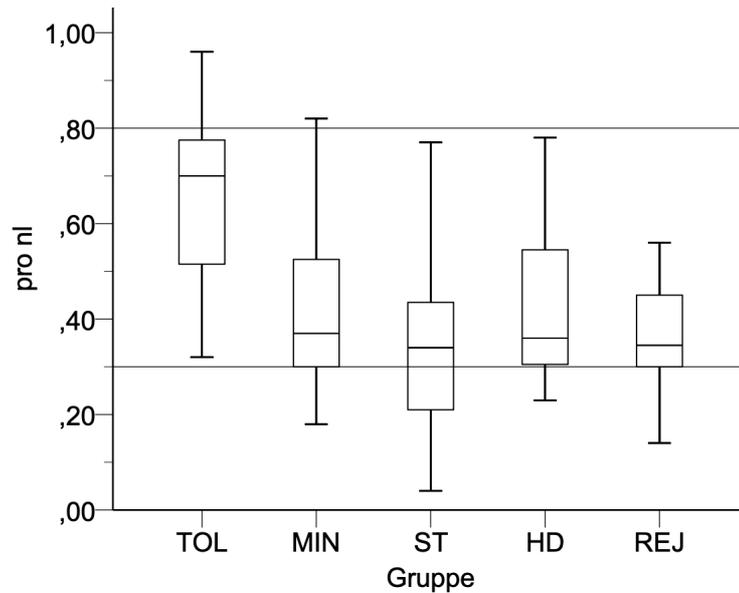


Abbildung 13: Absolute Zahl der CD8⁺ Zellen im peripheren Blut (p=0,039).
Horizontale Linien markieren den Normbereich.

Die absolute Zahl der CD4⁺ Zellen im peripheren Blut zeigte keinen signifikanten Unterschied im Vergleich aller fünf Gruppen (p = 0,121, Abbildung 14). Die TOL-Gruppe (0,70 (0,40-1,08) pro ml) unterschied sich weder von der MIN-Gruppe (0,58 (0,37-1,11); p > 0,999) noch von der ST-Gruppe (0,45 (0,07-1,19); p = 0,192), der HD-Gruppe (0,58 (0,35-0,77); p = 0,984) oder der REJ-Gruppe (0,53 (0,21-0,59); p = 0,424).

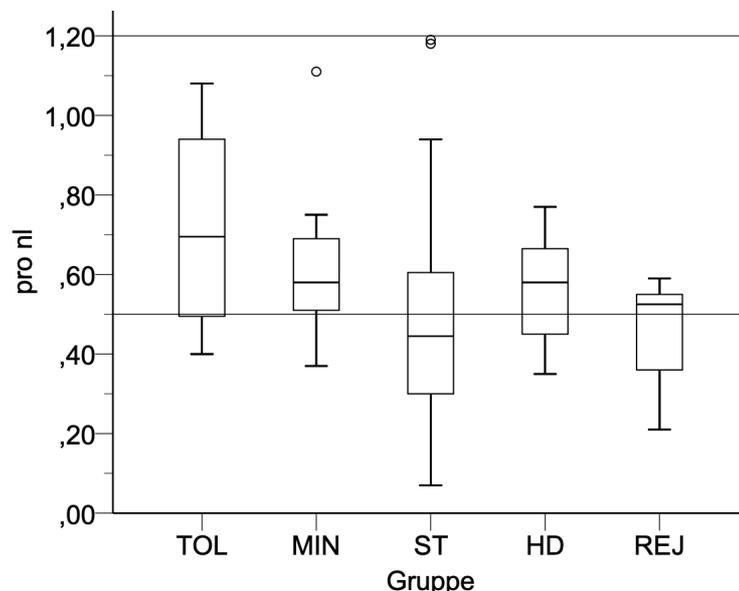


Abbildung 14: Absolute Zahl der CD4⁺ Zellen im peripheren Blut (p = 0,121).
Horizontale Linien markieren den Normbereich.

Die übrigen klinischen Laborparameter sind in der Tabelle 13 zusammengefasst.

Tabelle 13: Klinische Laborparameter

	Gesamt (n = 61)	TOL (n = 8)	MIN (n = 12)	ST (n = 28)	HD (n = 7)	REJ (n = 6)	p-Wert
Hämoglobin (g/dl)	13,9 (9,7-17,7)	15,0 (13,3-17,1)	14,4 (9,7-17,7)	13,4 (10,3-16,6)	12,5 (11,3-17,2)	14,2 (13,1-15,4)	0,350
normwertig ²	39 (63,9)	6 (75,0)	7 (58,3)	16 (57,1)	4 (57,1)	6 (100)	0,323
Leukozyten (pro nl)	6,3 (3,1-11,7)	6,3 (4,0-7,9)	6,2 (3,7-11,3)	6,2 (3,1-11,7)	5,4 (3,1-9,0)	7,6 (6,0-10,5)	0,368
normwertig ³	54 (88,5)	8 (100)	10 (83,3)	24 (85,7)	6 (85,7)	6 (100)	0,662
Thrombozyten (pro nl)	173 (43-406)	134 (43-216)	173 (122-355)	191 (63-406)	150 (101-298)	206 (152-265)	0,070
normwertig ⁴	44 (72,1)	3 (37,5)	8 (66,7)	23 (82,1)	4 (57,1)	6 (100)	0,051
Monozyten (pro ml)	0,52 (0,14-1,75)	0,56 (0,45-0,69)	0,51 (0,32-1,75)	0,57 (0,22-1,54)	0,40 (0,22-1,54)	0,43 (0,14-1,48)	0,829
n.v.	2	1	0	1	0	0	
normwertig ⁵	26 (44,0)	6 (85,7)	5 (41,7)	12 (44,4)	4 (57,1)	4 (66,7)	0,370
Lymphozyten (pro nl)	1,35 (0,42-4,13)	2,12 (0,99-2,46)	1,39 (0,83-2,93)	1,21 (0,42-4,13)	1,53 (0,88-2,32)	1,36 (0,77-1,71)	0,080
n.v.	2	1	0	1	0	0	
normwertig ⁶	21 (35,6)	6 (85,7)	4 (33,3)	5 (18,5)	4 (57,1)	2 (33,3)	0,014*
Granulozyten (pro nl)	4,34 (1,61-8,77)	3,67 (2,54-4,87)	4,72 (2,07-7,99)	4,41 (1,61-7,81)	2,80 (2,00-6,08)	5,66 (3,77-8,77)	0,038*
n.v.	3	1	1	1	0	0	
normwertig ⁷	41 (70,7)	5 (71,4)	8 (72,7)	20 (74,1)	3 (42,9)	5 (83,3)	0,516
CD3⁺ Zellen (pro nl)	0,96 (0,13-2,39)	1,55 (0,75-1,97)	1,06 (0,70-2,39)	0,83 (0,13-1,92)	0,97 (0,70-1,63)	0,89 (0,38-1,18)	0,018*
n.v.	3	1	1	1	0	0	
normwertig ¹⁰	33 (56,9)	6 (85,7)	8 (72,7)	12 (44,4)	5 (71,4)	2 (33,3)	0,128
CD4⁺ Zellen (pro nl)	0,52 (0,07-1,19)	0,70 (0,40-1,08)	0,58 (0,37-1,11)	0,45 (0,07-1,19)	0,58 (0,35-0,77)	0,53 (0,21-0,59)	0,121
n.v.	1	0	1	0	0	0	
normwertig ⁸	35 (58,3)	6 (75,0)	9 (81,8)	12 (42,9)	4 (57,1)	4 (66,7)	0,175
CD8⁺ Zellen (pro nl)	0,37 (0,04-0,96)	0,70 (0,32-0,96)	0,37 (0,18-0,82)	0,34 (0,04-0,77)	0,36 (0,23-0,78)	0,35 (0,14-0,56)	0,039*
n.v.	3	1	1	1	0	0	
normwertig ⁹	38 (65,5)	6 (85,7)	7 (63,6)	15 (55,5)	5 (71,4)	5 (83,3)	0,490
CRP (mg/l)	2,3 (0-67,0)	1,7 (0-11,0)	1,7 (1,0-23,0)	2,9 (1,0-67,0)	3,3 (0-12,0)	3,45 (1,0-8,0)	0,692
n.v.	2	0	1	1	0	0	
normwertig ¹¹	40 (67,8)	6 (75,0)	8 (72,7)	18 (66,6)	4 (57,1)	4 (66,7)	0,952

Alle metrischen Daten werden als Median (Minimum-Maximum) und die Normwertigkeit als absolute Zahlen (prozentualer Anteil) angegeben, p-Werte für den Vergleich aller Studiengruppen angegeben, signifikante Ergebnisse mit * gekennzeichnet, n.v. = nicht vorhandene Daten, n = Anzahl der Patienten, CRP = C-reaktives Protein, laborspezifische Normwerte (für gesunde Probanden): ² Männer 13,5 bis 17,0 g/dl und Frauen 11,8 bis 15,8 g/dl, ³ 3,9 bis 10,5 pro nl, ⁴ 150 bis 370 pro nl, ⁵ < 0,5 pro nl, ⁶ 1,5 bis 3,0 pro nl, ⁷ 3,0 bis 6,5 pro nl, ⁸ 0,5 bis 1,2 pro nl, ⁹ 0,3 bis 0,8 pro nl, ¹⁰ 0,9 bis 2,2 pro nl, ¹¹ < 5,0 mg/l.

3.2.6 Leberwerte

Die Enzymaktivitäten der ASAT ($p < 0,001$) und ALAT ($p = 0,001$) unterschieden sich im Vergleich aller fünf Gruppen signifikant (Abbildung 15 und Abbildung 16).

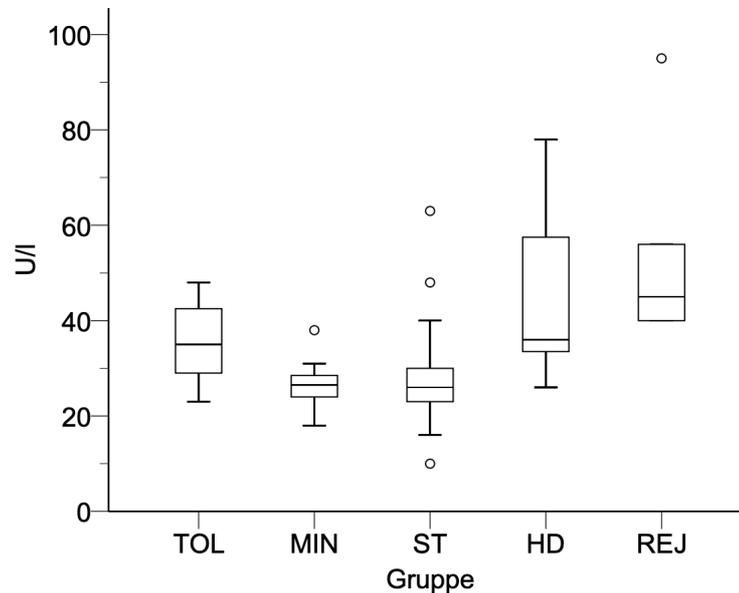


Abbildung 15: ASAT-Enzymaktivitäten im Serum ($p < 0,001$).

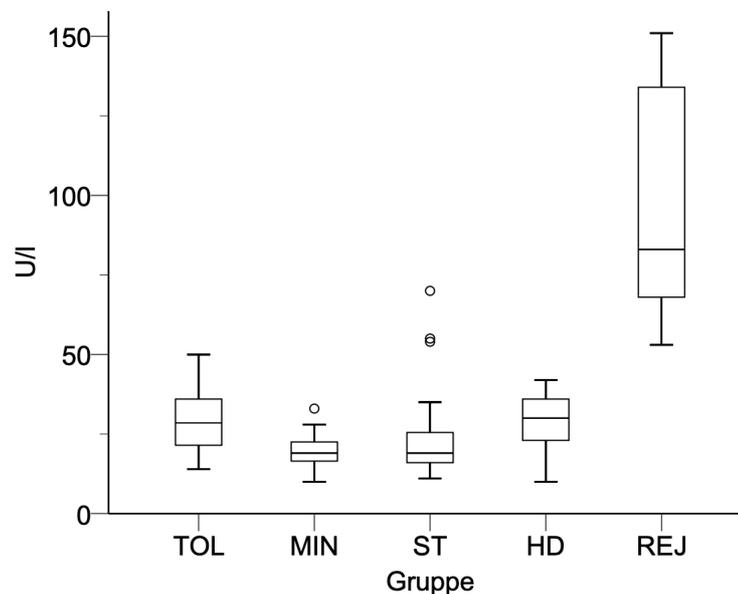


Abbildung 16: ALAT-Enzymaktivitäten im Serum ($p = 0,001$).

Für das Merkmal ALAT zeigten Patienten der REJ-Gruppe (83 (53-151) U/l) erhöhte Werte gegenüber den übrigen Gruppen und insbesondere gegenüber den Patienten der TOL-Gruppe (29 (14-50) U/l) eine signifikante Erhöhung ($p = 0,008$). Die Patienten der MIN-Gruppe (ASAT: 27 (18-38) U/l bzw. ALAT: 19 (10-33) U/l) und ST-Gruppe (ASAT: 26 (10-63) U/l bzw. ALAT: 19 (11-70) U/l) fielen dabei durch die geringsten

Enzymaktivitäten im Serum auf, während die Patienten der TOL-Gruppe, wenn auch nicht statistisch signifikant, höhere ASAT-Werte (versus MIN-Gruppe $p = 0,072$ bzw. versus ST-Gruppe $p = 0,084$) und auch höhere ALAT-Werte (versus MIN-Gruppe $p = 0,212$ bzw. versus ST-Gruppe $p = 0,388$) aufwiesen. Die entsprechenden Ergebnisse sind in Tabelle 14 zusammengefasst.

Tabelle 14: Leberwerte

	Gesamt (n = 61)	TOL (n = 8)	MIN (n = 12)	ST (n = 28)	HD (n = 7)	REJ (n = 6)	p-Wert
ASAT (U/l)	28 (10-119)	35 (23-48)	27 (18-38)	26 (10-63)	36 (26-119)	45 (40-95)	< 0,001*
normwertig ¹	54 (88,5)	8 (100)	12 (100)	27 (96,4)	4 (57,1)	3 (50,0)	0,001*
ALAT (U/l)	22 (10-275)	29 (14-50)	19 (10-33)	19 (11-70)	30 (10-275)	83 (53-151)	0,001*
normwertig ²	48 (78,7)	7 (87,5)	11 (91,7)	25 (89,3)	5 (71,4)	6 (100)	< 0,001*
gGT (U/l)	32 (10-328)	43 (14-300)	20 (10-328)	34 (13-163)	42 (14-146)	105 (26-164)	0,111
normwertig ³	38 (62,3)	5 (62,5)	9 (75,0)	18 (64,3)	4 (57,1)	2 (33,3)	0,542
AP (U/l)	86 (36-378)	83 (48-154)	90 (48-221)	78 (36-378)	86 (59-174)	101 (86-164)	0,450
normwertig ⁴	46 (75,4)	6 (75,0)	10 (83,3)	21 (75,0)	5 (71,4)	4 (66,7)	0,949
Bilirubin total (mg/dl)	0,55 (0,28-42,1)	0,72 (0,42-1,68)	0,50 (0,28-1,30)	0,55 (0,28-42,1)	0,76 (0,40-1,95)	0,58 (0,35-1,33)	0,209
normwertig ⁵	52 (85,2)	6 (75,0)	11 (91,7)	26 (92,9)	4 (57,1)	5 (83,3)	0,149
Quick (%)	96 (24-123)	94 (63-116)	97 (24-120)	97 (24-121)	87 (66-111)	103 (80-123)	0,828
normwertig ⁶	55 (90,2)	7 (87,5)	11 (91,7)	25 (89,3)	6 (85,7)	6 (100)	0,920

Alle metrischen Daten werden als Median (Minimum-Maximum) und die Normwertigkeit als absolute Zahlen (prozentualer Anteil) angegeben, p-Werte für den Vergleich aller Studiengruppen angegeben, signifikante Ergebnisse mit * gekennzeichnet, n = Anzahl der Patienten, laborspezifische Normwerte (für gesunde Probanden): ¹ für Männer < 50 U/l beziehungsweise für Frauen < 35 U/l, ² für Männer < 41 U/l beziehungsweise für Frauen < 31 U/l, ³ für Männer 8 bis 61 U/l beziehungsweise für Frauen 5 bis 36 U/l, ⁴ für Männer 40 bis 130 U/l beziehungsweise für Frauen 35 bis 105 U/l, ⁵ < 1,2 mg/dl, ⁶ 70 bis 130 %.

3.3 Frequenz der CD4⁺ T-Zellen mit demethylierter TSDR

3.3.1 Demethylierung der TSDR

Es konnten 60 Patienten im Labor hinsichtlich der prozentualen Demethylierung der TSDR analysiert werden, da für eine Probe (MIN-Gruppe) die Analyse der CD4⁺ Zellen ohne Ergebnis blieb und somit nicht für die Demethylierungsberechnung berücksichtigt werden konnte.

Es zeigte sich kein signifikanter Unterschied im Vergleich aller fünf Gruppen, jedoch eine Tendenz zu einer erhöhten Frequenz an CD4⁺ T-Zellen mit demethylierter TSDR bei Patienten der TOL-Gruppe ($p = 0,539$, Abbildung 17).

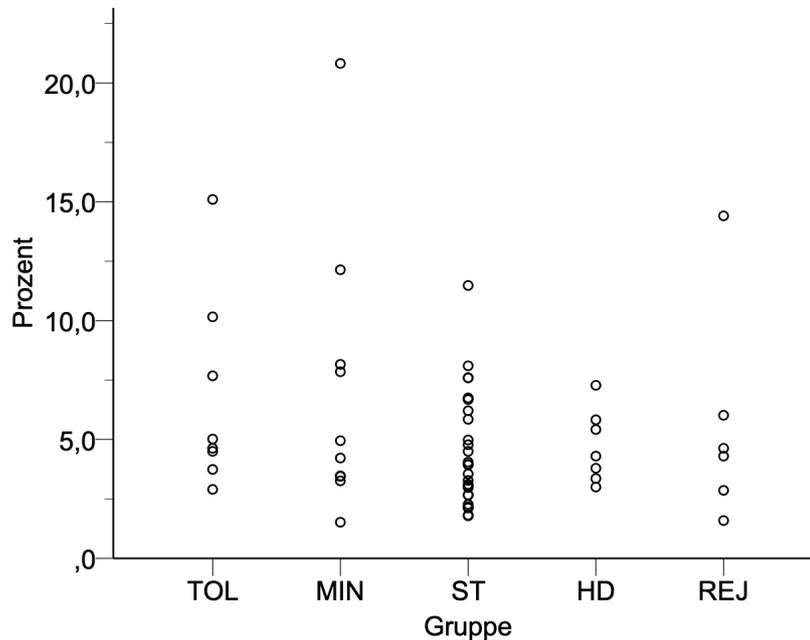


Abbildung 17: Frequenz der CD4⁺ T-Zellen mit demethylierter TSDR ($p = 0,539$).

Dabei unterschied sich die TOL-Gruppe (4,8 (2,9-15,1) %) im direkten Vergleich weder von der MIN-Gruppe (4,2 (1,5-20,8) %; $p > 0,999$) noch von der ST-Gruppe (3,9 (1,8-11,5) %; $p = 0,424$), der HD-Gruppe (4,3 (3,0-7,3) %; $p > 0,999$) oder der REJ-Gruppe (4,5 (1,6-14,4); $p > 0,999$).

3.3.2 Evaluation möglicher Einflussfaktoren

Es zeigte sich keine signifikante Korrelation zwischen der Frequenz an CD4⁺ T-Zellen mit demethylierter TSDR und möglichen Einflussfaktoren wie dem Alter der Patienten ($p = 0,659$), dem Alter bei der Transplantation ($p = 0,696$), der Zeit seit der Transplantation ($p = 0,688$), dem Geschlecht ($p = 0,709$), dem Inflammationsgrad ($p = 0,837$), dem Fibrorestadium ($p = 0,472$), dem Verfettungsgrad ($p = 0,448$) und der Anzahl vorangegangener Rejektionsepisoden ($p = 0,160$).

4. Diskussion

Bei allen Fortschritten bleibt bisher die limitierte Abschätzbarkeit der individuell idealen Immunsuppressionstiefe hinsichtlich erwünschter und unerwünschter Wirkungen eine Schwachstelle bei der Betreuung lebertransplantierte Patienten. Hier muss es das Ziel sein, den behandelnden Ärzten praxistaugliche Parameter an die Hand zu geben, um sich nicht weiter nach dem Trial-and-Error-Prinzip an eine minimal akzeptierte Dosis heranzutasten.

Darüber hinaus vertreten viele Experten die Meinung, dass eine minimale immunsuppressive Monotherapie dem kompletten Absetzen der Immunsuppressiva überlegen sein könnte, indem sie geringe Nebenwirkungen verursacht, aber subklinische Entzündungsreaktionen des Transplantats besser kontrolliert [132, 133].

4.1 Wahl des Studiendesigns

Die vorliegende Arbeit untersuchte die klinischen Besonderheiten operational toleranter Patienten einschließlich der Frequenz an CD4⁺ T-Zellen mit demethylierter TSDR sowie des Transplantatzustands im Vergleich zu Patienten mit stabiler Transplantatfunktion unter immunsuppressiver Therapie verschiedener Dosierung und Patienten mit später Rejektion.

Es existiert eine Reihe von Studien, die bereits klinische und experimentelle Besonderheiten operational toleranter Patienten ausmachen konnten. Diese Studien basierten jedoch regelhaft auf dem Vergleich zu gesunden Probanden oder Patienten, bei denen ein Absetzversuch keinen Erfolg zeigte und die daraufhin als „nicht-tolerant“ deklariert worden sind [10, 18, 72, 73, 75, 77-87, 92, 95, 134]. Dieses Vorgehen erlaubte zweifelsfrei eine gute Trennschärfe, ließ jedoch verschiedene Aspekte außer Acht. Eine Betrachtung der Patientengruppe, für die in Zukunft eine Entscheidung hinsichtlich des Absetzens der immunsuppressiven Therapie getroffen werden soll, erfolgte dabei nicht. Zudem ist bei einem solchen Studiendesign der Einfluss der provozierten Rejektionsepisode ebenso wenig auszuschließen wie der Einfluss der Immunsuppression, welche bei den „Nicht-Toleranten“ wieder angesetzt wurde [75, 94, 135].

Die Berliner Kohorte erlaubte die praxisnahe Betrachtung von operational toleranter Patienten im Vergleich zu Patienten mit stabiler Transplantatfunktion unter Immunsuppression, ohne dass diese zuvor eine provozierte Rejektionsepisode erlitten.

Es könnten sich unter den Patienten mit Immunsuppression dadurch ebenfalls tolerante Patienten befinden. Die Unterteilung nach der Immunsuppressionstiefe ermöglichte jedoch, der Frage nachzugehen, inwiefern sich die nach klinischer Erfahrung möglichst minimal angesetzte Dosis als Surrogatparameter für ein Toleranzniveau eignet, das nicht dichotom, sondern kontinuierlich zwischen den beiden Extremen tolerant und nicht-tolerant aufspannbar ist und inwiefern Patienten unter minimaler Immunsuppression oder gänzlich ohne Immunsuppression hinsichtlich des Transplantatzustandes mehr profitieren.

Neben der Betrachtung klinischer und laborchemischer Einflussfaktoren auf die Immuntoleranz sollte der Einfluss der epigenetischen Modifizierung der TSDR des FoxP3-Gens untersucht werden, indem die nTreg durch Messung der FoxP3-TSDR-Demethylierung mittels Real Time PCR quantifiziert wurden. Diese Methode hat sich im Vergleich zu durchflusszytometrischen, immunhistochemischen oder Genexpressions-Analysen durch die hohe quantitative Präzision als überlegen gezeigt [97, 101, 110, 117, 121].

Wesentliche limitierende Faktoren dieses Studiendesigns stellten die partiell retrospektive Datenerhebung sowie die begrenzte Patientenzahl dar. Insbesondere die retrospektive Auswertung der Biopsiebefunde zeigte zum Teil erhebliche Schwankungen der Qualität und fehlende Daten bei einem Teil der Studienpopulation. Es gibt bisher wenige operational tolerante Patienten, die nach einer LTX ohne Immunsuppression auskommen. Obwohl nach Möglichkeit operational tolerante Patienten im Untersuchungszeitraum vollständig eingeschlossen wurden, blieb ihre Zahl gering. Eine Patientengruppe zeichnete sich durch eine stattfindende späte Rejektion aus. Daher ist davon auszugehen, dass die gemessenen Blutwerte dieser Patienten beeinflusst wurden und zudem ein Teil dieser Patienten vor der Blutentnahme eine Steroidstoßtherapie erhielt.

4.2 Diskussion der Ergebnisse

4.2.1 Demografische Parameter als Prädiktoren operationaler Toleranz

In der vorliegenden Arbeit konnte, bis auf die definitionsgemäß fehlende Immunsuppression, kein Alleinstellungsmerkmal der operational toleranten Patienten hinsichtlich des Geschlechts, der Grunderkrankung, des Auftretens eines HCC, des

Retransplantationsstatus, des Patientenalters, des Alters bei der Transplantation und der Zeit seit der Transplantation identifiziert werden.

Im Gegensatz dazu nannten ältere Studien das männliche Geschlecht oder die fehlende Notwendigkeit einer Retransplantation als toleranzassoziierte Faktoren [10, 83, 91]. Zudem beschreibt die Literatur eine längere Zeit nach der Transplantation als wesentlichen Faktor der Entwicklung von Toleranz [10, 18, 73, 75, 78, 84-87].

Auch in der Berliner Kohorte konnte für die Patienten nach später akuter Rejektion ein kürzerer Zeitabstand seit Transplantation nachgewiesen werden. Jedoch unterschieden sich die operational toleranten Patienten nicht von den Patienten unter Immunsuppression bei stabiler Transplantatfunktion. Eine Erklärung für die differenten Ergebnisse im Vergleich zu den vorgenannten Studien könnte sein, dass sich unter den Patienten mit stabiler Transplantatfunktion und immunsuppressiver Therapie auch Tolerante befanden, die nicht als solche klassifiziert wurden. Dann wäre jedoch davon auszugehen, dass die Patienten unter minimaler Immunsuppression die längste und die Patienten unter hochdosierter Immunsuppression eher eine kürzere Zeit seit der Transplantation zeigten. Dies war nicht der Fall. Daher liefert diese Arbeit Hinweise, dass die Zeit seit der Transplantation vielmehr ein Parameter zu sein scheint, der es vermag, Patienten zu identifizieren, die nur sehr vorsichtig von einer hohen Dosis reduziert werden sollten und weniger vermag, Patienten zu identifizieren, die eine Toleranz aufweisen.

In der Literatur wird ein höheres Patientenalter ab 60 Jahren [10, 78, 85, 88] und ein höheres Alter bei der Transplantation [75] als Charakteristikum operational toleranter Patienten beschrieben, während die Berliner Kohorte operational toleranter Patienten, wenn auch ohne Signifikanz, im Vergleich zu den anderen Gruppen eher ein jüngeres Alter und ein jüngeres Alter zum Zeitpunkt der Transplantation aufwies. Sicherlich sollten das Alter des Patienten, das Alter bei der Transplantation und die Zeit seit der Transplantation in Zusammenschau betrachtet werden, da diese voneinander abhängig sind. Denn je jünger ein Patient transplantiert wurde und je älter ein Patient wird, desto länger liegt seine Transplantation zurück.

Daher muss einschränkend in Betracht gezogen werden, dass sich unter den operational toleranten Patienten, die in diese Studie eingeschlossen werden konnten, eher jüngere Patienten befanden und so gegebenenfalls einen Zusammenhang zur Zeit seit der Transplantation maskiert wurde. Es mag zusätzlich an der geringen

Patientenzahl liegen, dass demografisch keine Unterschiede der operational toleranten Patienten aufgezeigt werden konnten.

4.2.2 Einfluss früherer Rejektionsepisoden

Publizierte Daten zeigten wenige bis keine Rejektionen in der Vergangenheit als Charakteristikum toleranter Patienten [18, 75, 86]. Die erhobenen Daten der Berliner Kohorte konnten dies nicht eindeutig bestätigen. Vorangegangene Rejektionen scheinen eine mögliche Toleranzentwicklung nicht signifikant zu beeinflussen oder gar zu verhindern. Ob frühe Rejektionsepisoden im ersten oder späte Rejektionen nach dem ersten Jahr post transplantationem den wesentlicheren Einfluss auf den Langzeitverlauf haben, wird kontrovers diskutiert. Denn einige Studien zeigten, dass insbesondere Rejektionen nach mehr als einem halben Jahr post transplantationem mit einem höheren Risiko für ein Transplantatversagen und das Versterben des Patienten vergesellschaftet sind [91, 136], während andere Studien für Rejektionen innerhalb eines Jahres post transplantationem ein schlechteres Patienten- und Transplantatüberleben beobachten konnten [135]. Deshalb wurde bei der Auswertung für die Berliner Kohorte zwischen Rejektionsepisoden im ersten und nach dem ersten Jahr post transplantationem unterschieden. Patienten der REJ-Gruppe zeigten nicht nur zum Zeitpunkt der Studie eine Rejektion, sondern auch im ersten Jahr nach Transplantation eine höhere Zahl an Rejektionsepisoden, ohne dass eine eindeutige Tendenz signifikant darstellbar war. Aus den Ergebnissen lässt sich ableiten, dass in der Berliner Kohorte entweder kein Unterschied zwischen den Gruppen existierte oder die Patientenzahl zu gering war, um diesen Unterschied nachzuweisen. Aus diesem Grund kann die Frage, ob sich die operational Toleranten durch ihre Rejektionshistorie von den übrigen Patienten unterscheiden, mit den vorliegenden Daten nicht abschließend geklärt werden. In diesem Kontext ist auch anzumerken, dass die Immunsuppressionstiefe, welche über die Gruppenzuteilung entschied, nicht seit Transplantation und damit zum Zeitpunkt der Rejektionsepisode bestand. Gleichsam kann nicht ausgeschlossen werden, dass Patienten nach einer einstigen Rejektion eine tiefere Immunsuppression erhielten, als sie eigentlich benötigten.

4.2.3 Histologische Befunde und operationale Toleranz

Zum Zeitpunkt der histologischen Untersuchung konnten bei keinem der Patienten Zeichen einer akuten oder chronischen Rejektion beobachtet werden, jedoch fanden sich bei einem Teil der Berliner Kohorte diskrete Inflammationszeichen, Fibrosezeichen oder eine Verfettung des Transplantatgewebes. Dabei konnten für die operational toleranten Patienten keine signifikanten Unterschiede im direkten Vergleich zu den anderen Gruppen festgestellt werden. Doch es zeichnete sich ein Trend zu geringerer entzündlicher Aktivität im Transplantat bei Patienten mit minimaler Immunsuppression ab. Dies deutet an, dass eine minimale Immunsuppressionstiefe dem vollständigen Weaning in Hinblick auf die Inflammation überlegen sein könnte.

In früheren Studien konnte bei einem relevanten Anteil von bis zu 50 % der lebertransplantierten Patienten im Langzeitverlauf eine subklinische Entzündung, die zu einer Transplantatfibrose bis Zirrhose führen kann, beobachtet werden, ohne dass diese Patienten laborchemisch eine Affektion der Leberfunktion aufwiesen [9, 73]. Daher betonten verschiedene Autoren die Bedeutung wiederholter Biopsien in der Nachbeobachtung lebertransplantierten Patienten [73, 86, 137]. Feng et al. sowie Yoshitomi et al. untersuchten jeweils pädiatrische Patienten nach Leberlebendspenden und verglichen die histologischen Befunde toleranter Patienten mit denen, die im Rahmen eines Absetzversuches eine Rejektion erlitten und wieder eine immunsuppressive Therapie erhielten. Feng et al. konnten an einer sehr kleinen Kohorte von 12 Toleranten und 8 Patienten mit Immunsuppression sowohl nach zwei als auch vier Jahren bezüglich der Transplantatinfektion und -fibrose keinen Unterschied zum histologischen Befund des Studienstarts ausmachen [75, 92]. Dagegen konnten Yoshitomi et al. zwei Jahre nach vollständigem Absetzen in der Biopsie toleranter Patienten eine signifikant ausgeprägtere Fibrose im Vergleich zu Patienten unter Immunsuppression nachweisen [138]. Dazu muss einschränkend angemerkt werden, dass bei Yoshitomi die beiden Gruppen bezüglich des Alters bei der Transplantation nicht vergleichbar waren. Zudem handelte es sich bei beiden Studienkohorten um Patienten mit Leberlebendspenden im Kindesalter. Da Kinder mit einer weit häufigeren Frequenz einen toleranten Status aufweisen, sind diese Ergebnisse von Kindern nicht direkt auf Erwachsene übertragbar [92]. Etwas später wurden Arbeiten veröffentlicht, die erwachsene lebertransplantierte Patienten nach einem Absetzungsversuch histologisch untersuchten. Benitez konnte für HCV-negative

tolerante Patienten nach 12 Monaten, jedoch nicht mehr nach 36 Monaten, eine signifikant stärker ausgeprägte portale Inflammation und Interface-Hepatitis im Vergleich zur Startbiopsie identifizieren [10]. Selbst wenn es sich in diesem Fall nur um eine transiente Inflammation gehandelt haben soll, zeigte eine Reihe anderer Studien, dass sich der Toleranz-Status nicht bei allen Patienten stabil hält, sondern dass immer wieder scheinbar tolerante Patienten nach Jahren eine Rejektionsepisode erleben können [79, 83, 139].

Für die Berliner Kohorte stellte die gefundene entzündliche Aktivität nur eine Momentaufnahme dar. Es bleibt unklar, ob es sich dabei um vorübergehende Erscheinungen handelt. Doch lassen sich daraus zwei Überlegungen grundsätzlich ableiten: Zum einen zeigen diese Ergebnisse das entzündliche Potenzial der Transplantate scheinbar operational toleranter Patienten und werfen die Frage nach der Favorisierung der minimalen Dosis statt des kompletten Absetzens auf. In weiteren Studien könnte mit einer größeren Fallzahl das Outcome der Patienten mit minimaler Immunsuppression gegen jenes der toleranten Patienten verglichen werden. Zum anderen offenbarten auch die an der Berliner Kohorte erhobenen Daten eine relevante Divergenz zwischen den Entzündungszeichen im Gewebe und den Entzündungszeichen im peripheren Blut. Obwohl die operational Toleranten in Anbetracht der Immunzellzusammensetzung im peripheren Blut vermeintlich weniger Anzeichen einer Entzündung präsentierten, konnte die histologische Begutachtung des Transplantats selbst das Gegenteil aufzeigen.

Dies stützt den Hinweis anderer Autoren, dass sich Biomarker im peripheren Blut nicht immer auf die Situation im Gewebe übertragen lassen und insbesondere eine entzündliche Schädigung des Transplantats momentan einzig durch die Biopsie zweifelsfrei ausgeschlossen und überwacht werden kann [73, 86, 137, 140-142]. Bei allen Vorteilen der Messungen im peripheren Blut wie der unkomplizierten, komplikationsarmen und nicht-invasiven Materialgewinnung, zeigt sich auch ihre Unsicherheit hinsichtlich der Übertragbarkeit auf die Situation im Transplantat selbst. Daher bedarf es zwingend histologischer Kontrollen bei der Erforschung der operationalen Toleranz. Aktuell wird dazu eine große Studie im Vereinigten Königreich durchgeführt (LIFT, Clinicaltrials.gov Identifikationsnummer NCT02498977).

4.2.4 Allgemeine klinische Laborwerte als mögliche Prädiktoren

Die Berliner Kohorte operational toleranter Patienten zeichnete sich durch eine höhere Zahl zirkulierenden Lymphozyten sowie eine höhere Zahl der CD3⁺ und CD8⁺ T-Zellen aus. Da die übrigen Patienten unter dem Einfluss einer immunsuppressiven Medikation standen, lässt sich dieser Unterschied jedoch durch die fehlende Suppression der Lymphozytenpopulationen bei den operational toleranten Patienten erklären [33, 143], denn die eingesetzten Immunsuppressiva bewirken letztlich alle eine Hemmung der Lymphozyten, insbesondere der T-Zell-Funktion und -Proliferation [30, 60, 61, 66, 67]. Die Daten der Berliner Kohorte zeigten, dass alle Patienten, die eine immunsuppressive Therapie erhielten, unabhängig von der Dosis vergleichbare Zahlen der Lymphozyten und ihrer CD3⁺, CD4⁺, CD8⁺ Subpopulationen aufwiesen. Bereits eine minimale Dosis scheint zu genügen, um die Zellzahl um den Bereich der unteren Normgrenze zu supprimieren. Hinsichtlich des dosisabhängig steigenden Ausmaßes der immunsuppressiven Nebenwirkungen kann dies als Hinweis gesehen werden, eine minimale Dosis zu favorisieren und wenn möglich, großzügiger auf eine minimale Dosis zu reduzieren.

Granulozyten spielen eine eminente Rolle für die Entzündungsreaktion im Rahmen einer Rejektion [7, 15], sodass die Patienten mit akuter später Rejektionsepisode erwartungsgemäß eine höhere Zahl zirkulierender Granulozyten im Vergleich zu den operational toleranten Patienten aufwiesen. Auch wenn sich letztlich keine signifikanten Unterschiede zwischen den übrigen Gruppen zeigten, war eine höhere Granulozytenzahl bei Patienten mit minimaler Immunsuppression im Vergleich zu operational toleranten Patienten ersichtlich. Gemessen an dem Entzündungsparameter Granulozyten im peripheren Blut sahen operational Tolerante also normwertiger aus als die anderen Gruppen. Bei der Betrachtung der unter Immunsuppression stabilen Patienten ließ sich eine tendenziell zunehmende Suppression der Granulozyten mit steigender Dosis beobachten. Es bleibt ungeklärt, ob es sich hierbei um eine myelotoxische Nebenwirkung handelte [30, 62].

Die Blutplättchen besitzen eine essenzielle Bedeutung für die Hämostase. Darüber hinaus wurde aber auch eine Bedeutung für Reparaturvorgänge des Gewebes, für das Immunsystem im Rahmen von Inflammationsreaktionen und insbesondere T-Zell-vermittelte Rejektionen sowie eine gut untersuchte Rolle für das Ischämie-

Reperfusionssyndrom in der frühen Phase nach Organtransplantation beschrieben [144-147]. Über die Thrombozytenzahl operational toleranter Patienten im Langzeitverlauf nach einer LTX finden sich jedoch in der Literatur bisher keine Aussagen.

Die Berliner Kohorte operational toleranter Patienten zeichnete sich durch eine statistisch signifikant geringere Zahl zirkulierender Thrombozyten im Vergleich zur Standard-Gruppe aus. Inwiefern sich dies zur Identifikation operational toleranter Patienten verwenden lässt, sollte an größeren Studien überprüft und in Zusammenschau mit anderen Markern evaluiert werden.

Hintergründe dieser reduzierten Thrombozytenzahl bleiben zu klären. Die Milzgröße als möglicher Einflussfaktor wurde in der vorliegenden Arbeit nicht erfasst. In der Literatur finden sich Studien zu anderen Organtransplantaten, die auf eine Interaktion zwischen Thrombozyten und anderen Immunzellen über Mediatoren wie Interferon-gamma oder Thromboxan hinwiesen. So zeigten verschiedene Arbeitsgruppen am Mausmodell, dass Rejektionen von Knochenmarks- oder Hauttransplantaten durch Thrombozytenvermittelte T-Zell-Aktivierung getriggert werden können [148]. Möglicherweise steht demnach die Thrombozytopenie in Zusammenhang mit der Toleranz eines Lebertransplantats. Die Übertragbarkeit dieser Erkenntnisse bedarf der Untersuchung durch weitere Studien an lebertransplantierten Patienten, wobei auch funktionelle Untersuchungen der Thrombozyten durchgeführt werden sollten.

4.2.5 Leberwerte und operationale Toleranz

Es konnte in früheren Studien gezeigt werden, dass die operational Toleranten nach Absetzen der immunsuppressiven Therapie eine stabile Transplantatfunktion aufweisen [72, 92, 149, 150]. Eine Studiengruppe konnte nach drei Jahren bei operational Toleranten sogar eine signifikant bessere Leberfunktion bezüglich des Bilirubins sowie signifikant bessere Leberwerte bezüglich der ASAT, der ALAT, der gGT und der AP feststellen [82]. Jedoch unterzogen diese Studien ihre Patienten zuvor einem Weaning, um die Toleranten von den Nicht-Toleranten zu unterscheiden, indem eine provozierte Rejektionsepisode Letztere demaskierte. Der damit einhergehende Anstieg der Leberwerte normalisierte sich unter erneut eingeleiteter immunsuppressiver Therapie wieder [9, 72, 78, 81, 92, 134, 149, 150]. Allerdings kann der Einfluss einer solchen Rejektion auf den Transplantatzustand nicht ausgeschlossen werden [75, 94, 135].

Operational tolerante Patienten der Berliner Kohorte zeigten kein Alleinstellungsmerkmal hinsichtlich der Leberwerte. Erwartungsgemäß besaßen jene Patienten, welche zum Studienzeitpunkt eine akute Rejektionsepisode durchliefen, erhöhte Enzymaktivitäten der ASAT und ALAT [151]. Obwohl sich kein signifikanter Unterschied zwischen den Gruppen zeigte, konnten im Vergleich zu den operational Toleranten geringere ASAT- und ALAT-Enzymaktivitäten bei den Patienten unter minimaler Immunsuppression beobachtet werden. Dies weist darauf hin, dass eine minimale Immunsuppression möglicherweise sicherer als ein komplettes Absetzen der Immunsuppression sein könnte.

4.2.6 Demethylierung der TSDR als Prädiktor operationaler Toleranz

Für die Bestimmung der Frequenz an Treg mittels der TSDR-Demethylierungsmessung existieren bisher nur wenig Daten für operational tolerante Patienten nach einer LTX. Zuerst konnte bei operational toleranten Patienten nach Nierentransplantation ein signifikant erhöhter Anteil an CD4⁺ T-Zellen mit TSDR-Demethylierung sowohl im Vergleich zu Patienten mit stabiler Transplantatfunktion unter Immunsuppression als auch im Vergleich zu gesunden Probanden beobachtet werden [104]. Doch lassen sich Erkenntnisse von Nierentransplantierten nicht automatisch auf Lebertransplantierte übertragen [142].

Kürzlich untersuchten Revilla-Nuin et al. die Frequenz der Treg anhand der TSDR-Demethylierung in einer spanischen Kohorte lebertransplantierten Patienten. Sie verglichen 24 Patienten, die im Rahmen von Absetzstudien erfolgreich ihre immunsuppressive Therapie beendeten mit 23 Patienten, die im Rahmen von Absetzstudien eine Rejektion erlitten und ihre immunsuppressive Medikation wieder aufnehmen mussten [87]. Die operational Toleranten zeigten im direkten Vergleich zu den Nicht-Toleranten eine signifikant höhere Frequenz an CD4⁺ T-Zellen mit demethylierter TSDR [87]. Dabei bleibt unklar, inwiefern diese Ergebnisse auf die Grundgesamtheit der lebertransplantierten Patienten übertragen werden können, da bei der genaueren Betrachtung dieser Studienkohorte auffällt, dass ein ungewöhnlich hoher Anteil von 92 % der operational Toleranten und 83 % der Nicht-Toleranten männlichen Geschlechts war. Die Grundgesamtheit dominieren zwar auch die männlichen Lebertransplantierten, das Verhältnis liegt hier aber eher bei zwei Drittel zu einem Drittel [152]. Außerdem zeigten sich die Gruppen heterogen bezüglich der

Grunderkrankungen und des Zeitabstands zwischen Transplantation und Weaning-Start.

Die an der Berliner Kohorte quantifizierten Anteile der Treg bezogen auf die Gesamtzellpopulation der CD4⁺ Zellen waren hinsichtlich ihres Wertebereichs mit der vorbeschriebenen Untersuchung an lebertransplantierten Patienten von Revilla-Nuin et al. vergleichbar [87]. Auch die Berliner Kohorte toleranter Patienten zeichnete sich durch eine erhöhte Frequenz an CD4⁺ T-Zellen mit demethylierter TSDR aus. Jedoch war der Unterschied bei limitierter Patientenzahl statistisch nicht signifikant. Interessanterweise zeigten nicht alle operational tolerante Patienten einen hohen oder höheren Anteil an Treg bezogen auf die Gesamtzellpopulation der CD4⁺ Zellen. Dies weist darauf hin, dass auch andere Mechanismen existieren müssen, die zu der Entwicklung einer Toleranz beitragen. In Hinblick auf das immunologische Gleichgewicht sind einerseits eine Limitierung aktivierender immunologischer Faktoren und andererseits die Effekte anderer regulatorischer Faktoren wie beispielsweise gamma-delta-T-Zellen oder tolerogene Mechanismen der hepatischen Mikroumgebung denkbar [108, 153]. Zudem erschwerten starke Überschneidungen der Messwerte zwischen den Gruppen eine eindeutige Abgrenzung und weisen darauf hin, dass die Bestimmung des Anteils an Treg keine alleinige Differenzierungsmerkmal der toleranten Patienten sein kann, sondern nur im Verbund mit anderen Markern eine Konklusion erlauben kann.

Insbesondere die Patienten unter minimaler Immunsuppression zeigten auch die höchste Streuung. Daher ist zu diskutieren, inwiefern manche Patienten mit sehr hohen TSDR-Werten auch ohne Immunsuppression auskommen würden und andere die minimale Dosis benötigen, um keine Rejektion zu erleiden. Dies bietet sich an, als weiterführende prospektive Studie zu evaluieren. Die weitere Beobachtung der Patienten der Berliner Kohorte mit sehr hohem Anteil an CD4⁺ T-Zellen mit demethylierter TSDR oder ihr Einschluss in eine Absetzstudie könnte hinsichtlich der Entwicklung eines Toleranzstatus weitere wichtige Erkenntnisse bringen und lässt gleichzeitig eine Betrachtung der TSDR-Demethylierung nicht nur als Momentaufnahme, sondern im zeitlichen Verlauf zu.

Die hohe TSDR-Demethylierung der CD4⁺ T-Zellen bei Patienten mit später Rejektion im Vergleich zu den Patienten mit stabiler Transplantatfunktion unter immunsuppressiver Therapie könnte partiell durch den Einfluss von Malignomen auf die TSDR-Demethylierung erklärt werden. Denn für eine Reihe von Malignomen konnte ein

Zusammenhang zu einer höheren Frequenz an Treg hergestellt werden [154-156]. Auch für das HCC konnte gezeigt werden, dass der Anteil an Treg mittels Messung der TSDR-Demethylierung im Tumorgewebe und im Blut HCC-erkrankter Patienten höher ausfällt und zudem bei diesen Patienten ein Zusammenhang zwischen der Zahl der Treg und der Mortalität besteht [157, 158]. In der Berliner Kohorte konnte, wenn auch ohne Signifikanz, vor Transplantation häufiger ein HCC bei Patienten mit akuter später Rejektion beobachtet werden. Grundsätzlich besteht die Hypothese, dass eine höhere Frequenz der Treg auch die Tumorgenese fördere, indem sie die Aktivität malignomreaktiver T-Zellen inhibieren würde [97, 159]. Zudem könnte bei den Patienten mit Rejektion diese gerade dadurch begünstigt worden sein, dass der betreuende Arzt die Immunsuppressionstiefe möglichst gering gewählt hat, um das Wiederauftreten des HCC oder der viralen Grunderkrankung weniger zu provozieren.

Ein möglicher Einfluss der immunsuppressiven Therapie auf die Zahl der CD4⁺ Zellen mit TSDR-Demethylierung kann nicht ausgeschlossen werden. In früheren Studien wurde bereits ausgeführt, dass einzelne Wirkstoffe spezifische Wirkung auch auf die Treg zeigen. So wurde für mTOR-Inhibitoren ein neutraler bis positiver Effekt und für Calcineurininhibitoren ein negativer Effekt auf die Zahl und Funktion der Treg beschrieben [66, 69, 160, 161].

5. Schlussfolgerungen und Ausblick

Mit der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass sich operational tolerante Patienten hinsichtlich der Thrombozytenzahl sowie der Frequenz der CD3⁺ und CD8⁺ Zellen von den übrigen Patienten unterscheiden. Darüber hinaus fanden sich Hinweise, dass auch die Frequenz der CD4⁺ T-Zellen mit demethylierter TSDR ein geeigneter Unterscheidungsparameter sein könnte. Die Daten deuteten aber auch darauf hin, dass nicht ein singulärer, sondern eher eine Kombination verschiedener Marker operational tolerante Patienten am besten zu identifizieren vermag.

Hinsichtlich der Immunzellzusammensetzung im peripheren Blut sahen die operational toleranten Patienten im Vergleich zu den übrigen Gruppen normwertiger aus und zeigten weniger Anzeichen einer Entzündung. Konträr dazu offenbarte die histologische Analyse des Transplantats, dass die Patienten unter minimaler Immunsuppression eine geringere Inflammation aufwiesen. Auch hinsichtlich der Leberfunktion zeichneten sich tendenziell bessere Werte unter der minimalen Immunsuppression ab. Damit deutete sich insgesamt an, dass eine minimale Dosis dem Weaning in Hinblick auf den Transplantatzustand überlegen sein könnte und das komplette Absetzen der Immunsuppression als priorisiertes Ziel kritisch überdacht werden sollte. Um dies endgültig zu belegen, sind weitere Untersuchungen an größeren Kohorten notwendig. Zudem sollten weitere epigenetische Faktoren in Betracht gezogen werden, um noch detaillierter die Immunzellzusammensetzung im Blut operational toleranter Patienten nach einer LTX charakterisieren zu können. Die weitere Beobachtung der Berliner Kohorte unter Hinzunahme detaillierter Analysen der Immunzellpopulation hinsichtlich ihres Einflusses auf die Toleranz befindet sich in Planung. Ein weiterer Einschluss operational toleranter Patienten wäre dabei sinnvoll und beispielsweise könnte ein multizentrisches Design die Patientenzahl steigern.

Literaturverzeichnis

- [1] Wiegand J, Berg T. The etiology, diagnosis and prevention of liver cirrhosis: part 1 of a series on liver cirrhosis. *Dtsch Arztebl Int.* 2013;110(6):85-91.
- [2] Deutsche Stiftung Organtransplantation. Jahresbericht 2019. 2020.
- [3] Jochmans I, van Rosmalen M, Pirenne J, Samuel U. Adult Liver Allocation in Eurotransplant. *Transplantation.* 2017;101(7):1542-50.
- [4] Murphy K, Weaver C. *Janeway Immunologie.* 9. Aufl. Berlin: Springer Spektrum, 2018.
- [5] Adams DH, Sanchez-Fueyo A, Samuel D. From immunosuppression to tolerance. *J Hepatol.* 2015;62(1):170-85.
- [6] Razonable RR, Findlay JY, O'Riordan A, Burroughs SG, Ghobrial RM, Agarwal B, Davenport A, Gropper M. Critical care issues in patients after liver transplantation. *Liver Transpl.* 2011;17(5):511-27.
- [7] Neil DA, Hubscher SG. Current views on rejection pathology in liver transplantation. *Transpl Int.* 2010;23(10):971-83.
- [8] Suhling H, Gottlieb J, Bara C, Taubert R, Jackel E, Schiffer M, Brasen JH. [Chronic rejection: Differences and similarities in various solid organ transplants]. *Internist (Berl).* 2016;57(1):25-37.
- [9] Hubscher SG. What is the long-term outcome of the liver allograft? *J Hepatol.* 2011;55(3):702-17.
- [10] Benitez C, Londono MC, Miquel R, Manzia TM, Abraldes JG, Lozano JJ, Martinez-Llordella M, Lopez M, Angelico R, Bohne F, Sese P, Daoud F, Larcier P, Roelen DL, Claas F, Whitehouse G, Lerut J, Pirenne J, Rimola A, Tisone G, Sanchez-Fueyo A. Prospective multicenter clinical trial of immunosuppressive drug withdrawal in stable adult liver transplant recipients. *Hepatology.* 2013;58(5):1824-35.
- [11] Cicinnati V, Maschmeier M, Schmidt H, Beckebaum S. Lebertransplantation – Immunsuppression, Kurz- und Langzeitverlauf. *Gastroenterologie up2date.* 2018;14(01):23-37.
- [12] Ku MY, Trotter JF. Chapter 29 - Liver Transplantation In: McNally PR, editor. *GI/Liver Secrets Plus.* 4th ed. Philadelphia: Mosby; 2010. p. 207-16.
- [13] Ali JM, Bolton EM, Bradley JA, Pettigrew GJ. Allorecognition pathways in transplant rejection and tolerance. *Transplantation.* 2013;96(8):681-8.
- [14] Bishop GA, Ierino FL, Sharland AF, Hall BM, Alexander SI, Sandrin MS, Coates PT, McCaughan GW. Approaching the promise of operational tolerance in clinical transplantation. *Transplantation.* 2011;91(10):1065-74.

- [15] Demetris AJ, Bellamy C, Hubscher SG, O'Leary J, Randhawa PS, Feng S, Neil D, Colvin RB, McCaughan G, Fung JJ, Del Bello A, Reinholt FP, Haga H, Adeyi O, Czaja AJ, Schiano T, Fiel MI, Smith ML, Sebagh M, Tanigawa RY, Yilmaz F, Alexander G, Baiocchi L, Balasubramanian M, Batal I, Bhan AK, Bucuvalas J, Cerski CTS, Charlotte F, de Vera ME, ElMonayeri M, Fontes P, Furth EE, Gouw ASH, Hafezi-Bakhtiari S, Hart J, Honsova E, Ismail W, Itoh T, Jhala NC, Khettry U, Klintmalm GB, Knechtle S, Koshiba T, Kozlowski T, Lassman CR, Lerut J, Levitsky J, Licini L, Liotta R, Mazariegos G, Minervini MI, Misdraji J, Mohanakumar T, Molne J, Nasser I, Neuberger J, O'Neil M, Pappo O, Petrovic L, Ruiz P, Sagol O, Sanchez Fueyo A, Sasatomi E, Shaked A, Shiller M, Shimizu T, Sis B, Sonzogni A, Stevenson HL, Thung SN, Tisone G, Tsamandas AC, Wernerson A, Wu T, Zeevi A, Zen Y. 2016 Comprehensive Update of the Banff Working Group on Liver Allograft Pathology: Introduction of Antibody-Mediated Rejection. *Am J Transplant.* 2016;16(10):2816-35.
- [16] Girnita A, Mazariegos GV, Castellaneta A, Reyes J, Bentlejewski C, Thomson AW, Zeevi A. Liver transplant recipients weaned off immunosuppression lack circulating donor-specific antibodies. *Hum Immunol.* 2010;71(3):274-6.
- [17] Iacob S, Cicinnati VR, Lindemann M, Heinemann FM, Radtke A, Kaiser GM, Kabar I, Schmidt HH, Baba HA, Beckebaum S. Donor-Specific Anti-HLA Antibodies and Endothelial C4d Deposition-Association With Chronic Liver Allograft Failure. *Transplantation.* 2015;99(9):1869-75.
- [18] Vionnet J, Sanchez-Fueyo A. Biomarkers of immune tolerance in liver transplantation. *Hum Immunol.* 2018;79(5):388-94.
- [19] Simpson MA. Liver Transplant Graft Histology, Cellular Infiltrates, and Peripheral Donor Specific Antibodies (DSA): Independent Observations or Interrelated Effectors? *Transplantation.* 2019.
- [20] Vionnet J, Sempoux C, Pascual M, Sanchez-Fueyo A, Colmenero J. Donor-specific antibodies in liver transplantation. *Gastroenterol Hepatol.* 2020;43(1):34-45.
- [21] Bishop GA, McCaughan GW. Immune activation is required for the induction of liver allograft tolerance: implications for immunosuppressive therapy. *Liver Transpl.* 2001;7(3):161-72.
- [22] Banff schema for grading liver allograft rejection: an international consensus document. *Hepatology.* 1997;25(3):658-63.
- [23] Stift J, Dienes H. Leberbiopsie nach Transplantation. *Journal für Gastroenterologische und Hepatologische Erkrankungen.* 2014;12(2):18-25.
- [24] Desmet VJ, Gerber M, Hoofnagle JH, Manns M, Scheuer PJ. Classification of chronic hepatitis: diagnosis, grading and staging. *Hepatology.* 1994;19(6):1513-20.
- [25] Schirmacher P, Fleig WE, Dienes HP. Biopsische Diagnostik der chronischen Hepatitis. *Z Gastroenterol.* 2004;42(2):175-85.

- [26] Groth CG, Brent LB, Calne RY, Dausset JB, Good RA, Murray JE, Shumway NE, Schwartz RS, Starzl TE, Terasaki PI, Thomas ED, van Rood JJ. Historic landmarks in clinical transplantation: conclusions from the consensus conference at the University of California, Los Angeles. *World J Surg.* 2000;24(7):834-43.
- [27] Dausset J. Iso-leuco-anticorps. *Acta Haematol.* 1958;20(1-4):156-66.
- [28] Gibson T, Medawar PB. The fate of skin homografts in man. *J Anat.* 1943;77(4):299-310.
- [29] Merrill JP, Murray JE, Harrison JH, Guild WR. Successful homotransplantation of the human kidney between identical twins. *Journal of the American Medical Association.* 1956;160(4):277-82.
- [30] Beimler J, Morath C, Zeier M. Moderne Immunsuppression nach Organtransplantation. *Internist.* 2014;55(2):212-22.
- [31] Colombo D, Ammirati E. Cyclosporine in transplantation - a history of converging timelines. *J Biol Regul Homeost Agents.* 2011;25(4):493-504.
- [32] Deutsche Stiftung Organtransplantation. Tätigkeitsbericht 2018. 2019.
- [33] Zeng Q, Yuan XY, Li W, Liu BW, Zhao X, Ren GJ, Wang Y, Dou J, Wang GY. Effects of tacrolimus (FK506) and mycophenolate mofetil (MMF) on regulatory T cells and co-inhibitory receptors in the peripheral blood of human liver allograft patients. *Immunopharmacol Immunotoxicol.* 2019;41(3):380-5.
- [34] Beckebaum S, Cicinnati VR, Radtke A, Kabar I. Calcineurin inhibitors in liver transplantation - still champions or threatened by serious competitors? *Liver Int.* 2013;33(5):656-65.
- [35] Ciesek S, Manns M, Strassburg C. Folgeerkrankungen nach Organtransplantation. *Internist.* 2006;47(3):252-65.
- [36] Mittler J, Lang H. Entwicklungen der Immunmodulation nach Transplantation im Hinblick auf De-novo-Malignome und Tumorrezidive. *Der Onkologe.* 2016;22(7):461-8.
- [37] Pfitzmann R, Klupp J, Langrehr JM, Neuhaus R, Junge G, Settmacher U, Steinmüller T, Neuhaus P. Mycophenolate mofetil reduces calcineurin inhibitor-induced side effects after liver transplantation. *Transplant Proc.* 2002;34(7):2936-7.
- [38] Saner FH, Cicinnati VR, Sotiropoulos G, Beckebaum S. Strategies to prevent or reduce acute and chronic kidney injury in liver transplantation. *Liver Int.* 2012;32(2):179-88.
- [39] Fairfield C, Penninga L, Powell J, Harrison EM, Wigmore SJ. Glucocorticosteroid-free versus glucocorticosteroid-containing immunosuppression for liver transplanted patients. *Cochrane Database Syst Rev.* 2018;4(4):CD007606.

- [40] Lerut J. Minimalization of immunosuppression in liver transplantation: steps from 'how' to 'now'. Interview by Emily Reeve. *Expert Rev Clin Immunol*. 2012;8(7):605-7.
- [41] Lerut JP, Pinheiro RS, Lai Q, Stouffs V, Orlando G, Juri JM, Ciccarelli O, Sempoux C, Roggen FM, De Reyck C, Latinne D, Gianello P. Is minimal, [almost] steroid-free immunosuppression a safe approach in adult liver transplantation? Long-term outcome of a prospective, double blind, placebo-controlled, randomized, investigator-driven study. *Ann Surg*. 2014;260(5):886-91; discussion 91-2.
- [42] Moench C, Barreiros AP, Schuchmann M, Bittinger F, Thiesen J, Hommel G, Kraemer I, Otto G. Tacrolimus monotherapy without steroids after liver transplantation--a prospective randomized double-blinded placebo-controlled trial. *Am J Transplant*. 2007;7(6):1616-23.
- [43] Sgourakis G, Radtke A, Fouzas I, Mylona S, Goumas K, Gockel I, Lang H, Karaliotas C. Corticosteroid-free immunosuppression in liver transplantation: a meta-analysis and meta-regression of outcomes. *Transpl Int*. 2009;22(9):892-905.
- [44] Feng S. Long-term management of immunosuppression after pediatric liver transplantation: is minimization or withdrawal desirable or possible or both? *Curr Opin Organ Transplant*. 2008;13(5):506-12.
- [45] Pedersen M, Seetharam A. Infections after orthotopic liver transplantation. *J Clin Exp Hepatol*. 2014;4(4):347-60.
- [46] van Hoek B, de Rooij BJ, Verspaget HW. Risk factors for infection after liver transplantation. *Best Pract Res Clin Gastroenterol*. 2012;26(1):61-72.
- [47] Fagioli S, Colli A, Bruno R, Craxi A, Gaeta GB, Grossi P, Mondelli MU, Puoti M, Sagnelli E, Stefani S, Toniutto P, Burra P, Group AST. Management of infections pre- and post-liver transplantation: report of an AISF consensus conference. *J Hepatol*. 2014;60(5):1075-89.
- [48] Romero FA, Razonable RR. Infections in liver transplant recipients. *World J Hepatol*. 2011;3(4):83-92.
- [49] Aberg F, Pukkala E, Hockerstedt K, Sankila R, Isoniemi H. Risk of malignant neoplasms after liver transplantation: a population-based study. *Liver Transpl*. 2008;14(10):1428-36.
- [50] Engels EA, Pfeiffer RM, Fraumeni JF, Jr., Kasiske BL, Israni AK, Snyder JJ, Wolfe RA, Goodrich NP, Bayakly AR, Clarke CA, Copeland G, Finch JL, Fleissner ML, Goodman MT, Kahn A, Koch L, Lynch CF, Madeleine MM, Pawlish K, Rao C, Williams MA, Castenson D, Curry M, Parsons R, Fant G, Lin M. Spectrum of cancer risk among US solid organ transplant recipients. *JAMA*. 2011;306(17):1891-901.

- [51] Grulich AE, van Leeuwen MT, Falster MO, Vajdic CM. Incidence of cancers in people with HIV/AIDS compared with immunosuppressed transplant recipients: a meta-analysis. *The Lancet*. 2007;370(9581):59-67.
- [52] Haagsma EB, Hagens VE, Schaapveld M, van den Berg AP, de Vries EG, Klompmaker IJ, Slooff MJ, Jansen PL. Increased cancer risk after liver transplantation: a population-based study. *J Hepatol*. 2001;34(1):84-91.
- [53] Rademacher S, Seehofer D, Eurich D, Schoening W, Neuhaus R, Oellinger R, Denecke T, Pascher A, Schott E, Sinn M, Neuhaus P, Pratschke J. The 28-year incidence of de novo malignancies after liver transplantation: A single-center analysis of risk factors and mortality in 1616 patients. *Liver Transpl*. 2017;23(11):1404-14.
- [54] Buell JF, Brock GN. Risk of cancer in liver transplant recipients: a look into the mirror. *Liver Transpl*. 2008;14(11):1561-3.
- [55] Davidson J, Wilkinson A, Dantal J, Dotta F, Haller H, Hernandez D, Kasiske BL, Kiberd B, Krentz A, Legendre C, Marchetti P, Markell M, van der Woude FJ, Wheeler DC, International Expert P. New-onset diabetes after transplantation: 2003 International consensus guidelines. Proceedings of an international expert panel meeting. Barcelona, Spain, 19 February 2003. *Transplantation*. 2003;75(10 Suppl):SS3-24.
- [56] Heisel O, Heisel R, Balshaw R, Keown P. New onset diabetes mellitus in patients receiving calcineurin inhibitors: a systematic review and meta-analysis. *Am J Transplant*. 2004;4(4):583-95.
- [57] Ojo AO, Held PJ, Port FK, Wolfe RA, Leichtman AB, Young EW, Arndorfer J, Christensen L, Merion RM. Chronic renal failure after transplantation of a nonrenal organ. *N Engl J Med*. 2003;349(10):931-40.
- [58] Sharma P, Welch K, Eikstadt R, Marrero JA, Fontana RJ, Lok AS. Renal outcomes after liver transplantation in the model for end-stage liver disease era. *Liver Transpl*. 2009;15(9):1142-8.
- [59] Ziolkowski J, Paczek L, Senatorski G, Niewczas M, Oldakowska-Jedynak U, Wyzgal J, Sanko-Resmer J, Pilecki T, Zieniewicz K, Nyckowski P, Patkowski W, Krawczyk M. Renal function after liver transplantation: calcineurin inhibitor nephrotoxicity. *Transplant Proc*. 2003;35(6):2307-9.
- [60] Bentley R. Mycophenolic Acid: a one hundred year odyssey from antibiotic to immunosuppressant. *Chem Rev*. 2000;100(10):3801-26.
- [61] Sollinger HW. Mycophenolates in transplantation. *Clin Transplant*. 2004;18(5):485-92.
- [62] Placebo-controlled study of mycophenolate mofetil combined with cyclosporin and corticosteroids for prevention of acute rejection. European Mycophenolate Mofetil Cooperative Study Group. *Lancet*. 1995;345(8961):1321-5.

- [63] Koch RO, Graziadei IW, Schulz F, Nachbaur K, Königsrainer A, Margreiter R, Vogel W. Long-term efficacy and safety of mycophenolate mofetil in liver transplant recipients with calcineurin inhibitor-induced renal dysfunction. *Transpl Int.* 2004;17(9):518-24.
- [64] Lopez-Solis R, DeVera M, Steel J, Fedorek S, Sturdevant M, Hughes C, Humar A. Gastrointestinal side effects in liver transplant recipients taking enteric-coated mycophenolate sodium vs. mycophenolate mofetil. *Clin Transplant.* 2014;28(7):783-8.
- [65] Coscia LA, Armenti DP, King RW, Sifontis NM, Constantinescu S, Moritz MJ. Update on the Teratogenicity of Maternal Mycophenolate Mofetil. *J Pediatr Genet.* 2015;4(2):42-55.
- [66] Dummer CD, Carpio VN, Goncalves LF, Manfro RC, Veronese FV. FOXP3+ regulatory T cells: from suppression of rejection to induction of renal allograft tolerance. *Transpl Immunol.* 2012;26(1):1-10.
- [67] Steurer W. Immunsuppression nach Lebertransplantation - Eine Balance zwischen Effizienz und Toxizität. *Hepatitis&more.* 2007;2:24-6.
- [68] Geissler EK, Schnitzbauer AA, Zülke C, Lamby PE, Proneth A, Duvoux C, Burra P, Jauch KW, Rentsch M, Ganten TM, Schmidt J, Settmacher U, Heise M, Rossi G, Cillo U, Kneteman N, Adam R, van Hoek B, Bachellier P, Wolf P, Rostaing L, Bechstein WO, Rizell M, Powell J, Hidalgo E, Gugenheim J, Wolters H, Brockmann J, Roy A, Mutzbauer I, Schlitt A, Beckebaum S, Graeb C, Nadalin S, Valente U, Turrión VS, Jamieson N, Scholz T, Colledan M, Fändrich F, Becker T, Söderdahl G, Chazouillères O, Mäkisalo H, Pageaux GP, Steininger R, Soliman T, de Jong KP, Pirenne J, Margreiter R, Pratschke J, Pinna AD, Hauss J, Schreiber S, Strasser S, Klempnauer J, Troisi RI, Bhoori S, Lerut J, Bilbao I, Klein CG, Königsrainer A, Mirza DF, Otto G, Mazzaferro V, Neuhaus P, Schlitt HJ. Sirolimus Use in Liver Transplant Recipients With Hepatocellular Carcinoma: A Randomized, Multicenter, Open-Label Phase 3 Trial. *Transplantation.* 2016;100(1):116-25.
- [69] Grigg SE, Sarri GL, Gow PJ, Yeomans ND. Systematic review with meta-analysis: sirolimus- or everolimus-based immunosuppression following liver transplantation for hepatocellular carcinoma. *Aliment Pharmacol Ther.* 2019;49(10):1260-73.
- [70] Holdaas H, De Simone P, Zuckermann A. Everolimus and Malignancy after Solid Organ Transplantation: A Clinical Update. *J Transplant.* 2016;2016:4369574.
- [71] Dean PG, Lund WJ, Larson TS, Prieto M, Nyberg SL, Ishitani MB, Kremers WK, Stegall MD. Wound-healing complications after kidney transplantation: a prospective, randomized comparison of sirolimus and tacrolimus. *Transplantation.* 2004;77(10):1555-61.
- [72] Manzia TM, Angelico R, Toti L, Angelico C, Quaranta C, Parente A, Blasi F, Iesari S, Sforza D, Baiocchi L, Lerut J, Tisone G. Longterm Survival and Cost-

Effectiveness of Immunosuppression Withdrawal After Liver Transplantation. *Liver Transpl.* 2018;24(9):1199-208.

- [73] Clavien PA, Muller X, de Oliveira ML, Dutkowski P, Sanchez-Fueyo A. Can immunosuppression be stopped after liver transplantation? *Lancet Gastroenterol Hepatol.* 2017;2(7):531-7.
- [74] Sanchez-Fueyo A. Identification of tolerant recipients following liver transplantation. *Int Immunopharmacol.* 2010;10(12):1501-4.
- [75] Feng S, Bucuvalas J. Tolerance after liver transplantation: Where are we? *Liver Transpl.* 2017;23(12):1601-14.
- [76] Reyes J, Zeevi A, Ramos H, Tzakis A, Todo S, Demetris AJ, Nour B, Nalesnik M, Trucco M, Abu-Elmagd K, et al. Frequent achievement of a drug-free state after orthotopic liver transplantation. *Transplant Proc.* 1993;25(6):3315-9.
- [77] Bohne F, Londoño MC, Benítez C, Miquel R, Martínez-Llordella M, Russo C, Ortiz C, Bonaccorsi-Riani E, Brander C, Bauer T, Protzer U, Jaeckel E, Taubert R, Fornis X, Navasa M, Berenguer M, Rimola A, Lozano JJ, Sánchez-Fueyo A. HCV-induced immune responses influence the development of operational tolerance after liver transplantation in humans. *Sci Transl Med.* 2014;6(242):242ra81.
- [78] de la Garza RG, Sarobe P, Merino J, Lasarte JJ, D'Avola D, Belsue V, Delgado JA, Silva L, Inarrairaegui M, Sangro B, Sola JJ, Pardo F, Quiroga J, Herrero JI. Trial of complete weaning from immunosuppression for liver transplant recipients: factors predictive of tolerance. *Liver Transpl.* 2013;19(9):937-44.
- [79] Girlanda R, Rela M, Williams R, O'Grady JG, Heaton ND. Long-term outcome of immunosuppression withdrawal after liver transplantation. *Transplant Proc.* 2005;37(4):1708-9.
- [80] Jucaud V, Shaked A, DesMarais M, Sayre P, Feng S, Levitsky J, Everly MJ. Prevalence and Impact of De Novo Donor-Specific Antibodies During a Multicenter Immunosuppression Withdrawal Trial in Adult Liver Transplant Recipients. *Hepatology.* 2019;69(3):1273-86.
- [81] Manzia TM, Angelico R, Baiocchi L, Toti L, Ciano P, Palmieri G, Angelico M, Orlando G, Tisone G. The Tor Vergata weaning of immunosuppression protocols in stable hepatitis C virus liver transplant patients: the 10-year follow-up. *Transpl Int.* 2013;26(3):259-66.
- [82] Tisone G, Orlando G, Cardillo A, Palmieri G, Manzia TM, Baiocchi L, Lionetti R, Anselmo A, Toti L, Angelico M. Complete weaning off immunosuppression in HCV liver transplant recipients is feasible and favourably impacts on the progression of disease recurrence. *J Hepatol.* 2006;44(4):702-9.
- [83] Tryphonopoulos P, Ruiz P, Weppler D, Nishida S, Levi DM, Moon J, Tekin A, Velez M, Neuman DR, Island E, Selvaggi G, Tzakis AG. Long-term follow-up of 23 operational tolerant liver transplant recipients. *Transplantation.* 2010;90(12):1556-61.

- [84] Sanchez-Fueyo A. Strategies for minimizing immunosuppression: State of the Art. *Liver Transpl.* 2016;22(S1):68-70.
- [85] Angelico R, Parente A, Manzia TM. Using a weaning immunosuppression protocol in liver transplantation recipients with hepatocellular carcinoma: a compromise between the risk of recurrence and the risk of rejection? *Transl Gastroenterol Hepatol.* 2017;2:74.
- [86] Lerut J, Sanchez-Fueyo A. An appraisal of tolerance in liver transplantation. *Am J Transplant.* 2006;6(8):1774-80.
- [87] Revilla-Nuin B, de Bejar A, Martinez-Alarcon L, Herrero JI, Martinez-Caceres CM, Ramirez P, Baroja-Mazo A, Pons JA. Differential profile of activated regulatory T cell subsets and microRNAs in tolerant liver transplant recipients. *Liver Transpl.* 2017;23(7):933-45.
- [88] Ramji A, Yoshida EM, Bain VG, Kneteman NM, Scudamore CH, Ma MM, Steinbrecher UP, Gutfreund KS, Erb SR, Partovi N, Chung SW, Shapiro J, Wong WW. Late acute rejection after liver transplantation: the Western Canada experience. *Liver Transpl.* 2002;8(10):945-51.
- [89] McTaggart RA, Terrault NA, Vardanian AJ, Bostrom A, Feng S. Hepatitis C etiology of liver disease is strongly associated with early acute rejection following liver transplantation. *Liver Transpl.* 2004;10(8):975-85.
- [90] Sanchez-Fueyo A, Strom TB. Immunologic basis of graft rejection and tolerance following transplantation of liver or other solid organs. *Gastroenterology.* 2011;140(1):51-64.
- [91] Uemura T, Ikegami T, Sanchez EQ, Jennings LW, Narasimhan G, McKenna GJ, Randall HB, Chinnakotla S, Levy MF, Goldstein RM, Klintmalm GB. Late acute rejection after liver transplantation impacts patient survival. *Clin Transplant.* 2008;22(3):316-23.
- [92] Feng S, Ekong UD, Lobritto SJ, Demetris AJ, Roberts JP, Rosenthal P, Alonso EM, Philogene MC, Ikle D, Poole KM, Bridges ND, Turka LA, Tchao NK. Complete immunosuppression withdrawal and subsequent allograft function among pediatric recipients of parental living donor liver transplants. *Jama.* 2012;307(3):283-93.
- [93] Levitsky J, Feng S. Tolerance in clinical liver transplantation. *Hum Immunol.* 2018;79(5):283-7.
- [94] Veerappan A, VanWagner LB, Mathew JM, Huang X, Miller J, Lapin B, Levitsky J. Low incidence of acute rejection in hepatitis B virus positive liver transplant recipients and the impact of hepatitis B immunoglobulin. *Hum Immunol.* 2016;77(4):367-74.
- [95] Pons JA, Revilla-Nuin B, Baroja-Mazo A, Ramirez P, Martinez-Alarcon L, Sanchez-Bueno F, Robles R, Rios A, Aparicio P, Parrilla P. FoxP3 in peripheral blood is associated with operational tolerance in liver transplant patients during immunosuppression withdrawal. *Transplantation.* 2008;86(10):1370-8.

- [96] Sakaguchi S, Sakaguchi N, Shimizu J, Yamazaki S, Sakihama T, Itoh M, Kuniyasu Y, Nomura T, Toda M, Takahashi T. Immunologic tolerance maintained by CD25+ CD4+ regulatory T cells: their common role in controlling autoimmunity, tumor immunity, and transplantation tolerance. *Immunol Rev.* 2001;182:18-32.
- [97] Lu L, Barbi J, Pan F. The regulation of immune tolerance by FOXP3. *Nat Rev Immunol.* 2017;17(11):703-17.
- [98] Sakaguchi S, Sakaguchi N, Asano M, Itoh M, Toda M. Immunologic self-tolerance maintained by activated T cells expressing IL-2 receptor alpha-chains (CD25). Breakdown of a single mechanism of self-tolerance causes various autoimmune diseases. *J Immunol.* 1995;155(3):1151-64.
- [99] Zheng SG, Wang J, Wang P, Gray JD, Horwitz DA. IL-2 is essential for TGF-beta to convert naive CD4+CD25- cells to CD25+Foxp3+ regulatory T cells and for expansion of these cells. *J Immunol.* 2007;178(4):2018-27.
- [100] Sakaguchi S. Naturally arising Foxp3-expressing CD25+CD4+ regulatory T cells in immunological tolerance to self and non-self. *Nat Immunol.* 2005;6(4):345-52.
- [101] Wieczorek G, Asemussen A, Model F, Turbachova I, Floess S, Liebenberg V, Baron U, Stauch D, Kotsch K, Pratschke J, Hamann A, Loddenkemper C, Stein H, Volk HD, Hoffmuller U, Grutzkau A, Mustea A, Huehn J, Scheibenbogen C, Olek S. Quantitative DNA methylation analysis of FOXP3 as a new method for counting regulatory T cells in peripheral blood and solid tissue. *Cancer Res.* 2009;69(2):599-608.
- [102] Alessandrini A, Turka LA. FOXP3-Positive Regulatory T Cells and Kidney Allograft Tolerance. *Am J Kidney Dis.* 2017;69(5):667-74.
- [103] Li W, Kuhr CS, Zheng XX, Carper K, Thomson AW, Reyes JD, Perkins JD. New insights into mechanisms of spontaneous liver transplant tolerance: the role of Foxp3-expressing CD25+CD4+ regulatory T cells. *Am J Transplant.* 2008;8(8):1639-51.
- [104] Braza F, Dugast E, Panov I, Paul C, Vogt K, Pallier A, Chesneau M, Baron D, Guerif P, Lei H, Laplaud DA, Volk HD, Degauque N, Giral M, Souillou JP, Sawitzki B, Brouard S. Central Role of CD45RA- Foxp3hi Memory Regulatory T Cells in Clinical Kidney Transplantation Tolerance. *J Am Soc Nephrol.* 2015;26(8):1795-805.
- [105] Hu M, Wang YM, Wang Y, Zhang GY, Zheng G, Yi S, O'Connell PJ, Harris DC, Alexander SI. Regulatory T cells in kidney disease and transplantation. *Kidney Int.* 2016;90(3):502-14.
- [106] Lei H, Reinke P, Volk HD, Lv Y, Wu R. Mechanisms of Immune Tolerance in Liver Transplantation-Crosstalk Between Alloreactive T Cells and Liver Cells With Therapeutic Prospects. *Front Immunol.* 2019;10:2667.

- [107] Li Y, Koshiba T, Yoshizawa A, Yonekawa Y, Masuda K, Ito A, Ueda M, Mori T, Kawamoto H, Tanaka Y, Sakaguchi S, Minato N, Wood KJ, Tanaka K. Analyses of peripheral blood mononuclear cells in operational tolerance after pediatric living donor liver transplantation. *Am J Transplant.* 2004;4(12):2118-25.
- [108] Martinez-Llordella M, Puig-Pey I, Orlando G, Ramoni M, Tisone G, Rimola A, Lerut J, Latinne D, Margarit C, Bilbao I, Brouard S, Hernandez-Fuentes M, Souillou JP, Sanchez-Fueyo A. Multiparameter immune profiling of operational tolerance in liver transplantation. *Am J Transplant.* 2007;7(2):309-19.
- [109] Mohr A, Malhotra R, Mayer G, Gorochov G, Miyara M. Human FOXP3(+) T regulatory cell heterogeneity. *Clin Transl Immunology.* 2018;7(1):e1005.
- [110] Baron U, Floess S, Wieczorek G, Baumann K, Grutzkau A, Dong J, Thiel A, Boeld TJ, Hoffmann P, Edinger M, Turbachova I, Hamann A, Olek S, Huehn J. DNA demethylation in the human FOXP3 locus discriminates regulatory T cells from activated FOXP3(+) conventional T cells. *Eur J Immunol.* 2007;37(9):2378-89.
- [111] Freyer J. Regulation und funktionelle Rolle des murinen Transkriptionsfaktors Foxp3 in T-Zellen. 2008. Dissertation, Humboldt-Universität, Berlin.
- [112] Vent-Schmidt J, Han JM, MacDonald KG, Levings MK. The role of FOXP3 in regulating immune responses. *Int Rev Immunol.* 2014;33(2):110-28.
- [113] Barzaghi F, Passerini L, Gambineri E, Ciullini Mannurita S, Cornu T, Kang ES, Choe YH, Cancrini C, Corrente S, Ciccocioppo R, Cecconi M, Zuin G, Discepolo V, Sartirana C, Schmidtko J, Ikinciogullari A, Ambrosi A, Roncarolo MG, Olek S, Bacchetta R. Demethylation analysis of the FOXP3 locus shows quantitative defects of regulatory T cells in IPEX-like syndrome. *J Autoimmun.* 2012;38(1):49-58.
- [114] Hori S, Nomura T, Sakaguchi S. Control of regulatory T cell development by the transcription factor Foxp3. *Science.* 2003;299(5609):1057-61.
- [115] Polansky JK, Kretschmer K, Freyer J, Floess S, Garbe A, Baron U, Olek S, Hamann A, von Boehmer H, Huehn J. DNA methylation controls Foxp3 gene expression. *Eur J Immunol.* 2008;38(6):1654-63.
- [116] Chen Z, Lin F, Gao Y, Li Z, Zhang J, Xing Y, Deng Z, Yao Z, Tsun A, Li B. FOXP3 and RORgammat: transcriptional regulation of Treg and Th17. *Int Immunopharmacol.* 2011;11(5):536-42.
- [117] Mantel PY, Ouaked N, Ruckert B, Karagiannidis C, Welz R, Blaser K, Schmidt-Weber CB. Molecular mechanisms underlying FOXP3 induction in human T cells. *J Immunol.* 2006;176(6):3593-602.
- [118] Bird A. DNA methylation patterns and epigenetic memory. *Genes Dev.* 2002;16(1):6-21.
- [119] Bird A, Macleod D. Reading the DNA methylation signal. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol.* 2004;69:113-8.

- [120] Reik W, Dean W, Walter J. Epigenetic reprogramming in mammalian development. *Science*. 2001;293(5532):1089-93.
- [121] Floess S, Freyer J, Siewert C, Baron U, Olek S, Polansky J, Schlawe K, Chang HD, Bopp T, Schmitt E, Klein-Hessling S, Serfling E, Hamann A, Huehn J. Epigenetic control of the *foxp3* locus in regulatory T cells. *PLoS Biol*. 2007;5(2):e38.
- [122] Maeder ML, Angstman JF, Richardson ME, Linder SJ, Cascio VM, Tsai SQ, Ho QH, Sander JD, Reyon D, Bernstein BE, Costello JF, Wilkinson MF, Joung JK. Targeted DNA demethylation and activation of endogenous genes using programmable TALE-TET1 fusion proteins. *Nat Biotechnol*. 2013;31(12):1137-42.
- [123] Herman JG, Baylin SB. Gene silencing in cancer in association with promoter hypermethylation. *N Engl J Med*. 2003;349(21):2042-54.
- [124] Chopra SS, Eisele R, Guckelberger O, Mogl M, Grieser C, Neuhaus P, Denecke T. [Impact of duplex ultrasound on diagnosis and therapy of Lienalis Steal syndrome following liver transplantation]. *Ultraschall Med*. 2012;33(7):E366-E8.
- [125] Girometti R, Como G, Bazzocchi M, Zuiani C. Post-operative imaging in liver transplantation: state-of-the-art and future perspectives. *World J Gastroenterol*. 2014;20(20):6180-200.
- [126] KDIGO. Clinical Practice Guideline for the Evaluation and Management of Chronic Kidney Disease. *Kidney Int*. 2012;3(1).
- [127] Shapiro R, Braverman B, Louis JB, Servis RE. Nucleic acid reactivity and conformation. II. Reaction of cytosine and uracil with sodium bisulfite. *J Biol Chem*. 1973;248(11):4060-4.
- [128] Wang RY, Gehrke CW, Ehrlich M. Comparison of bisulfite modification of 5-methyldeoxycytidine and deoxycytidine residues. *Nucleic Acids Res*. 1980;8(20):4777-90.
- [129] Nordheim A, Knippers R. *Molekulare Genetik*. 11. Aufl. Thieme, 2018.
- [130] Applied Biosystems. Essentials of Real Time PCR. <https://www.thermofisher.com/de/de/home/life-science/pcr/real-time-pcr/real-time-pcr-learning-center/real-time-pcr-basics/essentials-real-time-pcr.html>, zuletzt abgerufen am 10.08.2020.
- [131] Riggs AD. X chromosome inactivation, differentiation, and DNA methylation revisited, with a tribute to Susumu Ohno. *Cytogenet Genome Res*. 2002;99(1-4):17-24.
- [132] Choudhary NS, Saigal S, Shukla R, Kotecha H, Saraf N, Soin AS. Current status of immunosuppression in liver transplantation. *J Clin Exp Hepatol*. 2013;3(2):150-8.

- [133] Londono MC, Rimola A, O'Grady J, Sanchez-Fueyo A. Immunosuppression minimization vs. complete drug withdrawal in liver transplantation. *J Hepatol.* 2013;59(4):872-9.
- [134] Shaked A, DesMarais MR, Kopetskie H, Feng S, Punch JD, Levitsky J, Reyes J, Klintmalm GB, Demetris AJ, Burrell BE, Priore A, Bridges ND, Sayre PH. Outcomes of immunosuppression minimization and withdrawal early after liver transplantation. *Am J Transplant.* 2019;19(5):1397-409.
- [135] Levitsky J, Goldberg D, Smith AR, Mansfield SA, Gillespie BW, Merion RM, Lok AS, Levy G, Kulik L, Abecassis M, Shaked A. Acute Rejection Increases Risk of Graft Failure and Death in Recent Liver Transplant Recipients. *Clin Gastroenterol Hepatol.* 2017;15(4):584-93.
- [136] Dogan N, Husing-Kabar A, Schmidt HH, Cicinnati VR, Beckebaum S, Kabar I. Acute allograft rejection in liver transplant recipients: Incidence, risk factors, treatment success, and impact on graft failure. *J Int Med Res.* 2018;46(9):3979-90.
- [137] Branco JC, Morbey A, Martins A, Barroso E. Tolerance After Liver Transplantation: Where Are We? *Liver Transpl.* 2018;24(9):1303-4.
- [138] Yoshitomi M, Koshihara T, Haga H, Li Y, Zhao X, Cheng D, Miyagawa A, Sakashita H, Tsuruyama T, Ohe H, Ueda M, Okamoto S, Egawa H, Wood K, Sakaguchi S, Manabe T, Tanaka K, Uemoto S. Requirement of protocol biopsy before and after complete cessation of immunosuppression after liver transplantation. *Transplantation.* 2009;87(4):606-14.
- [139] Mazariegos GV, Reyes J, Marino I, Flynn B, Fung JJ, Starzl TE. Risks and benefits of weaning immunosuppression in liver transplant recipients: long-term follow-up. *Transplant Proc.* 1997;29(1-2):1174-7.
- [140] Banff Working Group on Liver Allograft P. Importance of liver biopsy findings in immunosuppression management: biopsy monitoring and working criteria for patients with operational tolerance. *Liver Transpl.* 2012;18(10):1154-70.
- [141] Sarwal MM. Fingerprints of transplant tolerance suggest opportunities for immunosuppression minimization. *Clin Biochem.* 2016;49(4-5):404-10.
- [142] Schlickeiser S, Boes D, Streitz M, Sawitzki B. The use of novel diagnostics to individualize immunosuppression following transplantation. *Transpl Int.* 2015;28(8):911-20.
- [143] Stalder M, Birsan T, Holm B, Haririfar M, Scandling J, Morris RE. Quantification of immunosuppression by flow cytometry in stable renal transplant recipients. *Ther Drug Monit.* 2003;25(1):22-7.
- [144] Khandoga A, Hanschen M, Kessler JS, Krombach F. CD4+ T cells contribute to postischemic liver injury in mice by interacting with sinusoidal endothelium and platelets. *Hepatology.* 2006;43(2):306-15.

- [145] Lisman T, Porte RJ. The role of platelets in liver inflammation and regeneration. *Semin Thromb Hemost.* 2010;36(2):170-4.
- [146] Modjeski KL, Morrell CN. Small cells, big effects: the role of platelets in transplant vasculopathy. *J Thromb Thrombolysis.* 2014;37(1):17-23.
- [147] Swaim AF, Field DJ, Fox-Talbot K, Baldwin WM, 3rd, Morrell CN. Platelets contribute to allograft rejection through glutamate receptor signaling. *J Immunol.* 2010;185(11):6999-7006.
- [148] Spahn JH, Li W, Kreisel D. Innate immune cells in transplantation. *Current Opinion in Organ Transplantation.* 2014;19(1):14-9.
- [149] Ekong UD, Melin-Aldana H, Seshadri R, Lokar J, Harris D, Whittington PF, Alonso EM. Graft histology characteristics in long-term survivors of pediatric liver transplantation. *Liver Transpl.* 2008;14(11):1582-7.
- [150] Venturi C, Sempoux C, Quinones JA, Bourdeaux C, Hoyos SP, Sokal E, Reding R. Dynamics of allograft fibrosis in pediatric liver transplantation. *Am J Transplant.* 2014;14(7):1648-56.
- [151] Pons JA, Ramirez P, Revilla-Nuin B, Pascual D, Baroja-Mazo A, Robles R, Sanchez-Bueno F, Martinez L, Parrilla P. Immunosuppression withdrawal improves long-term metabolic parameters, cardiovascular risk factors and renal function in liver transplant patients. *Clin Transplant.* 2009;23(3):329-36.
- [152] Teegen EM, Krebs I, Langelotz C, Pratschke J, Rau B. Gender Mainstreaming and Transplant Surgery. *Visc Med.* 2016;32(4):286-9.
- [153] Jiang Y, Que W, Zhu P, Li XK. The Role of Diverse Liver Cells in Liver Transplantation Tolerance. *Front Immunol.* 2020;11:1203.
- [154] Ma H, Gao W, Sun X, Wang W. STAT5 and TET2 Cooperate to Regulate FOXP3-TSDR Demethylation in CD4(+) T Cells of Patients with Colorectal Cancer. *J Immunol Res.* 2018;2018:6985031.
- [155] Sherston SN, Vogt K, Schlickeiser S, Sawitzki B, Harden PN, Wood KJ. Demethylation of the TSDR is a marker of squamous cell carcinoma in transplant recipients. *Am J Transplant.* 2014;14(11):2617-22.
- [156] Zhou J, Hu Z, Zhang Q, Li Z, Xiang J, Yan S, Wu J, Zhang M, Zheng S. Spectrum of De Novo Cancers and Predictors in Liver Transplantation: Analysis of the Scientific Registry of Transplant Recipients Database. *PLoS One.* 2016;11(5):e0155179.
- [157] Gao Q, Qiu SJ, Fan J, Zhou J, Wang XY, Xiao YS, Xu Y, Li YW, Tang ZY. Intratumoral balance of regulatory and cytotoxic T cells is associated with prognosis of hepatocellular carcinoma after resection. *J Clin Oncol.* 2007;25(18):2586-93.

- [158] Liu HR, Li WM. Treg-specific demethylated region activity in isolated regulatory T lymphocytes is a surrogate for disease severity in hepatocellular carcinoma. *IUBMB Life*. 2015;67(5):355-60.
- [159] Martin F, Ladoire S, Mignot G, Apetoh L, Ghiringhelli F. Human FOXP3 and cancer. *Oncogene*. 2010;29(29):4121-9.
- [160] Akimova T, Kamath BM, Goebel JW, Meyers KE, Rand EB, Hawkins A, Levine MH, Bucuvalas JC, Hancock WW. Differing effects of rapamycin or calcineurin inhibitor on T-regulatory cells in pediatric liver and kidney transplant recipients. *Am J Transplant*. 2012;12(12):3449-61.
- [161] Schlickeiser S, Sawitzki B. Peripheral biomarkers for individualizing immunosuppression in transplantation--regulatory T cells. *Clin Chim Acta*. 2012;413(17-18):1406-13.

Eidesstattliche Versicherung

„Ich, Fabian Bergner, versichere an Eides statt durch meine eigenhändige Unterschrift, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema: Operationale Toleranz im Langzeitverlauf nach Lebertransplantation (Operational tolerance in the long-term follow-up after liver transplantation) selbstständig und ohne nicht offengelegte Hilfe Dritter verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel genutzt habe.

Alle Stellen, die wörtlich oder dem Sinne nach auf Publikationen oder Vorträgen anderer Autoren/innen beruhen, sind als solche in korrekter Zitierung kenntlich gemacht. Die Abschnitte zu Methodik (insbesondere praktische Arbeiten, Laborbestimmungen, statistische Aufarbeitung) und Resultaten (insbesondere Abbildungen, Graphiken und Tabellen) werden von mir verantwortet.

Meine Anteile an etwaigen Publikationen zu dieser Dissertation entsprechen denen, die in der untenstehenden gemeinsamen Erklärung mit dem/der Erstbetreuer/in, angegeben sind. Für sämtliche im Rahmen der Dissertation entstandenen Publikationen wurden die Richtlinien des ICMJE (International Committee of Medical Journal Editors; www.icmje.org) zur Autorenschaft eingehalten. Ich erkläre ferner, dass ich mich zur Einhaltung der Satzung der Charité – Universitätsmedizin Berlin zur Sicherung Guter Wissenschaftlicher Praxis verpflichte.

Weiterhin versichere ich, dass ich diese Dissertation weder in gleicher noch in ähnlicher Form bereits an einer anderen Fakultät eingereicht habe.

Die Bedeutung dieser eidesstattlichen Versicherung und die strafrechtlichen Folgen einer unwahren eidesstattlichen Versicherung (§§156, 161 des Strafgesetzbuches) sind mir bekannt und bewusst.“

Datum

Unterschrift

Bisher wurden keine Teile aus dieser Monographie publiziert.

Lebenslauf

Mein Lebenslauf wird aus datenschutzrechtlichen Gründen in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht veröffentlicht.

Publikationsliste

Rau B, Brandl A, Thuss-Patience P, Bergner F, Raue W, Arnold A, Horst D, Pratschke J, & Biebl M. The efficacy of treatment options for patients with gastric cancer and peritoneal metastasis. *Gastric cancer: official journal of the International Gastric Cancer Association and the Japanese Gastric Cancer Association*. 2019;22(6),1226–1237. <https://doi.org/10.1007/s10120-019-00969-1>

Danksagung

Für ihren Anteil an dem Projekt, ihre konstruktive Kritik und wertvollen Anregungen sowie für die Überlassung des Themas gilt mein besonderer Dank meinem Doktorvater PD Dr. med. Dennis Eurich sowie Dr. med. Eva Maria Dobrindt und Univ.-Prof. Dr. rer. nat. Birgit Sawitzki.

Außerdem danke ich dem Team im Labor des Instituts für medizinische Immunologie der Charité - Universitätsmedizin Berlin, im Besonderen Katrin Vogt sowie Christine Appelt, die immer ein offenes Ohr für meine Fragen hatten, für die stets hilfsbereite Unterstützung.

Zudem gilt mein Dank den Patienten, die an der Studie teilgenommen haben sowie den Mitarbeitern der Lebertransplantationsambulanz Campus Virchow Klinikum der Charité - Universitätsmedizin Berlin für die angenehme Zusammenarbeit und Akquisition des Untersuchungsmaterials.

Darüber hinaus möchte ich mich herzlich bei Dr. rer. nat. Konrad Neumann aus dem Institut für Biometrie und Klinische Epidemiologie für seine Beratung bedanken.

Meiner Familie danke ich für ihr Verständnis und ihre Unterstützung, die mir mein Studium und damit letztlich diese Arbeit ermöglichte.

Bescheinigung der statistischen Beratung



CharitéCentrum für Human- und Gesundheitswissenschaften

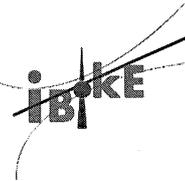
Charité | Campus Charité Mitte | 10117 Berlin

Institut für Biometrie und klinische Epidemiologie (iBikE)

Direktor: Prof. Dr. Geraldine Rauch

Postanschrift:
Charitéplatz 1 | 10117 Berlin
Besucheranschrift:
Reinhardtstr. 58 | 10117 Berlin

Tel. +49 (0)30 450 562171
geraldine.rauch@charite.de
<https://biometrie.charite.de/>



Name, Vorname: Bergner, Fabian
Emailadresse: [REDACTED]
Matrikelnummer: [REDACTED]
Promotionsbetreuer: PD Dr. Dennis Eurich
Promotionsinstitution/ Klinik: Klinik für Chirurgie

Bescheinigung

Hiermit bescheinige ich, dass *Herr Fabian Bergner* innerhalb der Service Unit Biometrie des Instituts für Biometrie und klinische Epidemiologie (iBikE) bei mir eine statistische Beratung zu einem Promotionsvorhaben wahrgenommen hat. Folgende Beratungstermine wurden wahrgenommen:

Termin 1: 26.03.2019

- Termin 2: 17.04.2019

Folgende wesentliche Ratschläge hinsichtlich einer sinnvolle Auswertung und Interpretation der Daten wurden während der Beratung erteilt:

- Statistische Tests: U-Test und Kruskal-Wallis Test
- Regressions- und Korrelationsanalyse
- Multiples Testen

Diese Bescheinigung garantiert nicht die richtige Umsetzung der in der Beratung gemachten Vorschläge, die korrekte Durchführung der empfohlenen statistischen Verfahren und die richtige Darstellung und Interpretation der Ergebnisse. Die Verantwortung hierfür obliegt allein dem Promovierenden. Das Institut für Biometrie und klinische Epidemiologie übernimmt hierfür keine Haftung.

Datum: 15.05.2019

Name des Beraters: Dr. Konrad Neumann

[REDACTED]
UNIVERSITÄTSMEDIZIN BERLIN
Charité
Institut für Biometrie und Klinische Epidemiologie
Campus Charité Mitte
Charitéplatz 1 | D-10117 Berlin
Besucheranschrift: Rahei-Hirsch-Weg 5