

Aus dem  
Akademischen Lehrkrankenhaus der Universität Tübingen  
Klinikum Stuttgart – Katharinenhospital  
Zentralinstitut für Klinische Chemie und Laboratoriumsmedizin

**Regulatorische T-Zellen (Treg) und klinische Ereignisse  
in den ersten 15 Monaten nach Nierentransplantation**

Inaugural-Dissertation zur Erlangung  
des Doktorgrades der Medizin

der Medizinischen Fakultät der  
Eberhard Karls Universität zu Tübingen

vorgelegt von

**Canzler, Ortrun Maria**

**2022**

Dekan: Professor Dr. B. Pichler

1. Berichterstatter: Professor Dr. E. Wieland

2. Berichterstatter: Privatdozent Dr. D. Schneidawind

Tag der Disputation: 31.03.2022

Meinem Mann und meinen beiden Töchtern

# Inhaltsverzeichnis

|         |  |    |
|---------|--|----|
| 1       | Einleitung.....                                    | 9  |
| 1.1     | Nierentransplantation.....                         | 9  |
| 1.1.1   | Historie der Nierentransplantation.....            | 9  |
| 1.1.2   | Leichennierenspende.....                           | 9  |
| 1.1.3   | Lebendnierenspende.....                            | 10 |
| 1.1.4   | ABO-inkompatible Transplantation.....              | 10 |
| 1.1.5   | Nierentransplantation in Deutschland.....          | 10 |
| 1.2     | Abstoßung und Toleranz.....                        | 11 |
| 1.2.1   | Humanes Leukozyten-Antigen-System.....             | 11 |
| 1.2.2   | Präformierte Antikörper.....                       | 12 |
| 1.2.3   | Donorspezifische Antikörper.....                   | 12 |
| 1.2.4   | Hyperakute/Perakute Rejektion.....                 | 12 |
| 1.2.5   | Akute Rejektion.....                               | 13 |
| 1.2.6   | Chronische Rejektion.....                          | 13 |
| 1.2.7   | Operationale Toleranz.....                         | 13 |
| 1.3     | Immunsuppression.....                              | 14 |
| 1.3.1   | Induktionstherapie.....                            | 14 |
| 1.3.1.1 | Antithymozyten Globulin.....                       | 14 |
| 1.3.1.2 | Basiliximab.....                                   | 15 |
| 1.3.1.3 | Rituximab.....                                     | 15 |
| 1.3.2   | Erhaltungstherapie.....                            | 15 |
| 1.3.2.1 | Calcineurininhibitoren.....                        | 15 |
| 1.3.2.2 | Mycophenolat Mofetil und Mycophenolat-Natrium..... | 16 |
| 1.3.2.3 | Glukokortikoide.....                               | 16 |
| 1.3.2.4 | mTOR-Inhibitoren.....                              | 17 |
| 1.3.3   | Therapie der Rejektion.....                        | 17 |
| 1.3.4   | Balance der Erhaltungstherapie.....                | 17 |
| 1.4     | Infektionen bei Nierentransplantierten.....        | 18 |
| 1.5     | T-regulatorische-Zellen.....                       | 18 |

|         |   |    |
|---------|---|----|
| 1.5.1   | Aufbau der T-Zellen.....  | 19 |
| 1.5.2   | T-Zell-Entwicklung.....   | 19 |
| 1.5.3   | Selektionsmechanismen.....                                      | 20 |
| 1.5.3.1 | Zentrale Selektion im Thymus.....                               | 20 |
| 1.5.3.2 | Periphere Toleranz.....   | 20 |
| 1.5.4   | Natürliche Treg und induzierte Treg.....                        | 21 |
| 1.5.5   | Marker der Treg.....  | 21 |
| 1.5.6   | FOXP3.....  | 22 |
| 1.5.7   | Aufbau FOXP3.....   | 23 |
| 1.5.8   | Transiente FOXP3-Produktion.....                                | 23 |
| 1.5.9   | Epigenetische Mechanismen.....                                  | 24 |
| 1.5.10  | Effekte der Treg.....   | 24 |
| 1.5.11  | Treg und ihre klinische Bedeutung.....                          | 25 |
| 1.5.12  | Messung der Treg.....   | 26 |
| 1.5.13  | Treg und Toleranz.....  | 27 |
| 1.6     | Biomarker in der Transplantationsmedizin.....                   | 27 |
| 1.7     | Fragestellung.....  | 28 |
| 2       | Material und Methoden.....                                      | 29 |
| 2.1     | Patienten.....  | 29 |
| 2.1.1   | Einschlusskriterien.....  | 29 |
| 2.1.2   | Ausschlusskriterien.....  | 29 |
| 2.1.3   | Aufklärung der Patienten.....                                   | 30 |
| 2.1.4   | Entnahme des EDTA-Vollbluts.....                                | 30 |
| 2.1.5   | Patientenkollektiv.....   | 30 |
| 2.1.6   | Medikamentöses Standardregime.....                              | 31 |
| 2.1.7   | Infektprophylaxe.....   | 31 |
| 2.1.8   | Therapie bei ABO-inkompatibler Lebendnierentransplantation..... | 33 |
| 2.1.9   | Visiten und klinische Ereignisse.....                           | 33 |
| 2.1.9.1 | Verzögerte Transplantatfunktion (delayed-graft function).....   | 34 |
| 2.1.9.2 | Funktionsverschlechterung.....                                  | 34 |
| 2.1.9.3 | Diagnostik und Therapie der Rejektion.....                      | 34 |
| 2.1.9.4 | Therapie der antikörpervermittelten Rejektion (humoral).....    | 34 |
| 2.1.9.5 | Therapie der Borderline-Rejektion.....                          | 35 |

|         |  |    |
|---------|--|----|
| 2.1.9.6 | Therapie der T-Zell vermittelten akuten Rejektion (zellulär) ..... | 35 |
| 2.1.9.7 | Therapie der steroidresistenten Rejektion .....                    | 35 |
| 2.2     | Messung der Treg und Prinzip der PCR/RT-PCR.....                   | 35 |
| 2.2.1   | Definition der Treg-Frequenz .....                                 | 39 |
| 2.2.2   | Besonderheit bei Frauen .....                                      | 39 |
| 2.2.3   | Durchführung der einzelnen Laborschritte .....                     | 39 |
| 2.2.3.1 | DNA-Isolation .....  | 39 |
| 2.2.3.2 | Bisulfitbehandlung .....   | 40 |
| 2.2.3.3 | RT-PCR .....   | 41 |
| 2.2.3.4 | Messung der Immunsuppressiva .....                                 | 42 |
| 2.2.3.5 | Statistik .....  | 42 |
| 2.2.3.6 | Sonstige Methoden .....  | 43 |
| 3       | Ergebnisse .....   | 44 |
| 3.1     | Treg-Frequenzen der Männer .....                                   | 44 |
| 3.2     | Treg-Frequenzen der Frauen.....                                    | 45 |
| 3.2.1   | Vergleich Treg-Frequenzen zwischen den Geschlechtern .....         | 46 |
| 3.3     | Immunologisches Risiko .....                                       | 47 |
| 3.3.1   | PRA und Treg .....   | 47 |
| 3.3.2   | dnDSA und Treg.....  | 47 |
| 3.3.3   | HLA-Mismatches und Treg .....                                      | 47 |
| 3.3.4   | Alter und Treg.....  | 47 |
| 3.3.5   | ABOi/ABOk Transplantation und Treg .....                           | 48 |
| 3.3.6   | Präemptive Transplantation und Treg .....                          | 48 |
| 3.4     | Treg und Abstoßungen.....  | 48 |
| 3.5     | Zusammenhang zwischen Typ der Abstoßung und der Treg-Frequenz..... | 52 |
| 3.5.1   | Receiver-Operating-Characteristics-Kurve .....                     | 54 |
| 3.6     | Zusammenhang zwischen Treg und Funktionsverschlechterung .....     | 56 |
| 3.7     | Keimspektrum im Patientenkollektiv .....                           | 59 |
| 3.7.1   | Harnwegsinfekte .....  | 59 |
| 3.7.2   | Atemwegsinfektionen .....  | 60 |
| 3.7.3   | Zytomegalievirus-Infektionen .....                                 | 60 |
| 3.7.4   | Polyomavirus-Infektionen .....                                     | 60 |
| 3.7.5   | Epstein-Barr-Virus-Infektionen .....                               | 60 |

|       |   |     |
|-------|---|-----|
| 3.7.6 | Herpes-Simplex-Virus-Infektionen .....                          | 60  |
| 3.7.7 | Varizella-Zoster-Virus-Infektionen .....                        | 60  |
| 3.8   | Zusammenhang zwischen Treg und Infektionen .....                | 61  |
| 3.9   | Effekte der immunsuppressiven Therapie auf Treg .....           | 62  |
| 3.9.1 | Induktionstherapien und ihre Effekte auf Treg .....             | 62  |
| 3.9.2 | Induktionstherapien bei Männern .....                           | 64  |
| 3.9.3 | Induktionstherapien bei Frauen .....                            | 65  |
| 3.9.4 | Effekte der Erhaltungstherapie auf Treg .....                   | 65  |
| 4     | Diskussion .....  | 66  |
| 4.1   | Effekte der Induktionstherapie auf Treg .....                   | 66  |
| 4.2   | Effekte der immunsuppressiven Erhaltungstherapie auf Treg ..... | 67  |
| 4.3   | Immunologisches Risiko .....                                    | 68  |
| 4.3.1 | PRA und Treg .....  | 68  |
| 4.3.2 | dnDSA und Treg .....  | 69  |
| 4.3.3 | HLA-Mismatches und Treg .....                                   | 69  |
| 4.3.4 | Zusammenhang zwischen Alter und Treg .....                      | 70  |
| 4.3.5 | Zusammenhang zwischen ABOi-Transplantation und Treg .....       | 70  |
| 4.4   | Präemptive Transplantation und Treg .....                       | 70  |
| 4.5   | Infektionen und Treg .....                                      | 71  |
| 4.6   | Funktionsverschlechterung des Transplantats und Treg .....      | 71  |
| 4.7   | Abstoßungen und Treg .....                                      | 71  |
| 4.8   | Abstoßungstyp und Treg .....                                    | 72  |
| 4.9   | Geschlecht und Treg .....                                       | 73  |
| 4.10  | Stärken der vorliegenden Arbeit .....                           | 75  |
| 4.11  | Limitationen der vorliegenden Arbeit .....                      | 76  |
| 5     | Zusammenfassung .....   | 77  |
| 6     | Ausblick .....  | 78  |
| 7     | Literaturverzeichnis .....                                      | 81  |
| 8     | Abbildungsverzeichnis und Tabellenverzeichnis .....             | 99  |
| 8.1   | Abbildungen .....   | 99  |
| 8.2   | Tabellen .....  | 102 |
| 9     | Abkürzungen .....   | 106 |
| 10    | Appendix .....  | 110 |

|    |                                |     |
|----|--------------------------------|-----|
| 11 | Erklärung zum Eigenanteil..... | 125 |
| 12 | Danksagung .....               | 127 |

# 1 Einleitung

## 1.1 Nierentransplantation

Die Nierentransplantation stellt die kausale Therapie der terminalen Niereninsuffizienz dar. Bezüglich Nierenfunktion und Lebensqualität ist selbst die optimal eingestellte Dialyse der Nierentransplantation unterlegen (Oniscu et al. 2005). Die häufigsten Ursachen für eine chronische/terminale Niereninsuffizienz sind Diabetes mellitus, arterielle Hypertonie, Glomerulonephritiden, genetische Erkrankungen (insbesondere polyzystische Nierenerkrankungen) sowie renovaskuläre Erkrankungen (Webster et al. 2017).

### 1.1.1 Historie der Nierentransplantation

Im Jahre 1956 wurde erstmalig über eine erfolgreiche Nierentransplantation im Rahmen einer Lebendspende zwischen eineiigen Zwillingen berichtet (Merrill et al. 1956). Jedoch scheiterten im 20. Jahrhundert zahlreiche Nierentransplantationsversuche aufgrund von Abstoßungsreaktionen und Transplantatversagen, sodass die Rolle des Immunsystems und die Optimierung der immunsuppressiven Therapie stark in den Fokus des wissenschaftlichen Interesses rückte. 1969 gelang es der Arbeitsgruppe um van Rood in den Niederlanden die humanen Leukozyten-Antigene (HLA) und ihre wichtige Bedeutung im Rahmen der Transplantation zu identifizieren (van Rood et al. 1969). Es konnte gezeigt werden, dass das Risiko einer Abstoßung geringer ist, je mehr HLA-Übereinstimmungen vorliegen.

### 1.1.2 Leichennierenspende

Mit Hilfe einer zentral-europäischen Datenbank koordiniert die Organisation Eurotransplant (Leiden, Niederlande) die Spenderorganvergabe in Deutschland, den Benelux-Staaten, Österreich und Kroatien. Die Wartezeit bis zur Zuteilung eines Nierentransplantats (Allokation) bei terminaler Niereninsuffizienz ist individuell, über eine Punktevergabe streng geregelt und von verschiedenen Faktoren abhängig (z.B. Lebensalter, Komorbiditäten, High-Urgency Kriterien,

Wartezeit, Ischämiezeit, Grad der Übereinstimmung von HLA-Merkmalen, Mismatch-Wahrscheinlichkeit, Immunisierung). Die Wartezeit beginnt mit dem ersten Dialysetag.

### 1.1.3 Lebendnierenspende

Bei stagnierender und gar rückläufiger Verfügbarkeit von Leichennieren muss zunehmend auf Lebendspenden zurückgegriffen werden. Zweifellos birgt die Lebendspende zahlreiche Vorteile: bessere Planbarkeit, kürzere Ischämiezeit, rasche Funktionsaufnahme der Niere und somit signifikant bessere Langzeitergebnisse bezüglich Patienten- und Transplantatüberlebensraten (Kirste 2003).

### 1.1.4 AB0-inkompatible Transplantation

Eine AB0-kompatible Nierentransplantation (AB0k) ist einer AB0-inkompatiblen Nierentransplantation (AB0i) vorzuziehen. Eine Transplantation unter Missachtung der Blutgruppenkompatibilität zwischen Spender und Empfänger führt normalerweise zur Organabstoßung. Durch Suppression der physiologischen Antikörperproduktion vor Transplantation kann diese Art der Transplantation jedoch ermöglicht werden. Durch präoperative (und ggf. postoperative) Maßnahmen wie Gabe hochdosierter Immunglobuline, Gabe von Immunsuppressiva, Plasmapherese oder Immunadsorption können Blutgruppen- und/oder HLA-Antikörper bis zum Zeitpunkt der Transplantation entfernt oder zumindest deutlich reduziert werden (Morath et al. 2013). Nach erfolgter Desensibilisierung liegt kein erhöhtes Abstoßungsrisiko im Vergleich zu den herkömmlichen Transplantationen mehr vor.

### 1.1.5 Nierentransplantation in Deutschland

In Deutschland koordiniert die Deutsche Stiftung Organtransplantation (DSO) seit 1984 die postmortale Organspende. Die durchschnittliche Wartezeit auf ein postmortal gespendetes Organ liegt aktuell bei über acht Jahren (<https://www.iqwig.de>). Gemäß der DSO wurden in Deutschland im Jahr 2020 1909 Nierentransplantationen, davon 1459 (76,4 %) nach postmortaler

Organspende und 450 (23,6 %) nach Lebendspende, transplantiert. Laut DSO standen 11903 Patienten zum 31.12.2020 auf der Warteliste für eine Nierentransplantation (DSO Jahresbericht 2020).

## 1.2 Abstoßung und Toleranz

Die optimale Versorgung des niereninsuffizienten Patienten ist die präemptive Transplantation. Die Abstoßung (Rejektion) ist eine immunologische Antwort des Transplantatempfängers auf Antigene des Organspenders. Innerhalb dieser Reaktion kommt es durch Entzündungskaskaden zu einem Gewebeumbau und schließlich zum Funktionsverlust des Organs. Je mehr HLA-Übereinstimmungen vorliegen, desto geringer ist das Risiko einer Abstoßung. Auch heutzutage (unter optimaler immunsuppressiver Therapie) treten in ca. 10-15 % der Transplantationen Abstoßungsreaktionen innerhalb des ersten Jahres auf (Segoloni und Quaglia 2006). Abstoßungen lassen sich durch ihren zeitlichen Verlauf (hyperakute, akute oder chronische Rejektion) oder auch durch ihre Pathogenese (zellulär: durch Lymphozyten bedingt versus humoral: durch Antikörper bedingt) einteilen. Anhand der Banff-Klassifikation können Rejektionen abhängig von Genese und Schweregrad histologisch eingeteilt werden (Tabelle 1, siehe Appendix).

### 1.2.1 Humanes Leukozyten-Antigen-System

HLA sind Glykoproteine auf der Zelloberfläche, welche eine entscheidende Rolle im Rahmen der Antigenpräsentation und Antigenerkennung von T-Zellen spielen. Die Gene der HLA werden als Haupthistokompatibilitätskomplex (major histocompatibility complex, MHC) bezeichnet. Vor Transplantation unterziehen sich Spender und Empfänger einer HLA-Typisierung: je höher die Übereinstimmung, desto geringer das Abstoßungsrisiko. Das Abstoßungsrisiko wird jedoch nicht alleine durch die HLA-Übereinstimmung bestimmt, sondern ist vielmehr von weiteren Faktoren abhängig, z.B. initial verzögerter Transplantatfunktion („delayed graft function“, siehe Kapitel 2.1.9.1), Entwicklung donorspezifischer Antikörper (DSA), Komorbiditäten, Dialysezeit

vor Transplantation, jungem Empfängeralter oder unzureichender Immunsuppression (Sijpkens et al. 2003).

### 1.2.2 Präformierte Antikörper

Alle Patienten, die sich auf der Warteliste von Eurotransplant befinden, werden in regelmäßigen Abständen auf präformierte Antikörper (PRA) getestet. PRA bilden sich z.B. nach erfolgter Bluttransfusion, Transplantation oder Schwangerschaft. Der PRA-Wert (%) beurteilt den Sensibilisierungsgrad und das humorale Abstoßungsrisiko. Ein hoher PRA-Wert birgt ein erhöhtes Abstoßungsrisiko und erschwert somit die Identifikation eines passenden Spenderorgans (Ixtlapale-Carmona et al. 2018). Zur Bestimmung des PRA-Wertes wird das Serum des potentiellen Organempfängers gegen Lymphozyten aus der Allgemeinbevölkerung getestet, um zu beurteilen, ob Antikörper gegen eine Standard-HLA-Verteilung vorliegen. Häufig wird alternativ ein errechneter PRA-Wert angewendet, welcher auf der Wahrscheinlichkeit der in Europa vorherrschenden HLA-Verteilung basiert.

### 1.2.3 Donorspezifische Antikörper

DSA richten sich gegen Antigene (überwiegend gegen HLA) des Transplantats und können vor einer Transplantation vorliegen oder sich nach einer Transplantation entwickeln (de novo DSA, dnDSA). Die Bildung von DSA wird im Rahmen der Transplantationsnachsorge verfolgt. Generell muss bei nachgewiesenen DSA von einem verdoppelten Risiko zukünftig eine Abstoßung zu erleiden, ausgegangen werden (Mohan et al. 2012).

### 1.2.4 Hyperakute/Perakute Rejektion

Die hyperakute/perakute Rejektion tritt in einem Zeitraum zwischen 24 und 48 Stunden auf. Häufig liegt eine ABOi Nierentransplantation vor oder es finden sich DSA. Heutzutage sind die hyperakuten/perakuten Rejektionen sehr selten geworden, da vor Transplantation nach DSA gesucht wird und Hochrisikopatienten desensibilisiert werden.

### 1.2.5 Akute Rejektion

Die akute Rejektion tritt meistens 4-7 Tage nach der Transplantation auf. Es wird die zelluläre von der humoralen Rejektion unterschieden. Die definitive Diagnose einer Rejektion erfolgt mittels Biopsie. Therapeutisch ist meist eine Anpassung des immunsuppressiven Regimes erforderlich. Im Rahmen der zellulären Rejektion kommt es durch T-Zellen entweder zu einer direkten (T-Zelle/MHC) oder indirekten (durch antigenpräsentierende Zellen, APC) Aktivierung (van Besouw et al. 2005). Es werden vorwiegend CD8<sup>+</sup>-zytotoxische T-Lymphozyten aktiviert und damit das Immunsystem gegen die Spenderniere mobilisiert. Die beginnende Nekrose des Transplantats triggert zusätzlich das unspezifische/angeborene Immunsystem (Kaczmarek et al. 2013). Im Rahmen der humoralen Rejektion spielen hauptsächlich PRA und de novo DSA eine Rolle. Die Antikörper reagieren direkt gegen HLA-Moleküle des Spenders (hauptsächlich auf peritubulären Endothelzellen oder Endothelzellen der glomerulären Kapillaren lokalisiert).

### 1.2.6 Chronische Rejektion

Die chronische Abstoßung, auch Transplantat-Vaskulopathie genannt, kann nach Monaten bis Jahren nach Transplantation auftreten. Bei der Entwicklung einer chronischen Abstoßung spielen humorale Mechanismen eine größere Rolle, als zelluläre Mechanismen (Becker et al. 2016). Bei der chronischen Rejektion spielen jedoch auch vermehrt nicht immunologische Ursachen, wie schlecht eingestellte kardiovaskuläre Risikofaktoren, eine entscheidende Rolle.

### 1.2.7 Operationale Toleranz

Operationale Toleranz ist definiert als die Akzeptanz von fremden HLA ohne Immunsuppression (Sarwal 2016). Dieser Zustand ist nach Nierentransplantation selten (ca. 8 %), da eine Reduktion oder das Absetzen der Immunsuppression meistens zu einer Rejektion oder einem Transplantatverlust führt (Sarwal 2016). T-regulatorische Zellen (Treg) spielen eine wichtige Rolle im Rahmen der Toleranz (Walsh et al. 2004). Um Toleranz

herzustellen, wäre also die Modulation des Empfänger-Immunsystems durch die Gabe von Treg denkbar. Dieser Ansatz ist Gegenstand aktueller Forschung (Sawitzki et al. 2020). Auf Treg wird im Kapitel 1.5 näher eingegangen.

### 1.3 Immunsuppression

Eine suffiziente Immunsuppression ist erforderlich, um die Abwehrreaktion des Empfängers gegen das Spenderorgan zu unterdrücken. Durch die Weiterentwicklung der immunsuppressiven Therapie konnte die Inzidenz der Rejektionen drastisch reduziert werden (Segoloni und Quaglia 2006), insbesondere durch den Einsatz von Kombinationstherapien. Die immunsuppressive Therapie wird mit einer Induktionstherapie begonnen und mit einer Erhaltungstherapie fortgeführt. Immunsuppressiva sind allerdings auch mit relevanten Nebenwirkungen, wie z.B. Infektionen, Nephrotoxizität und Malignomentwicklung, assoziiert. Immunsuppressiva wirken auf Patienten unterschiedlich, bedingt durch eine individuelle Pharmakodynamik und Pharmakokinetik (Millan und Brunet 2016). Die individuelle Wirkung der Immunsuppressiva wird z.B. bei der Dosisfindung anhand der Bestimmung der Medikamentenspiegel deutlich.

#### 1.3.1 Induktionstherapie

Die Induktionstherapie besteht in der Regel aus der Gabe von monoklonalen oder polyklonalen Antikörpern. Im Folgenden werden die für die vorliegende Arbeit relevanten Antikörper näher beschrieben.

##### 1.3.1.1 Antithymozyten Globulin

Antithymozyten Globulin (ATG) sind polyklonale Antikörper gegen humane Lymphozyten (Bonney-Berard et al. 1991). ATG enthält nicht nur Antikörper gegen T-Zellen, sondern auch gegen aktivierte B-Zellen und Adhäsionsmoleküle. ATG wird entweder von Hasen (rabbit ATG, rATG) oder Pferden (horse ATG, hATG) gewonnen. In der vorliegenden Arbeit wurde ausschließlich rATG verwendet. ATG reduziert initial die Treg-Frequenz, diese

erholt sich jedoch im Verlauf durch die Verschiebung des Gleichgewichtes zwischen Treg und T-Effektor-Zellen (Furukawa et al. 2016).

#### 1.3.1.2 Basiliximab

Basiliximab ist ein chimärer, monoklonaler Antikörper, welcher gegen die Alphakette des Interleukin-2 Rezeptors (CD25) gerichtet ist (Kuypers und Vanrenterghem 2004). Der Antikörper inhibiert die Interleukin-2 Bindung und so konsekutiv die Proliferation von aktivierten T-Zellen. Eine Reduktion der Treg-Frequenz unter Basiliximab ist beschrieben (Camirand und Riella 2017).

#### 1.3.1.3 Rituximab

Rituximab ist ein monoklonaler anti-CD20 Antikörper. CD20 ist ein Oberflächenantigen, welches auf B-Zellen exprimiert wird. Somit führt die Gabe von Rituximab zur B-Zell-Depletion. Rituximab gehört im engeren Sinne nicht zur klassischen Induktionstherapie und kommt überwiegend im Rahmen der AB0i Transplantation zum Einsatz. In der Literatur wird berichtet, dass Rituximab keinen Einfluss auf die Treg-Frequenz bei Nierentransplantierten besitzt (Furukawa et al. 2016).

### 1.3.2 Erhaltungstherapie

Die Erhaltungstherapie besteht in der Regel aus drei Komponenten: einem Calcineurininhibitor (CNI), einem Purinsyntheseinhibitor (in der Regel Mycophenolat) oder mTor-Inhibitor (z.B. bei Tumorleiden oder progredienter Niereninsuffizienz) sowie Prednisolon (Taylor et al. 2005). Im Folgenden werden die für die vorliegende Arbeit relevanten Immunsuppressiva im Rahmen der Erhaltungstherapie näher beschrieben.

#### 1.3.2.1 Calcineurininhibitoren

Im Rahmen der Erhaltungstherapie nach Nierentransplantation gilt Tacrolimus als erste Wahl. Durch Bindung an Calcineurin (Serin-Threonin-Phosphatase) wird die Interleukin-2 induzierte T-Zell Aktivierung inhibiert. Tacrolimus wird

über Cytochrom P450 metabolisiert, sodass die Komedikation sorgfältig auf Interaktionen geprüft werden muss. Weiterhin muss eine potentielle Nephrotoxizität beachtet werden (Nankivell et al. 2003). CNI können sowohl quantitative (Reduktion) als auch qualitative (Suppression) Auswirkungen auf Treg haben (Akimova et al. 2012).

#### 1.3.2.2 Mycophenolat Mofetil und Mycophenolat-Natrium

Mycophenolatmofetil (MMF) ist die Prodrug von Mycophenolat (MPA). Das magensaftresistente Mycophenolat-Natrium (enteric coated mycophenolate sodium, ECMPS) wurde später entwickelt. MPA hemmt die Purin-Biosynthese in aktivierten Lymphozyten und ist ein unspezifischer Proliferationshemmer. Es existieren wenige und teilweise widersprüchliche Daten über den Einfluss von MPA auf die Treg-Frequenz. So zeigte sich eine erhöhte Treg-Frequenz unter MPA bei Nierentransplantierten unter immunsuppressiver Triple-Therapie (Fourtounas et al. 2010) oder in Kombination mit Vitamin D (Gregori et al. 2001), andere Arbeiten zeigten jedoch keinen Einfluss auf die Treg-Frequenz (Lim et al. 2007; Velthuis et al. 2006).

#### 1.3.2.3 Glukokortikoide

Glukokortikoide sind ein fester Bestandteil der immunsuppressiven Therapie. Glukokortikoide wirken einerseits direkt anti-inflammatorisch, andererseits reduzieren sie die Lymphozytenanzahl und hemmen die Granulozytenmigration und die T-Zell-Aktivierung. Meistens kommt in der Transplantationsmedizin Prednisolon zur Anwendung, hierunter ist eine signifikante Verbesserung bezüglich Langzeitüberleben der Patienten sowie der Transplantate beschrieben (Meier-Kriesche et al. 2008). Glukokortikoide zeigten bei Nierentransplantierten keinen Einfluss auf die Treg-Frequenz (Camirand und Riella 2017).

#### 1.3.2.4 mTOR-Inhibitoren

Zu den mTOR-Inhibitoren (mTORi) zählen Everolimus und Sirolimus (Rapamycin). Durch die Hemmung von mTOR wird die Proliferation von T-Zellen verhindert. Beide mTOR-Inhibitoren werden über Cytochrom P450 3A4 metabolisiert. mTOR-Inhibitoren scheinen die Funktion von Treg zu fördern (Demirkiran et al. 2008). Weiterhin zeigte Everolimus dosisunabhängig eine Erhöhung der Treg-Frequenz, Sirolimus hingegen wirkte in therapeutischer/supratherapeutischer Dosierung inhibierend auf Treg (Levitsky et al. 2016). Tabelle 31 (Appendix) zeigt eine Übersicht über die unterschiedlichen Effekte der Immunsuppressiva auf Treg.

#### 1.3.3 Therapie der Rejektion

Die akute Rejektion wird in der Regel mit Glukokortikoiden behandelt. ATG wird bei schwereren Verläufen eingesetzt. Bei einer Rejektion vom humoralen Typ kann ein Therapieversuch mit Plasmapherese erfolgen.

#### 1.3.4 Balance der Erhaltungstherapie

Die Dosis der Erhaltungstherapie muss einerseits hoch genug sein, um Rejektionen zu verhindern, andererseits aber so gering wie möglich, um Nebenwirkungen zu minimieren. Rejektionen können aus einer sogenannten Unterimmunsuppression resultieren, opportunistische Infektionen oder Malignome hingegen aus einer sogenannten Überimmunsuppression (Budde et al. 2011). Eine regelmäßige Spiegelkontrolle (Therapeutisches Drug Monitoring, TDM) der CNI und mTORi ist sowohl in der instabilen Anfangsphase nach Transplantation als auch im weiteren Verlauf von Bedeutung, da hierdurch ein besseres Transplantat- und Empfängerüberleben erreicht wird (Halloran 2004; Kahan et al. 2002). Sowohl CNI als auch mTORi sind Medikamente mit einem engen „therapeutischen Index“ (Shipkova und Wieland 2016), bei denen sich die Spiegelkontrolle im Blut gut eignet, um eine Unter- oder Überimmunsuppression zu vermeiden (Kahan et al. 2002). Da die Balance zwischen Treg und T-Effektorzellen (Teff) eine wichtige Rolle im Rahmen der

Toleranz spielt (Salama et al. 2001), wäre eine für die Treg optimierte immunsuppressive Therapie wünschenswert.

#### 1.4 Infektionen bei Nierentransplantierten

Infektionen stellen eine häufige Todesursache nach Transplantation dar (Foster et al. 2011). Außerdem können Infektionen die Entwicklung von dnDSA fördern (Locke et al. 2009). Infektionen können durch das Transplantat übertragen werden (z.B. Mycobacterium tuberculosis, Hepatitis-B-Virus, humanes Immundefizienz Virus) oder opportunistisch sein (z.B. Zytomegalievirus, Epstein-Barr-Virus, Herpes-Simplex-Virus 1, 2 und 6, Varizella-Zoster-Virus, Pneumocystis jirovecii, humanes Papillomavirus, BK-Polyomavirus, JC-Polyomavirus). Aus diesem Grund ist parallel zur immunsuppressiven Therapie eine antimikrobielle Prophylaxe erforderlich.

#### 1.5 T-regulatorische-Zellen

Treg (frühere Bezeichnung: Suppressor-T-Zellen) spielen eine wichtige Rolle im Rahmen der physiologischen Immunsuppression und ermöglichen Toleranz gegenüber körpereigenen Antigenen (Waldmann et al. 2006). Ihre Erstbeschreibung erfolgte 1970 von Gershon und Kondo (Gershon und Kondo 1970). Anfangs konnte ihre Rolle nicht weiter eingeordnet werden, erst 15 Jahre später rückten die Treg wieder in den Fokus des wissenschaftlichen Interesses, da sie anhand des Oberflächenmarkers CD25 (alpha-Untereinheit des Interleukin-2-Rezeptors) nun besser identifiziert werden konnten (Sakaguchi et al. 1985). Die im Mittelpunkt dieser Arbeit stehenden Treg stellen eine Subpopulation der CD4<sup>+</sup>-Zellen dar (ca. 5-10 %). Am Mausmodell konnte der Thymus als Ursprungsort der Treg identifiziert werden (Sakaguchi 2005). In der vorliegenden Arbeit wurden im Blut zirkulierende natürliche Treg anhand des Demethylierungsstatus identifiziert und quantifiziert (siehe Kapitel 2.2).

### 1.5.1 Aufbau der T-Zellen

Alle T-Lymphozyten besitzen einen T-Zellrezeptor (TZR). Neben der Signalübertragung zur T-Zellaktivierung besitzt er auch die Aufgabe der Antigenerkennung, welche über MHC präsentiert werden. Anhand spezifischer Oberflächenrezeptoren lassen sich die T-Lymphozyten weiter untergliedern in CD4<sup>+</sup>-Helfer-Zellen und CD8<sup>+</sup>-zytotoxische Zellen. CD4<sup>+</sup>-Zellen binden an MHC-II-Komplexe, welche auf antigenpräsentierenden Zellen wie B-Zellen, dendritischen Zellen oder Makrophagen zu finden sind. Nach Aktivierung der CD4<sup>+</sup>-Zelle werden Zytokine freigesetzt, welche wiederum andere Zellen aktivieren (z.B. B-Zellen, CD8<sup>+</sup>-Zellen, Makrophagen). Das Zytokinmilieu ist verantwortlich für die Weiterentwicklung zu Th1, Th2, Th17 oder Treg (Mosmann und Coffman 1989). Das adaptive Immunsystem hat ein immunologisches Gedächtnis, bei wiederholter Antigenexposition erfolgt eine stärkere Immunantwort.

### 1.5.2 T-Zell-Entwicklung

Lymphozyten entstehen im Knochenmark und wandern in lymphatisches Gewebe aus. Pro-T-Zellen wandern in den Thymus, um dort weiter auszureifen. Dort entstehen naive T-Zellen (CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup>FOXP3<sup>-</sup>) sowie natürliche Treg (CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>FOXP3<sup>+</sup>), welche in der vorliegenden Arbeit anhand der Treg-Specific-Demethylated-Region (TSDR) des foxp3-Gens mittels Real-Time-Polymerase-Kettenreaktion (RT-PCR) identifiziert wurden. Die Treg-Entwicklung läuft in zwei Schritten ab. Im ersten Schritt bekommen die Vorläuferzellen ein Signal von antigenpräsentierenden Zellen des Thymus, es resultiert die Weiterentwicklung zu Treg-Vorläuferzellen. Im zweiten Schritt wird die weitere Entwicklung durch das Zytokin Interleukin-2 eingeleitet, welches von aktivierten T-Zellen gebildet wird. Interleukin-2 spielt eine Schlüsselrolle bei der Entwicklung, Expansion, Aktivität und beim Überleben von Treg (Malek und Bayer 2004). Die Interleukin-2-Stimulation hat unter anderem die Induktion der FOXP3-Expression über den JAK-STAT-Signalweg zur Konsequenz (Zorn et al. 2006). Es entstehen FOXP3<sup>+</sup>-Treg, welche weitere Entwicklungsstufen

durchlaufen (z.B. Demethylierung/Acetylierung des FOXP3-Genlokus), was eine stabile FOXP3-Expression zur Folge hat (Zhang et al. 2012).

### 1.5.3 Selektionsmechanismen

#### 1.5.3.1 Zentrale Selektion im Thymus

Während der T-Zell-Differenzierung im Thymus durchlaufen die Thymozyten komplexe Selektionsmechanismen. Mit dem Ziel der Selbsttoleranz erfolgt ein zentraler Toleranzmechanismus im Thymus, welchen nur 1-2 % der Thymozyten überleben. Die zentrale Toleranz besteht aus zwei Selektionsverfahren. Die erste Selektion (positive Selektion) findet im Kortex des Thymus statt. Nach Bestückung der T-Lymphozyten mit einem Rezeptor beginnt die positive Selektion der doppelt positiven CD4<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>-Zellen. Bei Nicht-Erkennen der Selbst-Antigene erfolgt ein Absterben durch Apoptose (Teh et al. 1988). Die positiv selektionierten Thymozyten entwickeln sich weiter zu einfach positiven CD4<sup>+</sup>- oder CD8<sup>+</sup>-Zellen. Im Rahmen der zweiten Selektion (negative Selektion) werden die Thymozyten auf Selbstreaktivität getestet. Bei einer zu hohen Affinität gegenüber körpereigenen Antigenen werden sie durch Apoptose eliminiert (Germain 2002). Diesen Prozess der Toleranzentwicklung in einem primär lymphatischen Organ wie dem Thymus bezeichnet man auch als zentrale Toleranz.

#### 1.5.3.2 Periphere Toleranz

Um den Organismus weiter vor Autoreaktivität zu schützen, gibt es neben der zentralen Toleranz auch die periphere Toleranz. Hierbei werden T-Lymphozyten, welche nach einer Aktivierung unmittelbar erneut aktiviert werden, eliminiert. Weiterhin werden T-Lymphozyten bei isolierter TZR-Aktivierung durch ein Antigen ohne kostimulatorische Moleküle anerg. Außerdem erfolgt eine direkte Suppression autoreaktiver Zellen durch natürliche Killerzellen, dendritische Zellen oder Treg (Sakaguchi 2005; Shevach 2002; Zwar et al. 2006).

#### 1.5.4 Natürliche Treg und induzierte Treg

Es existieren zwei Haupttypen von CD4<sup>+</sup>-Treg. Natürliche Treg (nTreg), die den größten Anteil ausmachen und induzierte Treg (iTreg). Die nTreg (auch thymus-derived Treg, tTreg) machen ca. 5-10 % der gesamten CD4<sup>+</sup>-Zellen aus und entstehen im Thymus. Sie exprimieren CD25 und FOXP3 (Piccirillo und Thornton 2004). nTreg sind im Gegensatz zu den iTreg unabhängig von Zytokinen und besitzen eine kontinuierliche FOXP3-Expression und stabile suppressive Eigenschaften. FOXP3 exprimierende Zellen können aber auch sekundär in der Peripherie durch Zytokininduktion (TGF- $\beta$ , IL-4 und IL-10) aus naiven T-Zellen induziert werden (iTreg) (Chatenoud und Bach 2006). Aufgrund ihrer Reifung in der Peripherie werden sie auch als periphere Treg (pTreg) oder adaptive Treg bezeichnet (Bluestone und Abbas 2003). nTreg sind bezüglich ihrer immunsuppressiven Fähigkeit im Vergleich zu den iTreg potenter und stabiler. Man vermutet, dass der Grund hierfür in der Modifikation des foxp3-Gens liegt (Lal und Bromberg 2009). FOXP3 negative Zellen entwickeln sich nach Antigen- und Zytokinstimulus zu diversen T-Effektorzellen. Alternativ können sie auch zu iTreg aktiviert werden (Abbildung 1, siehe Appendix).

#### 1.5.5 Marker der Treg

Nachdem am Mausmodell gezeigt wurde, dass thymektomierte Mäuse vermehrt Autoimmunerkrankungen entwickeln (Sakaguchi et al. 2011), wurde postuliert, dass CD25 produzierende CD4<sup>+</sup>-Zellen Autoimmunerkrankungen durch Suppression verhindern können (Takahashi et al. 1998). Entsprechend rückte die Identifizierung von Treg-spezifischen Markern in den Fokus des wissenschaftlichen Interesses. Einen geeigneten Marker zu finden, gestaltete sich jedoch als große Herausforderung. Viele Marker, wie beispielsweise der CD25-Oberflächenmarker, befinden sich nicht exklusiv auf Treg und sind somit nicht selektiv genug. Weitere untersuchte Marker, welche sich als zu unspezifisch herausstellten, waren das zytotoxische Lymphozytenantigen-4 (CTLA-4), der Glukokortikoid-induzierte Tumor-Nekrosefaktor, CD45RB, CD62L, Nr1, CD103 und LAG-3 (Banham et al. 2006; Shevach 2002). Treg

besitzen neben einer hohen CD25-Expression eine niedrige CD127-Expression ( $\alpha$ -Kette des Interleukin-7 Rezeptors). Dies unterscheidet sie von aktivierten T-Zellen (Liu et al. 2006). Durch diese Kombination ( $CD25^{high}/CD127^{low}$ ) ist eine Analyse im Durchflusszytometer (FACS) möglich (Hartigan-O'Connor et al. 2007). Der intrazelluläre Marker FOXP3 eignet sich zur Identifizierung von Treg und ist gut untersucht (Fontenot et al. 2003; Lopez-Hoyos et al. 2009). Weiterhin wurde der Transkriptionsfaktor Helios als Marker für  $CD4^+CD25^+$  Treg beschrieben, welcher an den FOXP3-Promotor bindet (Getnet et al. 2010). Helios wurde als Marker zur Differenzierung von nTreg und iTreg vorgeschlagen (Singh et al. 2015), er gilt jedoch nicht als hoch spezifisch für nTreg, da Helios-positive und Helios-negative nTreg koexistieren (Himmel et al. 2013). Bis heute ist nicht abschließend geklärt, ob sich Helios zur Differenzierung zwischen nTreg und iTreg eignet (Thornton und Shevach 2019).

Die  $CD4^+CD25^+FOXP3^+$ -T-Zelle ist unter den Treg am besten beschrieben. Da FOXP3 als verwendeter Marker in dieser Arbeit von zentraler Bedeutung ist, wird auf diesen in den folgenden Kapiteln detailliert eingegangen.

#### 1.5.6 FOXP3

Ein wissenschaftlicher Meilenstein für die Erforschung der Treg war 2001 die Entdeckung des Transkriptionsfaktors FOXP3 und die des *foxp3*-Gens (X-Chromosom, an Stelle Xp11.23) im Mausmodell. Bei der „Scurfy“-Maus konnte eine Frameshift-Mutation („Verschiebung des Leserasters“ durch Deletion oder Insertion) im *foxp3*-Gen diagnostiziert werden, welche zu einem Abbau der FOXP3-Moleküle führte und in der Folge schwere, letale Autoimmunerkrankungen (z.B. autoimmune Enteropathie) bei männlichen Mäusen induzierte (Brunkow et al. 2001; Ziegler 2006). Es ließ sich bei den erkrankten Versuchstieren ein Defizit an  $CD4^+CD25^+$  Treg nachweisen. Der Zusammenhang zwischen Deletion des *foxp3*-Gens und dem konsekutiven Mangel an Treg wurde hergestellt (Fontenot et al. 2003; Hori et al. 2003). Eine kontinuierliche und stabile Produktion von FOXP3 scheint erforderlich zu sein, um funktionstüchtige Treg zu generieren und eine Homöostase zu gewährleisten (Zheng und Rudensky 2007). Im Gegensatz hierzu konnte

gezeigt werden, dass bei Überexpression von FOXP3 eine Immunsuppression herrscht. Das humane Analogon zur „Scurfy“-Maus stellen Patienten mit IPEX-Syndrom (immune Dysregulation, Polyendocrinopathy, Enteropathy, X-linked) dar (Torgerson und Ochs 2007). Aufgrund einer Mutation im *foxp3*-Gen besitzen die Patienten eine geringe Anzahl an CD4<sup>+</sup>CD25<sup>high</sup> T-Zellen und müssen wegen schwerer Inflammation immunsuppressiv behandelt werden.

#### 1.5.7 Aufbau FOXP3

Das FOXP3-Protein ist 47 Kilodalton schwer und gehört zur Familie der Forehead-box-Transkriptionsfaktoren (FOX-Familie). Die Familienmitglieder der Forehead-box-Transkriptionsfaktoren sind intranukleäre Proteine bei Säugetieren, die als Aktivator oder als Repressor von Genen wirken können (Zheng und Rudensky 2007). FOXP3 besteht aus 4 Domänen: Am N-Terminus (Amino-Terminus) liegt die Repressor-Domäne und am C-Terminus (Carboxy-Terminus) sitzt die gabelgeformte (Forkhead, FKH) DNA-Bindungsdomäne, über die FOXP3 z.B. an DNA in der Promotorregion von Zytokingen binden und diese inaktivieren kann (Ziegler 2006). Der Aufbau von FOXP3 ist schematisch in Abbildung 2 (siehe Appendix) dargestellt.

#### 1.5.8 Transiente FOXP3-Produktion

Naive T-Zellen können nach Aktivierung nur für einen kurzen Zeitraum (3-4 Tage) FOXP3 exprimieren. Der Methylierungsstatus der TSDR im *foxp3*-Gen ist letztendlich verantwortlich für die Stabilität der FOXP3-Expression. Transiente FOXP3 exprimierende Zellen können sich auch nach Verlust der FOXP3-Expression zu inflammatorischen Effektor-T-Zellen entwickeln. Es ist beschrieben, dass transiente FOXP3 exprimierende Zellen nicht zwangsläufig immunsuppressiv wirksam sind (Wang et al. 2007). Eine transiente FOXP3-Expression ist nicht nur in CD4<sup>+</sup>-Zellen, sondern auch in CD8<sup>+</sup>-Zellen möglich (Morgan et al. 2005), sodass FOXP3 letztendlich nicht als komplett spezifischer Treg-Marker anzusehen ist (Gavin et al. 2006).

### 1.5.9 Epigenetische Mechanismen

Epigenetische Modifikationsmechanismen sind dynamisch, können vererbt werden und durch Umwelteinflüsse oder Medikamente induziert werden (McCaughan et al. 2012). Zu dieser Genregulation gehören u.a. die DNA-Methylierung, X-Inaktivierung, Histon-Modifikation und RNA-Interferenz. Hier soll nur auf den Mechanismus der Methylierung weiter eingegangen werden. Im Zustand der Methylierung liegt die DNA kondensiert vor und ist nicht zugänglich für Transkriptionsfaktoren („Gene-Silencing“). Die Methylierung weist also auf eine Inaktivierung, die Demethylierung hingegen auf eine Aktivierung hin. Epigenetik spielt bei Treg eine wichtige Rolle. Die TSDR reguliert den Transkriptionsfaktor FOXP3. Der demethylierte Zustand korreliert mit der Genexpression von FOXP3. Der Demethylierungsstatus des FOXP3 ist also ein Marker für Treg, der stabile Treg (nTreg) kennzeichnet (Baron et al. 2007). Selbst transiente FOXP3 produzierende aktivierte T-Zellen (z.B. iTreg oder TZR-stimulierte konventionelle T-Zellen) unterscheiden sich hiervon, da diese Zellen eine deacetylierte FOXP3-Genstruktur aufweisen (Zhang et al. 2012).

### 1.5.10 Effekte der Treg

Treg wandern zu Entzündungsprozessen und supprimieren T-Effektor-Zellen sowie T-Helfer-Zellen (Chaudhry et al. 2009; Linterman et al. 2011). Der Mechanismus der Suppression durch Treg funktioniert über mehrere Ebenen und ist noch nicht vollständig verstanden (Caridade et al. 2013). Direkte Inhibierung kann durch Hemmung der APC und ihrer Signale durch Rezeptorbindung erfolgen (Abbildung 3, I.). Beispielsweise baut das Enzym Indolamin-2,3-Desoxygenase (IDO) Tryptophan zu N-Formylkynurenin ab und inhibiert somit eine T-Zellaktivierung. IDO wird durch die Interaktion von CTLA-4 auf Treg mit CD80 oder CD86 auf APC induziert (Dejean et al. 2009). Ein weiterer direkter Mechanismus erfolgt durch die Induktion von Apoptose durch transiente Produktion von Perforin und Granzym B (Abbildung 3, III.). Durch Rivalisierung kommt es ebenso zu Inhibierung, indem Treg direkt mit Effektorzellen um Rezeptorbindungen an APC konkurrieren (Abbildung 3, IV.).

Indirekte Inhibierung kann durch Hemmung der APC und Effektorzellen durch Zytokinproduktion oder Induktion zu iTreg erfolgen (Abbildung 3, II.). Ein weiterer indirekter Suppressionsmechanismus kann über den Eingriff in den Metabolismus erfolgen, z.B. über cyclisches Adenosinmonophosphat (cAMP) vermittelte Suppression von T-Effektor-Zellen (Abbildung 3, V). Eine schematische Darstellung der Treg-Effekte ist in Abbildung 3 (siehe Appendix) dargestellt.

#### 1.5.11 Treg und ihre klinische Bedeutung

Treg spielen eine wichtige Rolle im Rahmen der physiologischen Immunsuppression. Sie können das Risiko für die Entstehung von Autoimmunerkrankungen und Allergien senken, Rejektionen nach Transplantation verhindern und eine überschießende Inflammation limitieren (Shevryev und Tereshchenko 2020). Auf der anderen Seite haben Treg eine Bedeutung im Rahmen der Onkogenese (Beyer und Schultze 2006).

Treg werden durch Pathogene und Erreger im Rahmen der Abwehrreaktion induziert. Sie limitieren eine überschießende Immunantwort nach Beseitigung des Erregers und verhindern hierdurch eine größere Zellschädigung. Andererseits können sie eine chronische Persistenz oder Reaktivierung des Erregers ermöglichen (Boer et al. 2015).

Autoimmunerkrankungen scheinen durch ein Ungleichgewicht der Effektor-T-Zellen und Treg ausgelöst zu werden. Eine Funktionsstörung der Treg kann beispielsweise eine Myasthenie oder eine rheumatoide Arthritis zur Folge haben (Valencia und Lipsky 2007). Ein Defizit an Treg (durch Mutation im foxp3-Gen) führt beim Menschen zum IPEX-Syndrom, einer schweren Autoimmunerkrankung. Frauen sind deutlich häufiger von Autoimmunerkrankungen betroffen. Treg werden durch hormonelle Schwankungen und über FOXP3 beeinflusst, welches X-chromosomal lokalisiert ist (Nie et al. 2015).

Nach Lebertransplantation wurde bei operational toleranten Patienten eine erhöhte Treg-Frequenz im Blut beschrieben (Martinez-Llordella et al. 2007). Im

Mausmodell konnte gezeigt werden, dass humane Treg vor der Graft-versus-host-Erkrankung schützen können oder diese zumindest deutlich abmildern können (Mutis et al. 2006). Treg sind ebenso bedeutend nach Nierentransplantation und können Toleranz ermöglichen und Rejektionen verhindern (Mukhin et al. 2019). Louis und Kollegen beschrieben eine normale Treg-Frequenz bei stabilen transplantierten Patienten und eine reduzierte Treg-Frequenz bei chronischen Rejektionen (Louis et al. 2006). Bei akuter Rejektion wurde ein Anstieg von FOXP3 mRNA sowohl im Blut als auch im Urin festgestellt (Barabadi et al. 2018; Luan et al. 2021). Treg werden daher auch als Biomarker für die Rejektion diskutiert (Herrera-Gómez et al. 2018).

#### 1.5.12 Messung der Treg

Eine quantitative Messmethode von Treg ist mit der Durchflusszytometrie (fluorescence-activated cell sorting, FACS) möglich. Hiermit können einzelne Zellen sowohl aufgrund ihrer relativen Größe (Vorwärtsstreulicht (FSC)-Lichtbeugung) als auch aufgrund ihrer relativen Granularität/Oberflächenbeschaffenheit (Seitwärtsstreulicht (SSC)-Lichtbrechung und Reflexion) getrennt werden. Durch diese beiden gemessenen Eigenschaften können beispielsweise Lymphozyten von Monozyten innerhalb der PBMC (peripheral blood mononuclear cell = mononukleäre Zellen aus dem peripheren Blut) unterschieden werden. Bestimmte Oberflächenmoleküle (wie z.B. CD25) können vor der Messung mit fluoreszenzmarkierten Antikörpern angefärbt werden. Die Zellsuspension trifft im FACS auf einen singulären Laserstrahl, woraufhin es neben der Lichtstreuung auch zur Aktivierung des Fluoreszenzfarbstoffes kommt. Dieser entsendet auch einen Lichtstrahl, welcher durch eine Kombination aus Spiegeln und Filtern aufgespalten wird und ein ganz spezifisches Signal abgibt. Diese Signale werden dem Untersucher graphisch in einem Diagramm präsentiert. So können mehrere Oberflächenproteine oder intrazelluläre Proteine gleichzeitig gemessen werden. Im Institut für Klinische Chemie und Laboratoriumsmedizin (Klinikum Stuttgart) wurde die Messung von nTreg mittels Real-Time PCR auf

der Basis der TSDR etabliert (Metzker et al. 2016). Auf die Methode wird detailliert im Methodenteil eingegangen.

### 1.5.13 Treg und Toleranz

Treg vermitteln Toleranz und verhindern Autoimmunreaktionen. Hierbei gilt es jedoch zu beachten, dass Treg nicht alleine für Toleranz sorgen, sondern dass verschiedene Zelllinien daran beteiligt sind. So zeigte sich beispielsweise ein Anstieg der absoluten B-Zellen und eine Reduktion von Plasmazellen im Rahmen der Toleranz (Newell et al. 2010). Weiterhin scheinen B-Zellen mit suppressiven Eigenschaften (regulatorische B-Zellen, Breg) ebenso an der Entwicklung und Aufrechterhaltung von Toleranz beteiligt zu sein (Stolp et al. 2014). Es wäre wünschenswert, Toleranz ohne den Einsatz der klassischen und nebenwirkungsreichen Immunsuppressiva zu erreichen. Hierfür wäre der Einsatz von Treg denkbar. Der erfolgreiche Einsatz von Treg konnte bereits im Mausmodell (Schliesser et al. 2012) und am Menschen gezeigt werden (Mathew et al. 2018; Roemhild et al. 2020; Sawitzki et al. 2020).

### 1.6 Biomarker in der Transplantationsmedizin

Biomarker könnten in der Transplantationsmedizin hilfreich sein, um Informationen über den individuellen Immunstatus zu erhalten. Mit dieser Information könnte eine Risikoabschätzung für das Auftreten von Infektionen oder Rejektionen vorgenommen werden. Mit Hilfe von Biomarkern könnte die immunsuppressive Therapie individueller gestaltet werden und nebenwirkungsreiche Über- oder Unterdosierungen könnten vermieden werden (Wieland et al. 2010). Idealerweise könnten operational tolerante Patienten erkannt werden und Immunsuppressiva in dieser Situation nicht mehr erforderlich sein. Als Biomarker könnten sich unterschiedliche Zytokine (Millan und Brunet 2016), Oberflächenmoleküle von Lymphozyten oder Treg eignen (Ashton-Chess et al. 2009; Schlickeiser und Sawitzki 2012; Wieland und Shipkova 2016). Ein valider Biomarker ist bislang nicht verfügbar, aufgrund der Komplexität und Mehrdimensionalität des Immunsystems ist es schwer

vorstellbar, einen einzelnen Marker zu identifizieren. Vielmehr könnte sich ein „Panel von Biomarkern“ eignen (Crescioli 2016; Wieland und Shipkova 2016).

### 1.7 Fragestellung

Ziel der vorliegenden Arbeit war es zu untersuchen, wie sich die Treg-Frequenz (gemessen über die TSDR im *foxp3*-Gen) innerhalb der ersten 15 Monate nach Nierentransplantation verhält und ob ein Zusammenhang mit klinischen Ereignissen (wie z.B. einer Funktionsverschlechterung oder der Abstoßung des Transplantats) besteht. Hierbei sollten das immunologische Risiko der Patienten, die immunsuppressive Therapie und Patientencharakteristika berücksichtigt werden.

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Patienten

Für die wissenschaftliche Verwendung von Blut und Restgewebe in der Nephrologie wurde eine Biobank am Klinikum Stuttgart angelegt („Aufbau einer Blut-/Gewebe-/Datenbank im Zentrum für Innere Medizin Klinik für Nieren- und Hochdruckkrankheiten des Klinikums Stuttgart-Katharinenhospital“ Version 1.0 vom 04.02.2013, Prof. Wieland und Prof. Olbricht/Prof. Schwenger; Ethik-Kommission Projekt-Nr. 192/2013B01). Hierfür wurde bei frisch transplantierten und stabil (länger als 6 Monate transplantiert) transplantierten Patienten aus dem Klinikum Stuttgart und der Praxis Wolframstraße (Dialysezentrum, Stuttgart) im Zeitraum von Oktober 2013 bis Februar 2017 EDTA-Blut gewonnen und asserviert. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden Proben aus der Datenbank gemäß folgender Ein- und Ausschlusskriterien ausgewählt und untersucht.

#### 2.1.1 Einschlusskriterien

- Patienten mit immunologisch verursachten Nierenerkrankungen und/oder Nierentransplantatempfänger (Leichen- oder Lebendspende)
- Einwilligungsfähige Männer und Frauen über 18 Jahre
- Vorliegen einer schriftlichen Einwilligungserklärung

#### 2.1.2 Ausschlusskriterien

- Leukopenie  $< 2500/\mu\text{l}$  oder Thrombopenie  $< 100.000/\mu\text{l}$  oder Hämoglobin  $< 6,0 \text{ g/dl}$  bei Rekrutierung
- Schwangerschaft oder Stillzeit
- Fehlende Einwilligungsfähigkeit (z.B. Demenz)

### 2.1.3 Aufklärung der Patienten

Alle Patienten wurden über die Studie aufgeklärt und erteilten ihr schriftliches Einverständnis zur Teilnahme. Das unterschriebene Original der Aufklärung wurde im Studienordner abgelegt, eine Kopie wurde den Patienten ausgehändigt. Patienten ohne Kenntnis der deutschen Muttersprache wurden im Beisein eines Übersetzers aufgeklärt.

### 2.1.4 Entnahme des EDTA-Vollbluts

Es erfolgte die Abnahme von 10 ml EDTA-Blut im Rahmen regelmäßiger Visiten (siehe Kapitel 2.1.9). Durch Zentrifugation wurde Plasma und Zellen gewonnen, welche bis zur Analyse in Aliquots eingefroren (- 80°C) wurden. Die Proben sollen pseudonymisiert für 20 Jahre archiviert werden.

### 2.1.5 Patientenkollektiv

Das Patientenkollektiv bestand aus 158 Patienten: 58 Frauen und 100 Männern (Alter zwischen 18 und 78 Jahren, Median: 54 Jahre, Standardabweichung 14,5). Da nicht zu jedem Zeitpunkt bei allen Patienten die Treg gemessen werden konnten, unterscheiden sich die Patientenzahlen in den Subgruppen. 59 Patienten erhielten eine Lebendspende, 87 erhielten eine Leichenniere. 20 AB0i Patienten wurden nach einem speziellen Protokoll transplantiert. 17 Patienten wurden präemptiv transplantiert. Für 23 Patienten war es das zweite Transplantat oder Dritttransplantat. 22 Patienten hatten PRA (Cut-off bei 15 %). 50 Patienten entwickelten eine „delayed graft function“. 8 Patienten entwickelten dnDSA und 33 Patienten wiesen bereits vor der Nierentransplantation DSA auf. 68 Patienten hatten > 3 HLA-Mismatches. In dieser Arbeit wurden  $\geq 3$  HLA-Mismatches als immunologischer Risikofaktor definiert. Als Induktionstherapien erhielten 119 Patienten Basiliximab, 20 Basiliximab und Rituximab (bei AB0i) und 19 Antithymozyten Globulin.

### 2.1.6 Medikamentöses Standardregime

Die Patienten erhielten 4 Stunden vor dem Eingriff 250 mg Prednisolon und 20 mg Basiliximab intravenös als Induktionstherapie. 6 Stunden nach der Transplantation erhielten die Patienten weitere 250 mg Prednisolon intravenös sowie weitere 50 mg Prednisolon intravenös am ersten Tag. Eine Induktionstherapie erhielten alle Transplantierte. Risikopatienten (z.B. Patienten nach Zweit- oder Dritttransplantation, Transplantierte mit DSA und PRAs  $\geq 15\%$ ) erhielten Antithymozyten Globulin.

Die Erhaltungstherapie beinhaltete neben Prednisolon (0,5 mg/kgKG/Tag) Tacrolimus und 2 x 720 mg ECMPS bzw. 2 x 1000 mg MMF. Die Tacrolimusdosis wurde initial mit 0,1 mg/kgKG/Tag in 2 Dosen verabreicht, dann weiter nach Talspiegel (therapeutischer Bereich in den ersten 3 Monaten: 6-8  $\mu\text{g/l}$ ) individuell angepasst und reduziert. Ab dem zweiten Tag nach Transplantation wurde Prednisolon oralisiert (0,5 mg/kgKG). Am vierten Tag nach Transplantation wurde eine einmalige Gabe von Basiliximab 20 mg verabreicht. Ab dem 15. Tag nach Transplantation wurde die Prednisolondosis auf 20 mg/Tag reduziert, nach 2 weiteren Wochen erfolgte eine Reduktion auf 15 mg/Tag. Schließlich wurde Prednisolon weiter alle 2 Wochen um 2,5 mg reduziert, auf eine Zieldosis von 5 mg/Tag, die nach 3 Monaten erreicht wurde. ECMPS wurde im Verlauf reduziert auf 3 x 360 mg (ab dem vierten Monat nach Transplantation) bzw. 2 x 360 mg (ab dem 12. Monat nach Transplantation) oder MMF auf 3 x 500 mg (ab dem vierten Monat nach Transplantation) bzw. 2 x 500 mg (ab dem 12. Monat nach Transplantation). Zur besseren Übersicht ist die Erhaltungstherapie in den Tabellen 2-4 zusammengefasst.

### 2.1.7 Infektprophylaxe

Eine Zytomegalievirus (CMV)-Prophylaxe wurde mit Ganciclovir bei Risikokonstellation (Empfänger: CMV-negativ, Spender: CMV-positiv) für 6 Monate präventiv durchgeführt. Als Pneumocystis-jirovecii-Pneumonie (PCP)-Prophylaxe erhielten die Transplantierten Cotrimoxazol.

Tabelle 2: Standardisierte Therapie mit Tacrolimus

| <b>Zeitraum</b>                             | <b>Tacrolimus-Spiegel bei AB0-kompatibler Transplantation</b> | <b>Tacrolimus-Spiegel bei AB0-inkompatibler Transplantation</b> |
|---|---|---|
| 1. Woche postoperativ                       | 8-10 µg/l   | 10-12 µg/l  |
| 2. Woche postoperativ bis Tag 90 (3. Monat) | 6-8 µg/l  | 8-10 µg/l   |
| Ab Tag 91 postoperativ bis Monat 12         | 4-6 µg/l  | 6-8 µg/l  |
| Ab Monat 13 postoperativ                    | 3-5 µg/l  | 5-7 µg/l  |

Tabelle 3: Standardisierte Therapie mit Prednisolon

| <b>Zeitraum</b>            | <b>Prednisolon (mg/Tag)</b>   |
|----------------------------|---|
| Zwei Wochen postoperativ   | 0,5 mg/kgKG/Tag   |
| Ab Tag 15                  | 20 mg/Tag   |
| Nach weiteren zwei Wochen  | 15 mg/Tag   |
| Anschließend alle 2 Wochen | Reduktion um 2,5 mg bis zur Zieldosis<br>5 mg/Tag (erreicht nach 3 Monaten) |

Tabelle 4: Standardisierte Therapie mit ECMPS/MMF

| <b>Zeitraum</b> | <b>Dosis/Tag</b>                      |
|-----------------|---------------------------------------|
| Initial         | ECMPS 2 x 720 mg bzw. MMF 2 x 1000 mg |
| Ab Monat 4      | ECMPS 3 x 360 mg bzw. MMF 3 x 500 mg  |
| Nach Monat 12   | ECMPS 2 x 360 mg bzw. MMF 2 x 500 mg  |

### 2.1.8 Therapie bei ABO-inkompatibler Lebendnierentransplantation

Vor Transplantation wurden am Klinikum Stuttgart die Isoagglutinin-Ausgangstitere von Anti-A und Anti-B gemessen. Abhängig hiervon wurde die Anzahl der Immunadsorptionen vor Transplantation festgelegt (je höher der Titer, desto mehr Immunadsorptionen). Im Klinikum Stuttgart wurden für die Immunadsorption sowohl Glycosorb®-Säulen als auch Globaffin®-Säulen eingesetzt. Das Desensibilisierungs-Protokoll schloss 4 bis 5 obligate Immunadsorptionen vor Transplantation sowie fakultativ 3 weitere Immunadsorptionen nach Transplantation (bei ansteigendem Titer) mit ein. Nach der zweiten Immunadsorption erhielten die Patienten Immunglobuline intravenös (0,5 g/kgKG). Ab einem Isoagglutinin Titer < 1:4 konnte die Transplantation veranlasst werden. 7-10 Tage vor Transplantation wurde zusätzlich mit Prednisolon, Mycophenolat und Tacrolimus (Ziel-Talspiegel von 12-15 ng/ml) begonnen. Rituximab wurde 28 Tage vor Transplantation (375 mg/m<sup>2</sup>) verabreicht, damit die B-Zell-Entwicklung und konsekutive Antikörperproduktion inhibiert wurde. Nach Transplantation wurden in den ersten Wochen täglich die Isoagglutinin-Titer bestimmt. Ab einem IgG-Titer von 1:8 bestand die Indikation zur Immunadsorption. Ab der zweiten Woche wurde der Titer alle 2 Tage bestimmt, eine Immunadsorption erfolgte nun ab einem IgG-Titer von 1:16.

### 2.1.9 Visiten und klinische Ereignisse

Es erfolgten regelmäßige Visiten zur Blutentnahme und zur Erfassung klinischer Ereignisse. Die Visiten erfolgten standardisiert zu den folgenden Zeitpunkten: Visite 1 (Tag 1), Visite 2 (Tag 3 +/- 1 Tag), Visite 3 (Tag 5 +/- 1 Tag), Visite 4 (Tag 7 +/- 1 Tag), Visite 5 (Tag 10 +/- 2 Tage), Visite 6 (Tag 20 +/- 3 Tage), Visite 7 (Tag 30 +/- 3 Tage), Visite 8 (2 Monate +/- 7 Tage), Visite 9 (3 Monate +/- 14 Tage), Visite 10 (4 Monate +/- 14 Tage), Visite 11 (5. Monat +/- 14 Tage), Visite 12 (6. Monat +/- 14 Tage), Visite 13 (8. Monat +/- 1 Monat), Visite 14 (10. Monat +/- 1 Monat), Visite 15 (12. Monat +/- 1 Monat). Da nicht für alle Visiten

genügend Daten für die Auswertung vorlagen, wurden die Visiten in 5 größere Zeiträume zusammengefasst (Woche 1, Woche 2-4, Monat 2-3, Monat 4-6 und Monat 7-15).

#### 2.1.9.1 Verzögerte Transplantatfunktion (delayed-graft function)

Es existieren in der Literatur unterschiedliche Definitionen der verzögerten Transplantatfunktion (delayed-graft function). Für die vorliegende Arbeit wurde folgende Definition gewählt: Eine verzögerte Transplantatfunktion liegt bei einer verzögerter Funktionsaufnahme, definiert durch  $\geq 3$  Dialysen in einer Woche, vor.

#### 2.1.9.2 Funktionsverschlechterung

Als Verlaufparameter der Funktionsverschlechterung wurde die prozentuale Veränderung des Deltakreatinis (Delta 1/Krea zwischen den Visiten) nach Kasiske et al. errechnet (Kasiske et al. 2001). Ein Wert  $\leq 40$  % galt als Funktionsverschlechterung.

#### 2.1.9.3 Diagnostik und Therapie der Rejektion

Die Rejektion ist eine histopathologisch gestellte Diagnose nach Banff-Klassifikation (siehe Einleitung, Abschnitt Rejektion, Kapitel 1.2, Tabelle 1). In der gesamten Patientenkohorte wurde diese Diagnose immer nach erfolgter Nierenbiopsie gestellt (Goldstandard). Die Therapie der Rejektion wird nun abhängig von der entsprechenden Genese dargestellt.

#### 2.1.9.4 Therapie der antikörpervermittelten Rejektion (humoral)

Beim Vorliegen von DSA und/oder histologisch gesicherten C4d-Ablagerungen wurde eine Therapie der humoralen Rejektion begonnen. Es erfolgte die Plasmapherese, auf welche eine Immunglobulingabe folgte. Bei dem Verfahren der Plasmapherese wird Plasma durch einen großporigen Filter separiert/entfernt und durch eine geeignete Substitutionslösung (4-5 % Albumin oder gefrorenes Frischplasma) ausgetauscht. Mit dieser Methode können sehr

große Moleküle, aber auch eiweißgebundene Stoffe eliminiert werden. Die Immunglobulingabe erfolgte alle 4 Wochen (0,5 g/kgKG), insgesamt viermal (Kumulativedosis 2 g/kgKG).

#### 2.1.9.5 Therapie der Borderline-Rejektion

Eine Borderline-Rejektion wurde mit einem Steroidstoß von 250-500 mg Prednisolon über 3-5 Tage behandelt.

#### 2.1.9.6 Therapie der T-Zell vermittelten akuten Rejektion (zellulär)

Rejektionen der Banff-Typen 1a, 1b und 2a wurden mit einem Steroidstoß von 250-500 mg Prednisolon über 3-5 Tage behandelt. Zusätzlich konnte die Tacrolimus-Talkonzentration auf 8-10 µg/l angehoben werden. Die Rejektion des Banff-Typs 2a wurde zusätzlich mit ATG behandelt (ATG vom Kaninchen: 1,0-1,5 mg/kgKG/Tag, für 5-10 Tage).

#### 2.1.9.7 Therapie der steroidresistenten Rejektion

Rejektionen, die keine Besserung auf einen Steroidstoß zeigten, wurden mit ATG behandelt (ATG vom Kaninchen: 1,0-1,5 mg/kgKG/Tag, für 5-10 Tage).

### 2.2 Messung der Treg und Prinzip der PCR/RT-PCR

Zur Identifizierung der Treg wurde die RT-PCR verwendet. Es wurden hierfür die in den Tabellen 5-9 aufgelisteten Geräte, Reagenzien und Primer verwendet.

Tabelle 5: Chemikalien für RT-PCR-basierte Methode

| <b>Chemikalie</b>                                     | <b>Firma</b> | <b>Referenz-Nr.</b>     |
|---|--------------|-------------------------|
| High Pure Viral Nucleic Acid Kit                      | Roche        | 11858874001             |
| EZ DNA Methylation-GoldTMKit                          | Zymoresearch | ZRC176483;<br>ZRC175960 |
| LightCycler FastStart DNA Master Hybridization Probes | Roche        | 14196000                |
| Absolute Ethanol                                      | Appllichem   | 3L006408                |

Tabelle 6: Primer und Sonden der Firma Eurofins MWG operon

| Primer/Sonden               | Sequenz  | Referenz-Nr. |
|-----------------------------|--|--------------|
| Methylated Forward Primer   | 5'-TTT CGA TTT GTT TAG ATT TTT TCG TT<br>(26 bp)       | 014152608    |
| Methylated Reverse Primer   | 5'-CCT CTT CTC TTC CTC CGT AAT ATC G<br>(25 bp)        | 014152609    |
| Methylated-TM-Probe         | 5'-FAM-CGA CGC ATC CGA CCG CCA -BHQ1<br>(18 bp)        | 014152612    |
| Unmethylated-Forward Primer | 5'-GTT TTT GAT TTG TTT AGA TTTTTTTGT T<br>(28 bp)      | 014290425    |
| Unmethylated-Reverse Primer | 5'-CCT CTT CTC TTC CTC CAT AAT ATC A<br>(25 bp)        | 014290426    |
| Unmethylated-TM-Probe       | 5'-FAM-ATG GTG GTT GGA TGT GTT GGG TT<br>-BHQ1 (23 bp) | 014196516    |

Tabelle 7: Standards der Firma GenExpress GmbH

| Standard                               | Target                      | Referenz-Nr. |
|--|-----------------------------|--------------|
| Quantifizierungs-Standard methyliert   | Human FOXP3 methylated      | 30-8735-02   |
| Quantifizierungs-Standard demethyliert | Human FOX P3 non methylated | 30-8735-01   |

Tabelle 8: Geräte für die RT-PCR-basierte Methode

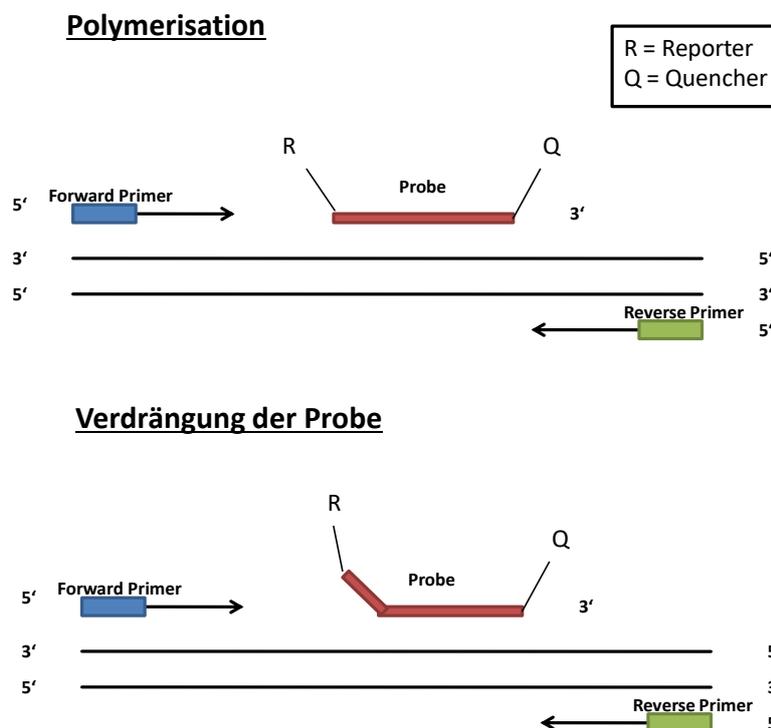
| Gerät           | Firma  | Referenz-Nr |
|-----------------|--------|-------------|
| ThermoCycler    | PeqLab | 138820101   |
| LightCycler 2.0 | Roche  | 1415258     |

Tabelle 9: verwendete Analyseprogramme

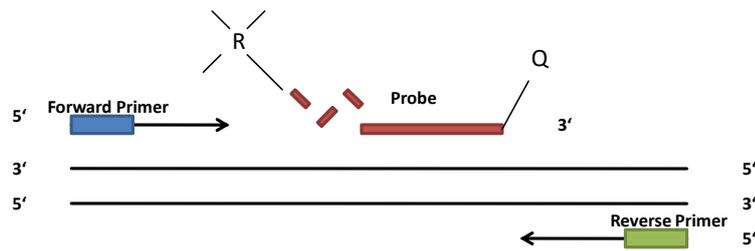
| Gerät       | Programm                 |
|-------------|--------------------------|
| LightCycler | LightCycler Software 4.1 |

Bei der PCR wird durch spezifische Primer eine Amplifikation der Zielsequenz durchgeführt (in sich wiederholende Zyklen aus Denaturierung, Annealing und Elongation). In jedem PCR-Zyklus werden die DNA-Abschnitte somit verdoppelt. Eine PCR enthält ca. 30-40 Zyklen (Alberts et al. 2015).

Die RT-PCR funktioniert nach demselben Prinzip wie die PCR. Zu der DNA wird ein Mastermix hinzugefügt, welcher folgende Bestandteile enthält: Primer, Sonden, DNA-Polymerasen, Puffer, Uracil-DNA-Glycosylasen und Magnesiumchlorid (MgCl<sub>2</sub>). Als Sonden werden TaqMan-Sonden eingesetzt (DNA-Bruchstücke), welche am 5'-Ende einen Quencher (Q) und einen Reporterfarbstoff (R) am 3'-Ende besitzen. Der Quencher fängt den Fluoreszenzfarbstoff des Reporters ab, bis dieser durch die 5'-3' Exonuklease-Aktivität der DNA-Polymerase abgebaut wird. Nun kann die Fluoreszenz des Reportermoleküls detektiert werden. Die Fluoreszenzemissionen repräsentieren jeweils neue Kopien der DNA. Bei jedem Zyklus wird in Echtzeit (Real-Time) die Fluoreszenz gemessen, hierdurch kann auf die Menge der produzierten DNA geschlossen werden (Abbildung 4), sodass die RT-PCR auch als quantitative PCR (qPCR) bezeichnet wird.



### Abspaltung des Reportermoleküls



### Vervollständigung der Polymerisation

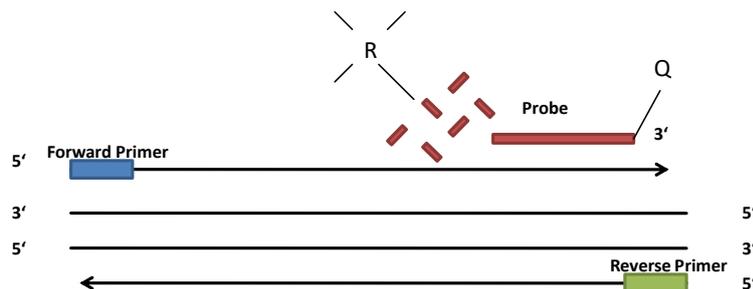


Abbildung 4: Prinzip der Real-Time-PCR mit Taq-Man-Sonden (mit freundlicher Genehmigung, inspiriert und modifiziert von: <https://www.medizinische-genetik.de>).

Die Identifizierung der Treg erfolgte über den Methylierungsstatus des intrazellulären FOXP3. Wie eingangs beschrieben, zeichnen sich stabile Treg durch eine Demethylierung und instabile (induzierte) Treg durch eine Methylierung aus. Die induzierten Treg besitzen an den GC-Dinukleotiden an der Base Cytosin eine Methylgruppe. Das methylierte Cytosin wird als eine fünfte Base gerechnet. Die DNA-Methylierung wird mit einer Bisulfitbehandlung untersucht. Dabei kommt es zu einer Basenumwandlung. Cytosin wird anders übersetzt als methyliertes Cytosin. Während Cytosin durch Natriumhydrogensulfit zu Uracil übersetzt wird, wird methyliertes Cytosin nicht verändert. Das neu entstandene Produkt wird nun per RT-PCR vervielfacht. So ist es möglich, selbst aus kleinsten Mengen den Methylierungsstatus zu bestimmen. Dies ist bedeutend, da Treg nur in geringer Anzahl im peripheren Blut zu finden sind (Wieckiewicz et al. 2010). Von jeder Patientenprobe wurden

2 Produkte (ein methyliertes und ein unmethyliertes) hergestellt. So konnte anschließend der Demethylierungsindex (DI) ermittelt und in % ausgedrückt werden, welcher das Verhältnis zwischen demethylierten (D) und methylierten (M) FOXP3 darstellt:  $DI (\%) = D/(D+M) * 100$ .

### 2.2.1 Definition der Treg-Frequenz

In der vorliegenden Arbeit wurden die nTreg (tTreg) im peripheren Blut untersucht. Die Messung der nTreg erfolgte mittels RT-PCR über den Demethylierungsstatus des FOXP3. Der DI (%) korrespondiert zum prozentualen Anteil der nTreg im peripheren Blut und wird im Folgenden auch als Treg-Frequenz (%) bezeichnet.

### 2.2.2 Besonderheit bei Frauen

Der FOXP3-Locus befindet sich auf dem X-Chromosom und Frauen besitzen, um die höhere Menge an X-chromosomalen Genen auszugleichen, inaktivierte X-Chromosomen. Aus diesem Grund (eines der beiden TSDR Allele ist im Rahmen der X-Inaktivierung methyliert) muss bei Frauen mit dem Faktor 2 nachkorrigiert werden (Wieczorek et al. 2009). Um die Werte bei Frauen und Männern zusammen in einem Datensatz auswerten zu können, wurde die Treg-Frequenz beider Geschlechter für einige Auswertungen in Perzentilen transformiert.

### 2.2.3 Durchführung der einzelnen Laborschritte

#### 2.2.3.1 DNA-Isolation

Zunächst wurde die DNA aus den Leukozytenpellets (EDTA-Blut) isoliert und aufbereitet. Dies erfolgte mit dem High Pure Viral Nucleic Acid Kit der Firma Roche. In ein 2 ml Schraubverschlussröhrchen wurden 200 µl Blut, 254 µl Binding-Buffer-PolyA-Lösung und 60 µl Proteinase K gegeben und das Ganze für 10 Sekunden gevortext. Dann erfolgte eine Inkubation bei 72 °C für 15 Minuten. Danach wurde die DNA mit 200 µl Ethanol (100 %) isoliert und

gevortext, bevor sie auf Silica-Säulen (Qiagen) pipettiert und bei 13000 U/min eine Minute lang zentrifugiert wurde. Nach diesem Schritt wurde das Auffanggefäß mit Inhalt verworfen und die Silica-Säulen in ein neues Auffanggefäß überführt. Die Säulen wurden mit 275 µl Inhibitor Removal Buffer, mit 500µl Wash Buffer und 500µl Ethanol (100 %) gewaschen und nach jedem Waschschrift bei 13000 U/min für eine Minute zentrifugiert. Dieser Vorgang wurde zweimal wiederholt. Jedes Mal wurde das Auffanggefäß verworfen. Es erfolgte dann ein Zentrifugieren der Säulen über 3 Minuten bei 13000 U/min, damit die restliche Flüssigkeit aus den Säulen eliminiert wurde. Nun wurden 33 µl Elution Buffer (72 °C) mittig auf die Säulen pipettiert, um die DNA von den Säulen zu lösen. Abschließend wurden die Säulen erneut zentrifugiert (1 Minute bei 13000 U/min).

#### 2.2.3.2 Bisulfitbehandlung

Nach der DNA-Isolation erfolgte die Bisulfitbehandlung und anschließend die RT-PCR. Für beide Verfahren wurde das „EZ DNA Methylation-GoldTMKit“ der Firma Zymoresearch verwendet. In ein 200 µl Gefäß wurden 130 µl „CT Conversion Reagent“ (bei 37 °C) und 20 µl DNA-Eluat pipettiert und das Ganze wurde dann für 10 Sekunden gevortext. Nun wurden die Behälter in den ThermoCycler gesetzt, in welchem die DNA via RT-PCR nach Kitanleitung des „EZ DNA Methylation-GoldTMKit“ amplifiziert wurde. Im Anschluss wurde sie in mehreren Arbeitsschritten gesäubert. Dies erfolgte, indem der Inhalt in ein Schraubenschlussröhrchen mit 600 µl M-Binding Buffer gegeben wurde. Der Ansatz wurde kurz gevortext und dann direkt auf die Zymo-Spinsäulen gegeben und nochmals für eine Minute bei 13000 U/min zentrifugiert. Nach jedem Zentrifugieren wurde das Permeat verworfen, die Säulen wurden in ein neues Auffanggefäß überführt. Die Säulen wurden mit 100 µl M-Wash-Buffer gereinigt und wiederum zentrifugiert. Dann erfolgte, nach dem Zufügen von 200 µl M-Desulfonation Puffer, die Inkubation bei Raumtemperatur für ca. 15 Minuten. Die Säulen wurden in zwei Durchgängen mit 200 µl M-Wash-Buffer gewaschen und für eine Minute bei 13000 U/min zentrifugiert. Um jegliche Flüssigkeit zu beseitigen, wurden die Säulen weitere 2 Minuten bei 13000 U/min zentrifugiert.

Anschließend wurde die DNA mit 20 µl M-Elution Buffer in ein 1,5 ml Eppendorfgefäß ausgespült und die Säulen für weitere 2 Minuten zentrifugiert. Um genügend Material für die anschließende RT-PCR zur Verfügung zu haben, wurden weitere 20 µl M-Elution Buffer hinzu pipettiert.

### 2.2.3.3 RT-PCR

Die Durchführung der RT-PCR orientierte sich am Protokoll von Wieczorek und Kollegen (Wieczorek et al. 2009). Es wurde sowohl ein methylierter (Komponenten, siehe Tabelle 10) als auch demethylierter (Komponenten, siehe Tabelle 11) Ansatz hergestellt.

Tabelle 10: Komponenten des methylierten Ansatzes (gelöst in 6 µl Wasser, steril).

| Methylierter Ansatz                    |
|--|
| - 0,75 µM Forward Primer Meth-F        |
| - 0,75 µM Reverse Primer Meth-R        |
| - 0,5 µM Meth-TM                       |
| - 1 x FastStart DNA hybprobe Mastermix |
| - 5 mM MgCl <sub>2</sub>               |

Tabelle 11: Komponenten des demethylierten Ansatzes (gelöst in 6 µl Wasser, steril).

| Demethylierter Ansatz                  |
|--|
| - 0,75 µM Forward Primer Unmeth-F      |
| - 0,75 µM Reverse Primer Unmeth-R      |
| - 0,5 µM Unmeth-TM                     |
| - 1 x FastStart DNA hybprobe Mastermix |
| - 5 mM MgCl <sub>2</sub>               |

In einer 20 µl Glaskapillare wurden sowohl 6 µl des methylierten als auch 6 µl des demethylierten Ansatzes und jeweils 4 µl DNA-Eluat gegeben. Die Glaskapillare wurde verschlossen und für 10 Sekunden bei 13000 U/min zentrifugiert. Als Positivkontrolle wurde ein Standard des humanen methylierten

bzw. demethylierten FOXP3 mit bekannter Konzentration benutzt, für die Negativkontrolle wurde steriles Wasser verwendet. Nach dem Zentrifugieren wurden die Kapillaren in das LightCycler-Karussell gesetzt und nach festgelegtem Programm des LightCyclers 2.0 der Firma Roche untersucht. Die Taq-Polymerase wurde 8 Minuten bei 95 °C aktiviert, es folgten 42 PCR-Zyklen nach diesem Schema: 5-sekündige Denaturierung der Doppelstränge bei 95 °C, anschließendes Annealing der Primer und Elongation für 20 Sekunden bei 60 °C und abschließende 1-sekündige Detektion der Fluoreszenz bei 72 °C. Die Fluoreszenzmessung der FOXP3-PCR-Produkte erfolgte bei 530 nm.

#### 2.2.3.4 Messung der Immunsuppressiva

Die Konzentration von Tacrolimus wurde mit einem gekoppelten Verfahren der Hochleistungschromatographie (high performance liquid chromatography HPLC, LC) und der Tandem Massenspektrometrie (Mass spectrometry MS/MS), der sogenannten LC-MS/MS, gemessen. Die Konzentration von MPA wurde im Plasma mittels HPLC gemessen. Das TDM wurde mittels einer LC-MS/MS Anlage der Firma Waters im Zentralinstitut für Klinische Chemie und Laboratoriumsmedizin des Klinikums Stuttgart analysiert.

#### 2.2.3.5 Statistik

Die statistische Auswertung und graphische Darstellung der Messergebnisse wurde mit den Programmen MedCalc und SPSS (Version 23) erstellt (Medizinische Statistik, Dr. med. Tanja Kottmann). Für abhängige Variablen bei Gruppenvergleichen wurde der Wilcoxon-Test, für unabhängige Variablen der Mann-Whitney-U-Test eingesetzt. Die Korrelation wurde mit dem Spearman's Korrelationskoeffizienten berechnet. Eine Signifikanz wurde definiert als  $p < 0,05$ . Im Normalverteilungstest zeigte sich, dass alle Parameter über den Zeitverlauf nicht normalverteilt waren. Daher wurden verteilungsfreie Tests verwendet, wie beispielsweise der diagnostische Mann-Whitney-Test oder prognostische Kaplan-Meier-Analysen. Zur besseren Vergleichbarkeit wurden die Daten teilweise normalisiert. Hierfür wurden die gesamten Ergebnisse (Treg-Frequenzen) zunächst in ihrem prozentualen Verhältnis dargestellt. Das

Ergebnis wurde dann wiederum nach Größe sortiert und in Perzentile oder Quartile aufgeteilt (Berechnung/Darstellung mit MedCalc). Die Fähigkeit der Treg-Frequenz an einem bestimmten Cut-Off Patienten mit und ohne klinisches Ereignis zu trennen, wurde mit einer ROC-Kurven-Analyse untersucht.

#### 2.2.3.6 Sonstige Methoden

Laborchemische Parameter wie zum Beispiel Kreatinin und Blutbild wurden im Zentralinstitut für Klinische Chemie und Laboratoriumsmedizin des Klinikums Stuttgart gemessen. Infektiologische Untersuchungen wurden im mikrobiologischen Labor des Zentralinstitutes durchgeführt. Die CMV- und BK-Virus (BKV) PCR-Analyse erfolgte ebenfalls im Hause, die PCR-Analyse für Epstein-Barr-Virus (EBV), Herpes-Simplex-Virus (HSV) und Varizella-Zoster-Virus (VZV) wurde in einem externen Labor durchgeführt.

### 3 Ergebnisse

#### 3.1 Treg-Frequenzen der Männer

Die Treg-Frequenz wird zuerst geschlechterspezifisch betrachtet. Abbildung 5 (und Tabelle 12 im Appendix) zeigt die Treg-Frequenzen der Männer über den Untersuchungszeitraum von 15 Monaten. Der Median in Woche 1 lag bei 1,3 %, in Woche 2-4 bei 1,3 %, im Monat 2-3 bei 1,3 %, im Monat 4-6 bei 1,4 % und im Monat 7-15 bei 1,2 %. Zwischen den einzelnen Untersuchungszeitpunkten zeigten sich hier keine signifikanten Unterschiede, lediglich ein Trend zu einer geringeren Treg-Frequenz nach 7-15 Monaten.

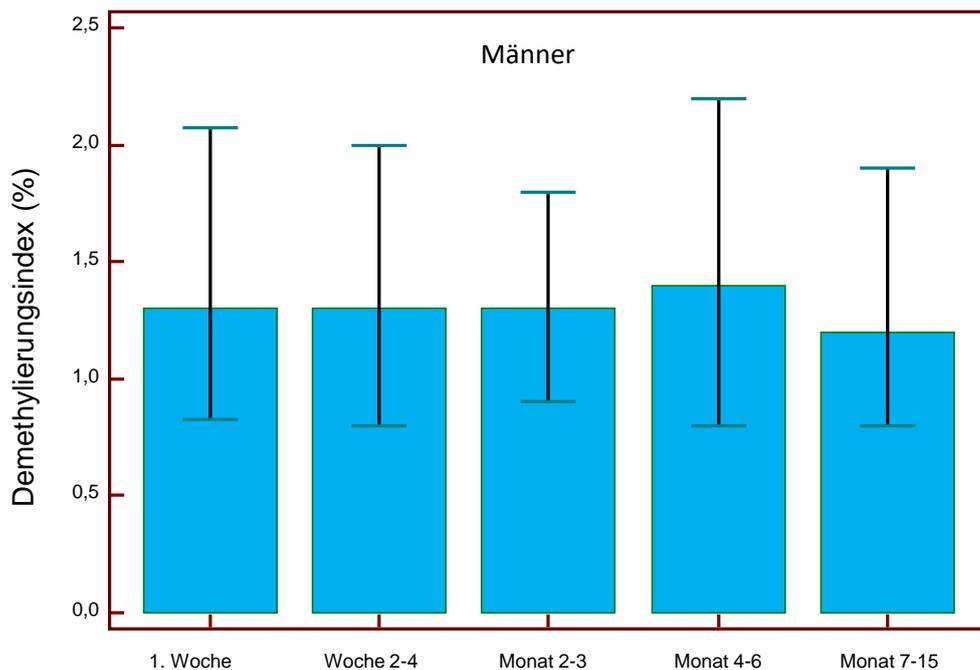


Abbildung 5: Treg-Frequenzen der Männer (Demethylierungsindex in %, Median, 25., 75. Perzentile) über den Beobachtungszeitraum von 15 Monaten nach Transplantation.

### 3.2 Treg-Frequenzen der Frauen

Da im Rahmen der X-Inaktivierung bei Frauen eines der beiden TSDR Allele methyliert ist, müssen die Ergebnisse der Frauen mit dem Faktor 2 nachkorrigiert werden (Wieczorek et al. 2009). Abbildung 6 (und Tabelle 13 im Appendix) zeigt die Treg-Frequenzen der Frauen über den Untersuchungszeitraum von 15 Monaten. Der Median lag in Woche 1 bei 2,3 %, in Woche 2-4 bei 2,1 %, in Monat 2-3 bei 2,6 %, in Monat 4-6 bei 2,28 % und in Monat 7-15 bei 1,8 %. Ein statistisch signifikanter Unterschied zeigte sich zwischen Woche 1 und Monat 7-15 sowie Monat 2-3 und Monat 7-15.

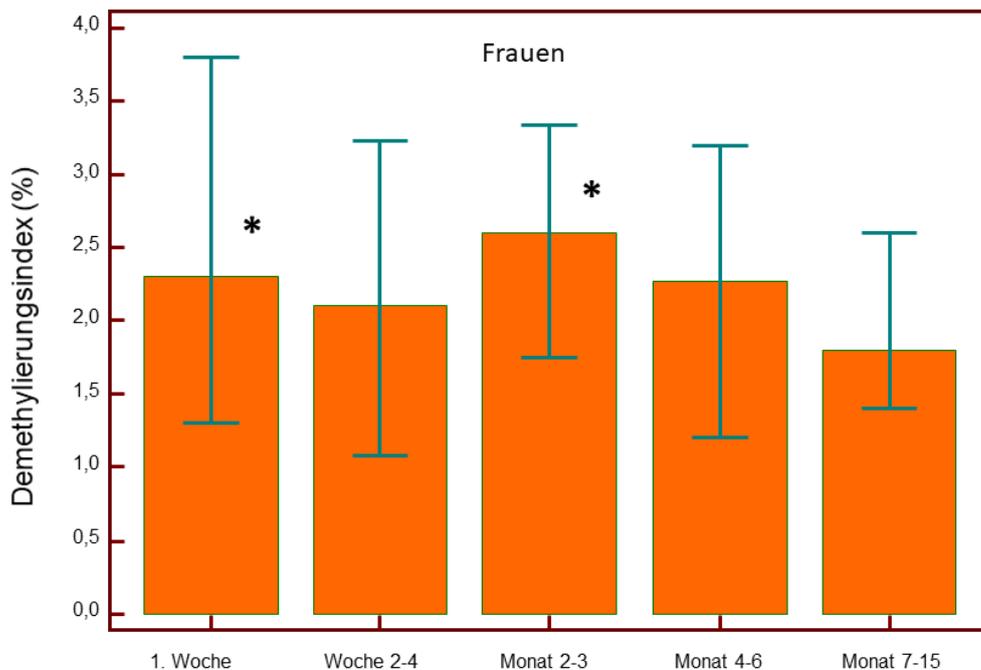


Abbildung 6: Treg-Frequenzen der Frauen (Demethylierungsindex in %, Median, 25., 75. Perzentile) über den Beobachtungszeitraum von 15 Monaten nach Transplantation. \*  $p < 0,05$  vs. Monat 7-15.

### 3.2.1 Vergleich Treg-Frequenzen zwischen den Geschlechtern

Abbildung 7 (und Tabelle 14 im Appendix) zeigt den Vergleich der Treg-Frequenzen beider Geschlechter. Frauen zeigten im Vergleich zu Männern signifikant höhere Treg-Frequenzen in der 1. Woche (2,3 % vs. 1,3 %), im Monat 2-3 (2,6 % vs. 1,3 %), im Monat 4-6 (2,28 % vs. 1,4 %) und im Monat 7-15 (1,8 % vs. 1,2 %). Zudem zeigten sich bei Frauen stärkere Schwankungen der Treg-Frequenzen. Über den Beobachtungszeitraum zeigte sich bei Frauen eine signifikante Reduktion der Treg-Frequenz, bei Männern lediglich ein Trend zur Reduktion.

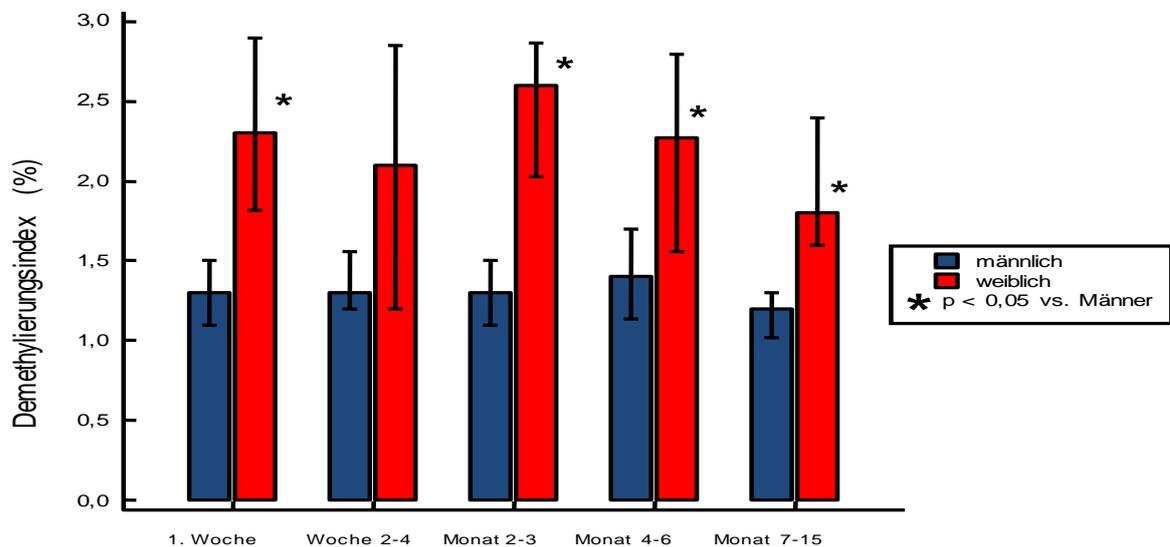


Abbildung 7: Vergleich der Treg-Frequenzen (Demethylierungsindex in %, Median, 25., 75. Perzentile) bei Männern und Frauen mittels Mann-Whitney-Analyse über den Beobachtungszeitraum von 15 Monaten nach Transplantation.

### 3.3 Immunologisches Risiko

#### 3.3.1 PRA und Treg

Bei Patienten mit PRA  $\geq$  15 % versus Patienten PRA  $<$  15 % zeigten sich bei Männern mit PRA  $<$  15 % signifikant höhere Treg-Frequenzen in den Beobachtungszeiträumen Woche 1, Woche 2-4 und Monat 7-15. Bei Frauen zeigte sich hier lediglich zum Zeitpunkt der 1. Woche ein signifikanter Unterschied: Bei PRA  $<$  15 % lag die Treg-Frequenz bei 2,6 % und bei PRA  $\geq$  15 % bei 1,9 % (Tabellen 15/A und 15/B im Appendix).

#### 3.3.2 dnDSA und Treg

Es zeigte sich bei beiden Geschlechtern kein signifikanter Unterschied in den Treg-Frequenzen bei Patienten mit Entwicklung von dnDSA versus Patienten ohne Entwicklung von dnDSA. Auch bei Auswertung des Gesamtkollektivs (nach Transformation der Daten in Perzentile, um die Anzahl zu erhöhen) war kein Effekt der dnDSA zu beobachten (Tabellen 16/A-C im Appendix).

#### 3.3.3 HLA-Mismatches und Treg

Im Vergleich von Patienten mit HLA-Mismatches  $\geq$  3 versus HLA-Mismatches  $<$  3 zeigten sich bei beiden Geschlechtern keine signifikanten Unterschiede bezüglich der Treg-Frequenzen (Tabellen 17/A und 17/B im Appendix).

#### 3.3.4 Alter und Treg

Mit der Spearman-Korrelation wurde der Zusammenhang zwischen den Treg-Frequenzen und dem Alter der Patienten geprüft, es zeigte sich hierbei bei beiden Geschlechtern keine signifikante Korrelation (Tabellen 18/A und 18/B im Appendix).

### 3.3.5 AB0i/AB0k Transplantation und Treg

Bei AB0i versus AB0k Transplantationen zeigten sich bei Männern im Zeitraum Woche 2-4 signifikant höhere Treg-Frequenzen (2,25 % vs. 1,3 %). Bei Frauen ließen sich hingegen keine signifikanten Unterschiede zwischen AB0i und AB0k Transplantationen nachweisen (Tabellen 19/A und 19/B im Appendix).

### 3.3.6 Präemptive Transplantation und Treg

Bei präemptiven versus nicht-präemptiven Transplantationen zeigten sich bei beiden Geschlechtern keine signifikanten Unterschiede bezüglich der Treg-Frequenzen (Tabellen 20/A und 20/B im Appendix).

## 3.4 Treg und Abstoßungen

Es wurde geprüft, ob Unterschiede bezüglich der Treg-Frequenzen bei Patienten mit und ohne Abstoßung vorlagen. Dazu wurden die Treg-Frequenzen in den gewählten Beobachtungszeiträumen mit dem Mann-Whitney-U-Test verglichen (Tabelle 21 im Appendix). Darüber hinaus wurde der Zusammenhang zwischen den Treg-Frequenzen und der Wahrscheinlichkeit für das Ausbleiben einer Abstoßung untersucht, hierfür wurden die in Perzentilen transformierten Daten des Gesamtkollektivs in Quartile aufteilt und in einer Kaplan-Meier-Analyse dargestellt. Weiterhin wurde der Log-Rank-Test benutzt, um mehrere Kaplan-Meier Kurven zu vergleichen.

Abbildung 8 zeigt die Wahrscheinlichkeit keine Abstoßung über den Beobachtungszeitraum zu erleiden, in Abhängigkeit von der Treg-Frequenz in der 1. Woche nach Transplantation (Daten in Quartile aufgeteilt). Es zeigte sich kein Zusammenhang zwischen der Treg-Frequenz und der Wahrscheinlichkeit für das Ausbleiben einer Abstoßungsreaktion.

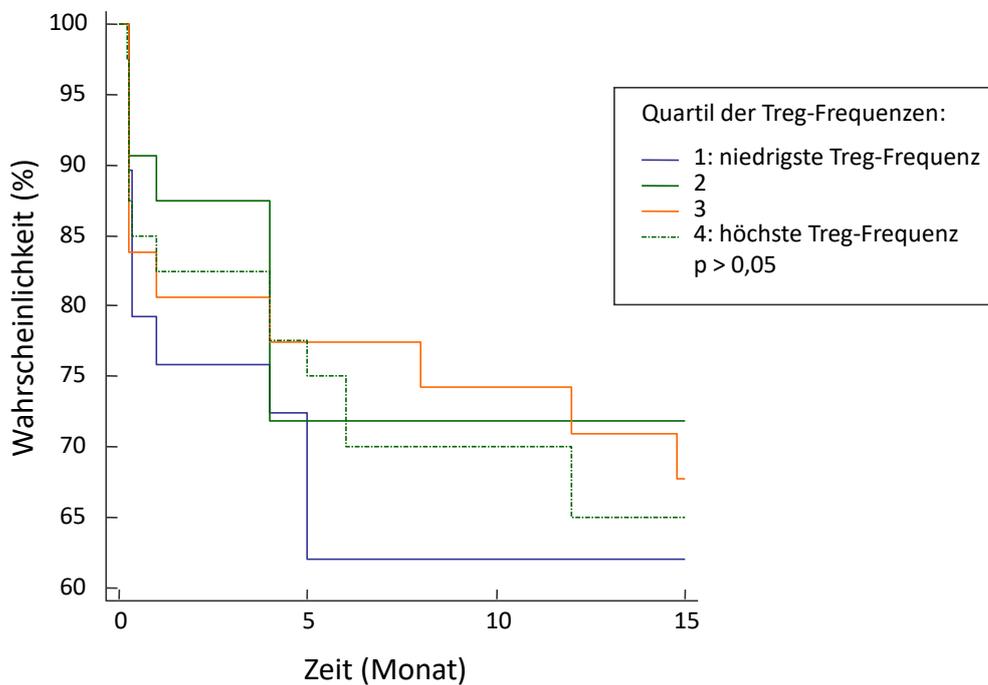


Abbildung 8: Wahrscheinlichkeit im Beobachtungszeitraum (15 Monate) keine Abstoßung zu erleiden, in Abhängigkeit der Treg-Frequenz in der 1. Woche. Um Frauen und Männer als Gesamtkollektiv auswerten zu können, wurde die Treg-Frequenz bei beiden Geschlechtern in Perzentilen transformiert und dann in Quartile aufgeteilt.

Abbildung 9 zeigt die Wahrscheinlichkeit keine Abstoßung über den Beobachtungszeitraum zu erleiden, in Abhängigkeit von der Treg-Frequenz in Woche 2-4 nach Transplantation (Daten in Quartile aufgeteilt). Es zeigte sich hier kein signifikanter Unterschied ( $p = 0,07$ ). Der Log-Rank-Test war allerdings mit  $p = 0,03$  signifikant. Eine höhere Treg-Frequenz scheint mit weniger Abstoßungsereignissen assoziiert zu sein.

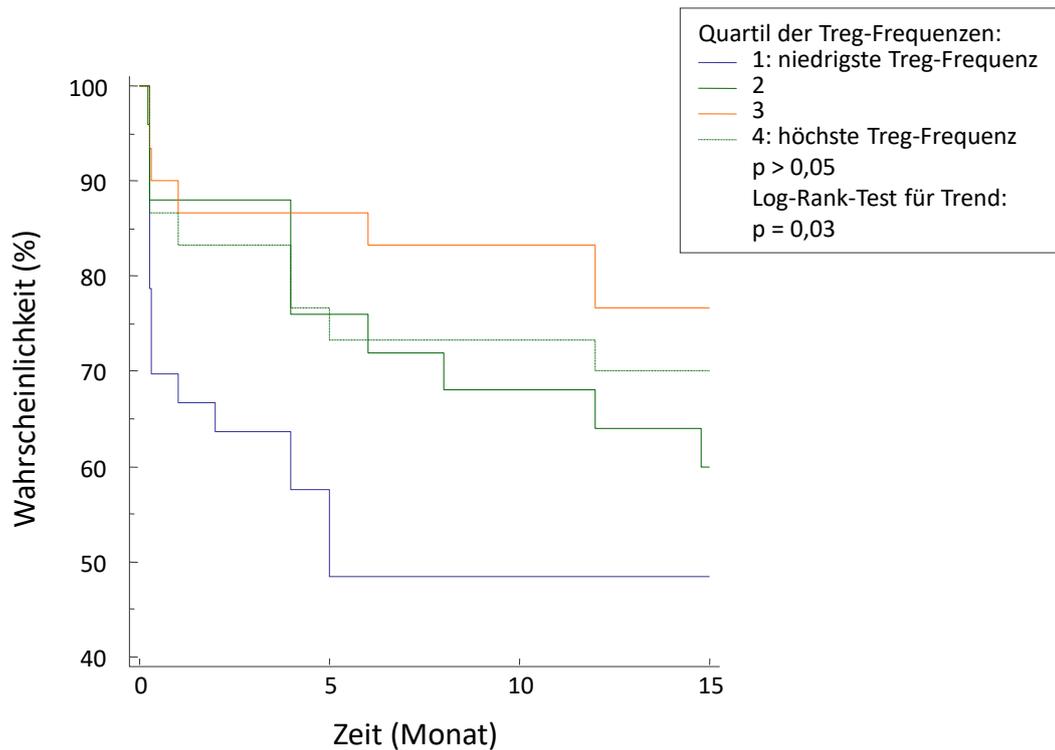


Abbildung 9: Wahrscheinlichkeit im Beobachtungszeitraum (15 Monate) keine Abstoßung zu erleiden, in Abhängigkeit der Treg-Frequenz in Woche 2-4. Um Frauen und Männer als Gesamtkollektiv auswerten zu können, wurde die Treg-Frequenz bei beiden Geschlechtern in Perzentilen transformiert und dann in Quartile aufgeteilt.

Abbildung 10 zeigt die Wahrscheinlichkeit für das Ausbleiben einer Abstoßung in Abhängigkeit von der Treg-Frequenz in der 1. Woche, nach Aufteilung des Kollektivs in 2 Perzentile (Treg oberhalb und unterhalb des Medians). Es zeigte sich kein Zusammenhang zwischen der Treg-Frequenz und der Wahrscheinlichkeit für das Ausbleiben einer Abstoßungsreaktion.

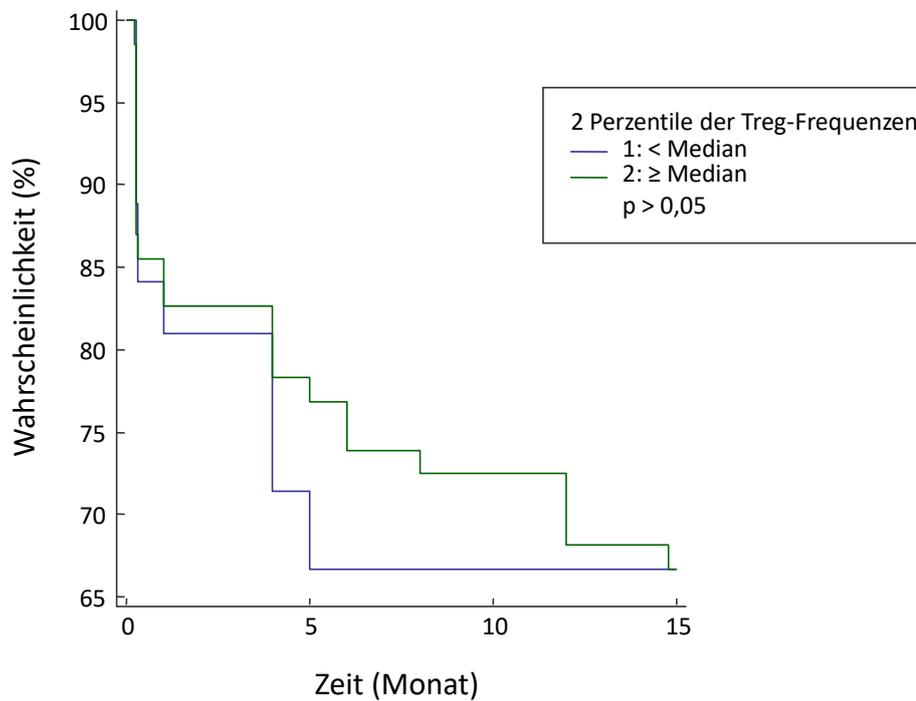


Abbildung 10: Wahrscheinlichkeit im Beobachtungszeitraum (15 Monate) keine Abstoßung zu erleiden, in Abhängigkeit der Treg-Frequenz in der 1. Woche nach Transplantation. Vergleich der Daten oberhalb und unterhalb des Medians. Um Frauen und Männer als Gesamtkollektiv auswerten zu können, wurde die Treg-Frequenz bei beiden Geschlechtern in Perzentilen transformiert.

Abbildung 11 zeigt die Wahrscheinlichkeit für das Ausbleiben einer Abstoßung, in Abhängigkeit von der Treg-Frequenz in Woche 2-4 (Daten oberhalb und unterhalb des Medians). Es zeigte sich ein signifikanter Zusammenhang zwischen der Treg-Frequenz oberhalb des Medians und der Wahrscheinlichkeit für das Ausbleiben einer Abstoßung ( $p = 0,02$ ).

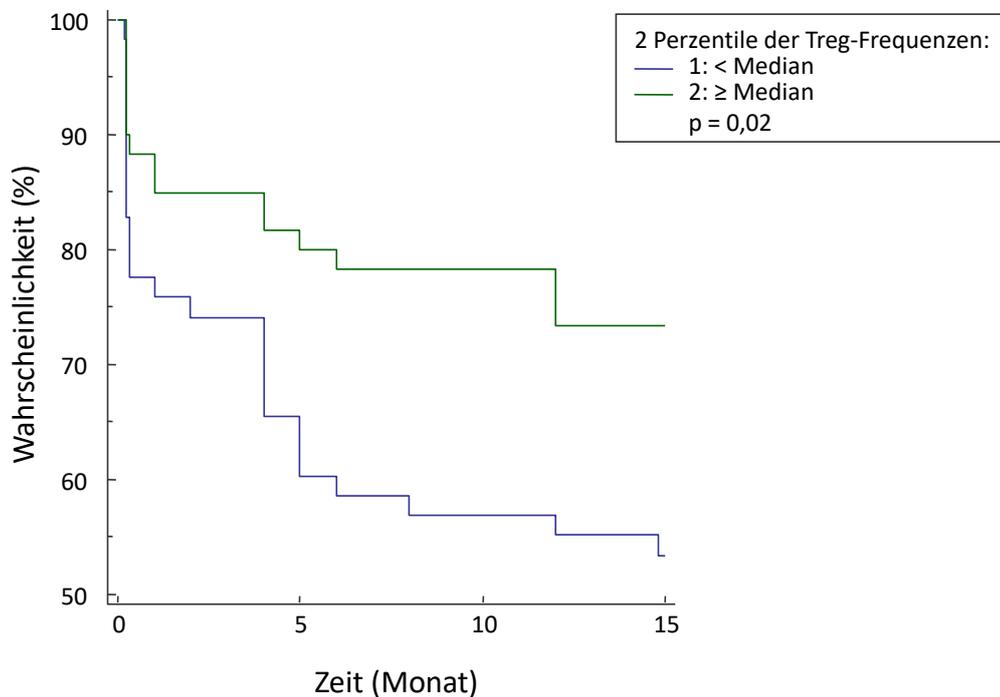


Abbildung 11: Wahrscheinlichkeit im Beobachtungszeitraum (15 Monate) keine Abstoßung zu erleiden, in Abhängigkeit der Treg-Frequenz in Woche 2-4 nach Transplantation. Vergleich der Daten oberhalb und unterhalb des Medians. Um Frauen und Männer als Gesamtkollektiv auswerten zu können, wurde die Treg-Frequenz bei beiden Geschlechtern in Perzentilen transformiert.

### 3.5 Zusammenhang zwischen Typ der Abstoßung und der Treg-Frequenz

Im untersuchten Patientenkollektiv wurden Borderline-Abstoßungen (n = 23), antikörperbasierte Abstoßungen (ABMR, n = 14) und T-Zell vermittelte Abstoßungen (TCMR, n = 5) detektiert und die entsprechenden Treg-Frequenzen zum Zeitpunkt Woche 2-4 mit Patienten ohne Abstoßung verglichen. Wegen der geringen Fallzahlen wurden wieder die Daten von Frauen und Männern zusammengefasst und zur Vergleichbarkeit zuvor in Perzentilen transformiert.

Im Vergleich ABMR versus keine Abstoßung zeigte sich kein signifikanter Unterschied hinsichtlich der Treg-Frequenzen als Perzentil ausgedrückt (Abbildung 12, Tabelle 22 im Appendix).

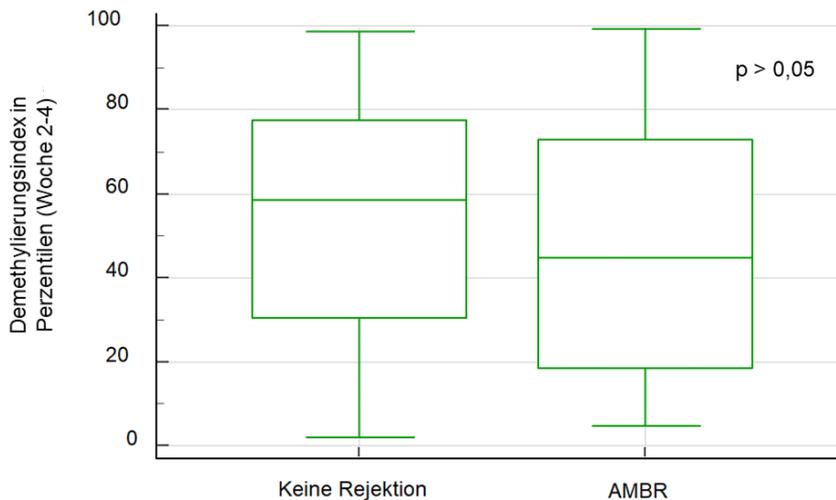


Abbildung 12: Unterschied der Treg-Frequenzen bei Patienten mit antikörpervermittelter Abstoßung (ABMR) versus keine Rejektion in Woche 2-4 (Box-Whisker-Blot, Minimum, Median, 25. und 75. Perzentile, Maximum). Für die gemeinsame Auswertung der Daten bei Frauen und Männern wurden die Daten vor der Auswertung in Perzentilen transformiert.

Aufgrund der geringen Anzahl von TCMR wurde eine Gruppe zusammen mit den Borderline-Abstoßungen gebildet und die Treg-Frequenzen nach Normalisierung in Perzentilen mit Patienten ohne Abstoßung verglichen (Abbildung 13 und Tabelle 23 im Appendix). Auch hier zeigte sich kein signifikanter Unterschied ( $p = 0,07$ ).

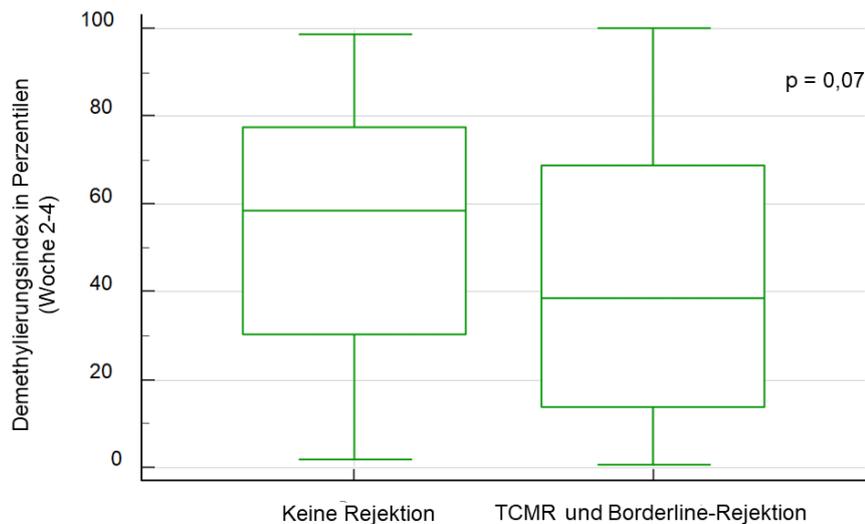


Abbildung 13: Unterschied der Treg-Frequenzen bei Patienten mit (TCMR) und ohne T-zellvermittelter Abstoßung in Woche 2-4 (Box-Whisker-Blot, Minimum, Median, 25. und 75. Perzentile, Maximum; Borderline-Rejektionen inkludiert). Für die gemeinsame Auswertung der Daten bei Frauen und Männern wurden die Daten vor der Auswertung in Perzentilen transformiert.

### 3.5.1 Receiver-Operating-Characteristics-Kurve

Die Receiver-Operating-Characteristics-Kurve (ROC-Kurve) überprüft die diagnostische Qualität eines Tests. Im vorliegenden Kontext wurde hiermit überprüft, ob sich die Treg-Frequenz eignet, um zwischen Patienten mit und ohne Abstoßung zu unterscheiden (Abbildung 14). Es wurden die Treg-Frequenzen im Zeitfenster Woche 2-4 und alle Abstoßungen danach (im und nach dem 1. Monat) zur Auswertung ausgewählt, da für dieses Zeitfenster in der Kaplan-Meier-Analyse ein signifikantes Ergebnis beobachtet wurde. Da es sich um eine Auswertung des Gesamtkollektivs handelt, wurden die Treg-Frequenzen bei den Männern und Frauen vor der Analyse in Perzentilen transformiert. Wenn die Analyse zum Zeitpunkt der Abstoßungsreaktion durchgeführt wird, kann mit dem Verfahren die diagnostische Sensitivität und Spezifität ermittelt werden. Wenn die Analyse zu einem Zeitpunkt vor dem

Auftreten der Abstoßung erfolgt, erhält man die Sensitivität und Spezifität des Testes zur Vorhersage von Abstoßungsreaktionen.

Die „optimale Schwelle“ (= Schwellenwert oder Cut-Off), d.h. der ROC-Wert, der den größten Normalabstand zur Diagonale des Diagramms hat, lag bei der 47,88 Perzentile. Dies bedeutet, dass bei diesem Wert für die Treg-Frequenz die beste Trennung zwischen Patienten mit und ohne Abstoßung vorlag. Bei einem Cut-Off von 47,88 hatte der FOXP3 DI zur Detektion von Abstoßungsreaktionen eine Sensitivität von 62,8 % und eine Spezifität von 62,7 %.

Der positive prädiktive Wert lag bei 22,9 %, der negative prädiktive Wert bei 90,5 %. Bei einem positiven Test (d.h. FOXP3 DI  $\geq$  Perzentile 47,88) ist das Vorliegen einer Abstoßungsreaktion mit 22,9 % Wahrscheinlichkeit zu erwarten und keine Abstoßung mit 90,5 %.

Ein Maß für die Güte des Tests oder auch für die Qualität eines Klassifikators (die Aussagekraft von FOXP3 DI bezüglich einer möglichen Abstoßungsreaktion) ist die Fläche unter der ROC-Kurve (area under the curve, AUC). Die AUC lag mit 0,613 nur mäßig hoch. Die Menge von nTreg im peripheren Blut im ersten Monat nach Nierentransplantation eignet sich daher eher nur bedingt, um zwischen Patienten mit oder ohne Abstoßungsreaktion zu unterscheiden. Es soll noch einmal erwähnt werden, dass es sich bei dem angegebenen Cut-Off nicht direkt um die gemessene Treg-Frequenz handelt, sondern um die Perzentile der Treg-Frequenz nach Transformation. Berechnet man den Cut-Off von 47,88 (Perzentile) aus der ROC-Kurve auf die Geschlechter zurück, dann entspricht dies einem DI von 1,3 % bei Männern und 1,8 % bei Frauen.

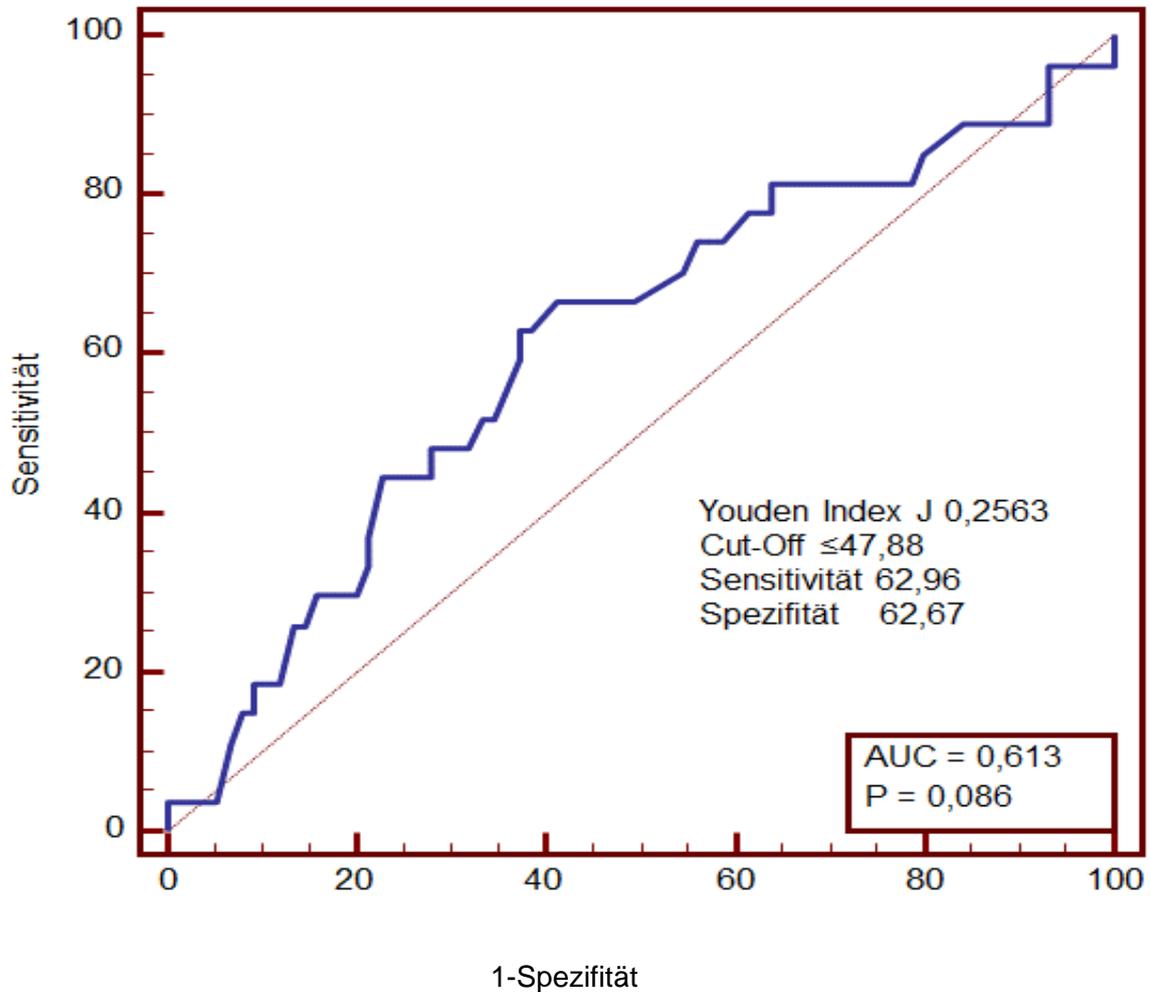


Abbildung 14: Receiver-Operating-Characteristics (ROC)-Kurve: Perzentile der Treg-Frequenz im Gesamtkollektiv zum Zeitpunkt Woche 2-4 und Abstoßungen im und nach dem 1. Monat. AUC: area under the curve.

### 3.6 Zusammenhang zwischen Treg und Funktionsverschlechterung

Als Maß für die Funktionsverschlechterung wurde das Delta-Kreatinin berechnet (Kasiske et al. 2001). Es wurde geprüft, ob Unterschiede in der Treg-Frequenz bei Patienten mit versus ohne Funktionsverschlechterung vorlagen.

Bei der Funktionsverschlechterung wurde die erste Woche nicht berücksichtigt. Es zeigten sich nur für den Zeitraum Monat 4-6 signifikante Unterschiede (geringere Treg-Frequenz bei Funktionsverschlechterung,  $p = 0,01$ ). Die Ergebnisse sind in Abbildung 15 (und Tabelle 24 im Appendix) dargestellt.

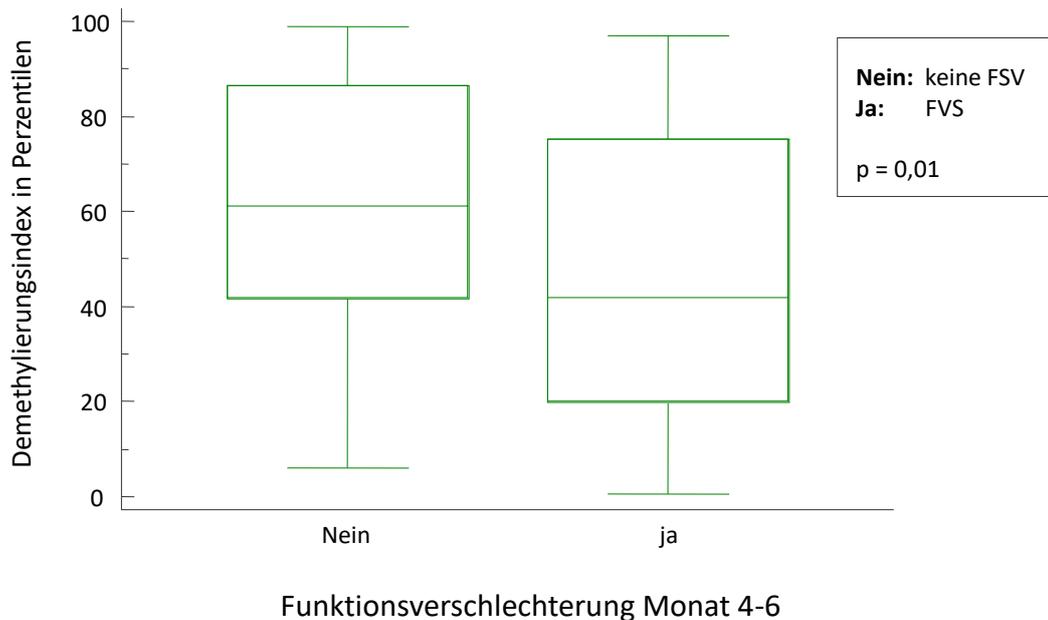


Abbildung 15: Vergleich der Treg-Frequenzen bei Patienten mit (n=63) und ohne (n=89) Funktionsverschlechterung im Zeitraum Monat 4-6 nach Transplantation (Box-Whisker-Blot, Median, 25. und 75. Perzentile). Für die gemeinsame Auswertung der Daten bei Frauen und Männern wurden die Daten vor der Auswertung in Perzentilen transformiert. FSV: Funktionsverschlechterung.

Die Daten wurden in Quartile aufteilt und in einer Kaplan-Meier-Analyse bezüglich eines Zusammenhanges zwischen Treg-Frequenz und der Wahrscheinlichkeit für das Ausbleiben einer Funktionsverschlechterung geprüft. Hierbei zeigte sich kein signifikanter Zusammenhang ( $p = 0,16$ ). Die Ergebnisse sind in Abbildung 16 dargestellt.

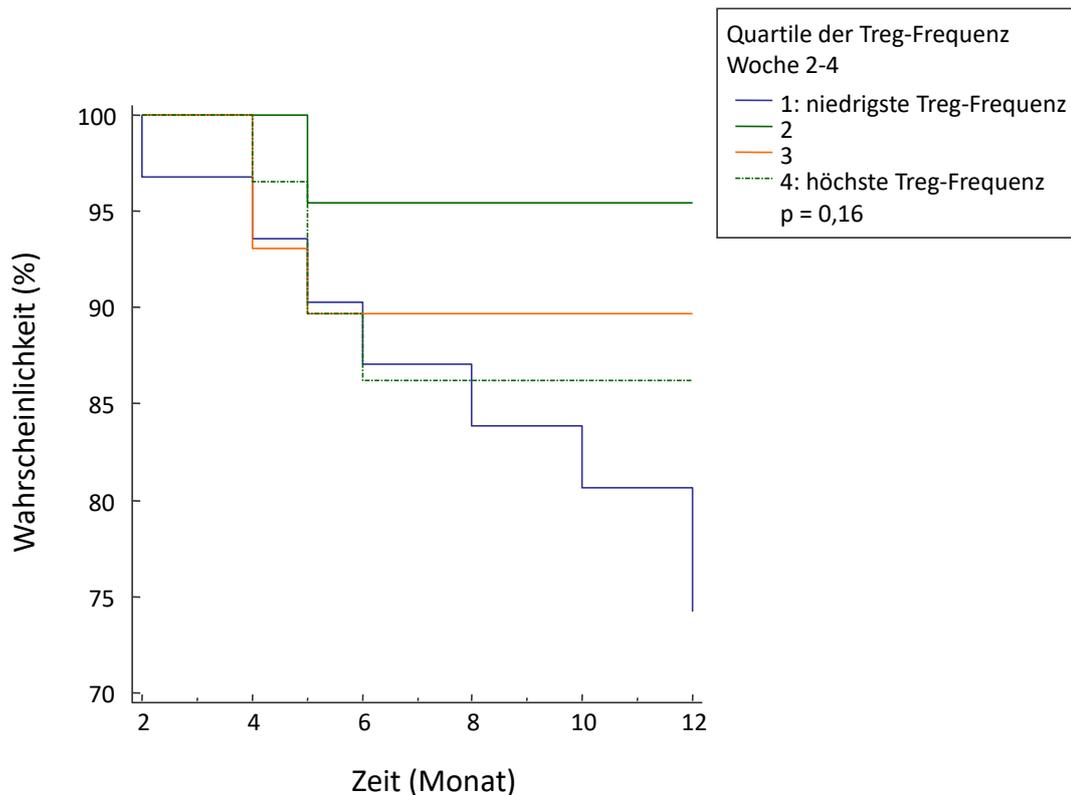


Abbildung 16: Wahrscheinlichkeit im Beobachtungszeitraum keine Funktionsverschlechterung (Delta-Kreatinin) zu erleiden, in Abhängigkeit der Treg-Frequenz. Um Frauen und Männer als Gesamtkollektiv auswerten zu können, wurde die Treg-Frequenz bei beiden Geschlechtern in Perzentilen transformiert.

Es zeigte sich ebenso kein signifikanter Zusammenhang zwischen der Treg-Frequenz und der Wahrscheinlichkeit für das Ausbleiben einer Funktionsverschlechterung, wenn man das Kollektiv in zwei Gruppen oberhalb und unterhalb des Medians aufteilte ( $p = 0,50$ ). Die Darstellung ist in Abbildung 17 aufgeführt.

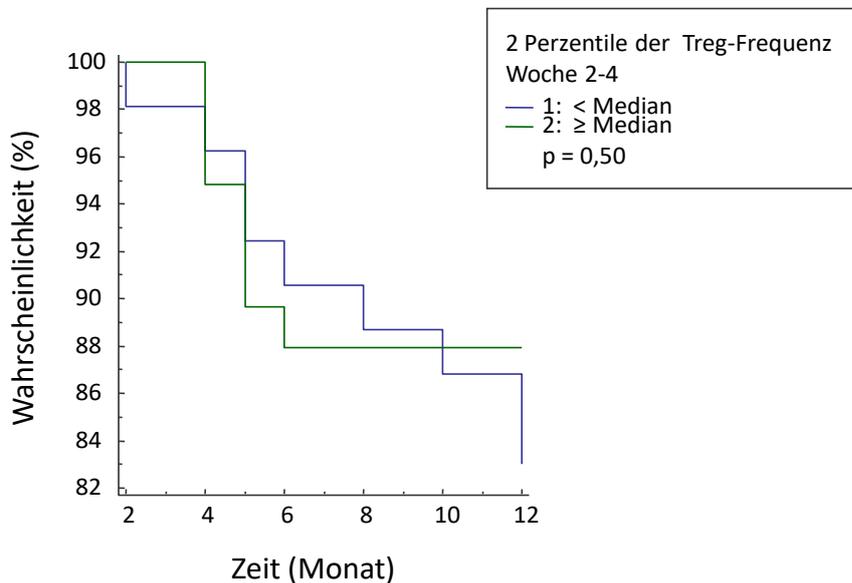


Abbildung 17: Wahrscheinlichkeit im Beobachtungszeitraum keine Funktionsverschlechterung (Delta-Kreatinin) zu erleiden, in Abhängigkeit der Treg-Frequenz. Vergleich der Daten oberhalb und unterhalb des Medians. Um Frauen und Männer als Gesamtkollektiv auswerten zu können, wurde die Treg-Frequenz bei beiden Geschlechtern in Perzentilen transformiert.

### 3.7 Keimspektrum im Patientenkollektiv

#### 3.7.1 Harnwegsinfekte

Es wurden insgesamt 105 Harnwegsinfekte beobachtet. Davon waren 12 Fälle ohne Keimnachweis. Bei den 93 Fällen mit Erregernachweis konnten nachgewiesen werden: E. coli (n = 37), Enterokokken (n = 23) und Pseudomonaden (n = 12). Weiterhin zeigten sich Enterobacter (n = 9), andere Erreger (n = 5), Klebsiellen (n = 4) und Proteus (n = 3).

### 3.7.2 Atemwegsinfektionen

In der untersuchten Kohorte wurden 20 Atemwegsinfekte beobachtet, jeweils ohne Erregernachweis.

### 3.7.3 Zytomegalievirus-Infektionen

Es wurden 14 CMV-Infektionen beobachtet. Hierunter hatten 4 Patienten eine deutliche Funktionsverschlechterung des Transplantats, bei hoher Viruslast. Bei einem dieser 4 Patienten zeigte sich eine geringe interstitielle Rejektion (Banff: Borderline-Rejektion).

### 3.7.4 Polyomavirus-Infektionen

Es wurden 23 BKV-Infektionen beobachtet. Hierunter war ein Verlauf klinisch asymptomatisch, bei geringer Viruslast. Bei 11 Patienten zeigten sich Funktionsverschlechterungen des Transplantats, bei BKV-typischen Veränderungen (Biopsie) in 4 Fällen. In 3 Fällen wurden Rejektionen (humoral, vaskulär, Borderline) nachgewiesen.

### 3.7.5 Epstein-Barr-Virus-Infektionen

Es wurde eine EBV-Infektion beobachtet. Hierbei kam es zu keiner Funktionsverschlechterung oder Rejektion.

### 3.7.6 Herpes-Simplex-Virus-Infektionen

Es wurden keine HSV-Infektionen beobachtet.

### 3.7.7 Varizella-Zoster-Virus-Infektionen

Es wurden 5 VZV-Infektionen beobachtet, 2 führten zu einer reversiblen Funktionsverschlechterung des Transplantats.

### 3.8 Zusammenhang zwischen Treg und Infektionen

Alle Infektionen (bakteriell und viral) wurden über 15 Monate dokumentiert. Es wurde geprüft, ob es Unterschiede bezüglich der Treg-Frequenzen bei Patienten mit und ohne Infektion im Beobachtungszeitraum gab. Hierzu wurden die Treg-Frequenzen nach Transformation in Perzentilen mit dem Mann-Whitney-U-Test verglichen. Im Zeitraum Woche 2-4 lag nur ein bakterieller Infekt vor, sodass die Auswertungen bakterieller Infektionen erst ab Monat 2-3 begannen. Es zeigten sich hier keine signifikanten Unterschiede (Tabelle 25 im Appendix). Ebenso wurden nur die viralen Infektionen, die für Überimmunsuppression besonders charakteristisch sind, einzeln betrachtet. Auch hier zeigten sich keine signifikanten Unterschiede (Tabelle 26 im Appendix). Darüber hinaus wurden die Daten in Quartile aufteilt und in einer Kaplan-Meier-Analyse geprüft, bezüglich Zusammenhang Menge der Treg im peripheren Blut und der Wahrscheinlichkeit für das Ausbleiben von viralen Infektionen. Die entsprechende Darstellung für Woche 2-4 ist der Abbildung 18 zu entnehmen. Es ließ sich mit dem Log-Rank-Test kein signifikanter Zusammenhang zwischen Treg-Frequenz und der Wahrscheinlichkeit für das Ausbleiben einer viralen Infektion erkennen.

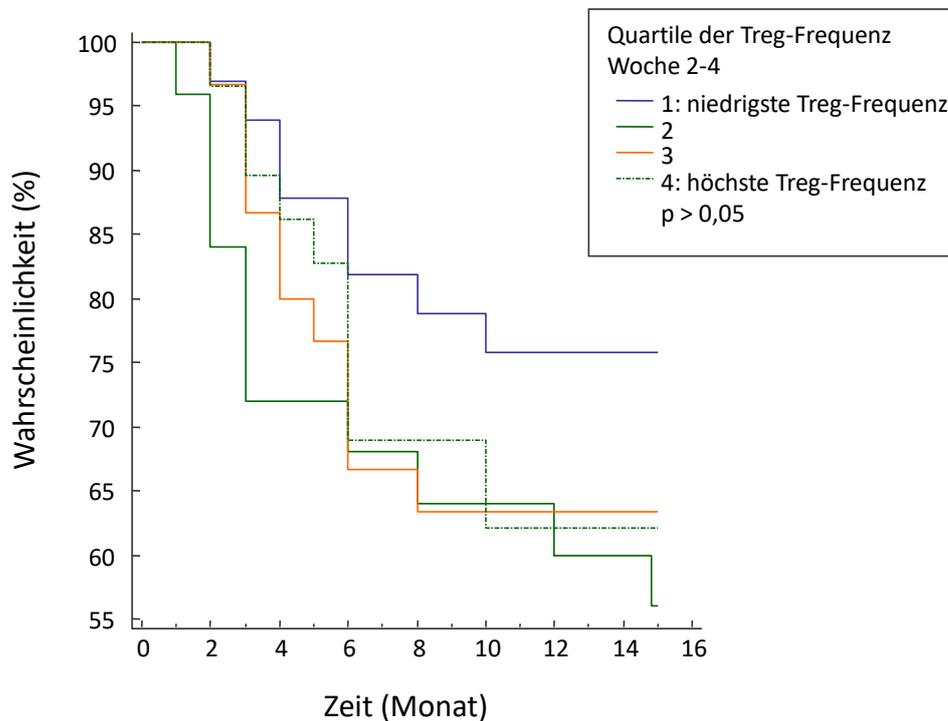


Abbildung 18: Wahrscheinlichkeit im Beobachtungszeitraum (15 Monate) keine virale Infektion zu erleiden, in Abhängigkeit von der Treg-Frequenz. Um Frauen und Männer als Gesamtkollektiv auswerten zu können, wurde die Treg-Frequenz bei beiden Geschlechtern in Perzentilen transformiert.

### 3.9 Effekte der immunsuppressiven Therapie auf Treg

#### 3.9.1 Induktionstherapien und ihre Effekte auf Treg

Betrachtet man die gesamte Patientenkohorte bezüglich der Effekte der Induktionstherapien auf die Treg-Frequenz, so zeigten sich zwischen Basiliximab (Monotherapie) und ATG relevante Unterschiede in der Anfangszeit (1. Woche und Woche 2-4). ATG reduzierte die Treg-Frequenz in diesen Zeiträumen signifikant. In der 1. Woche zeigte sich zusätzlich eine signifikante Reduktion der Treg-Frequenz unter Basiliximab/Rituximab versus Basiliximab

Monotherapie. Dieser Effekt ließ sich in Woche 2-4 nicht mehr nachweisen. In Woche 2-4 zeigte sich weiterhin eine signifikante Reduktion der Treg-Frequenz unter ATG versus Basiliximab/Rituximab. Dieser Effekt ließ sich wiederum in der 1. Woche nicht nachweisen (Abbildungen 19 und 20 sowie Tabelle 27/C im Appendix).

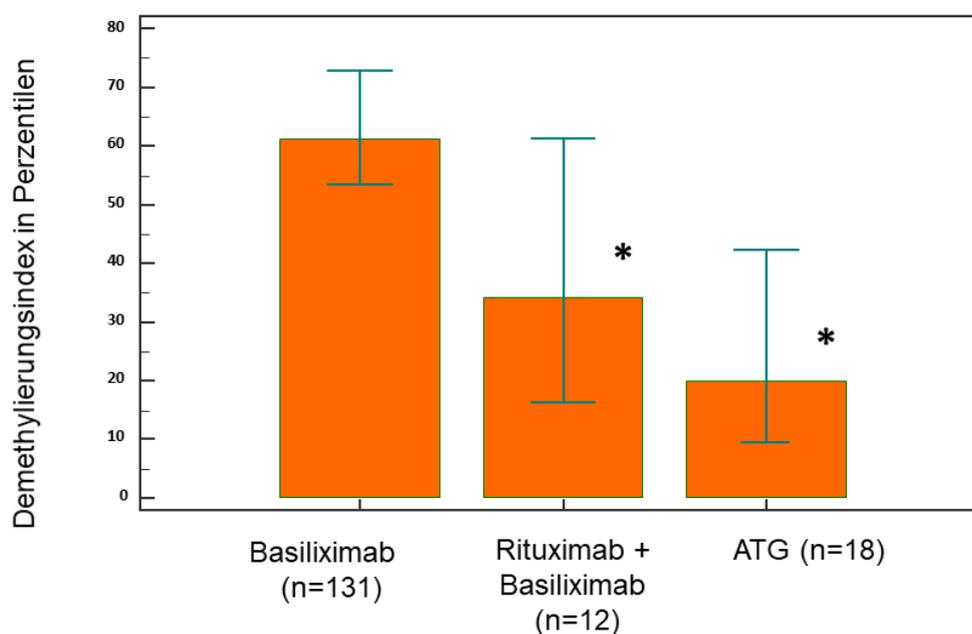


Abbildung 19: Vergleich der Treg-Frequenzen in der 1. Woche in Abhängigkeit von der Induktionstherapie (Median, 25., 75. Perzentile). Um Frauen und Männer als Gesamtkollektiv auswerten zu können, wurde die Treg-Frequenz bei beiden Geschlechtern in Perzentilen transformiert. \*  $p < 0,05$  vs. Basiliximab (mono).

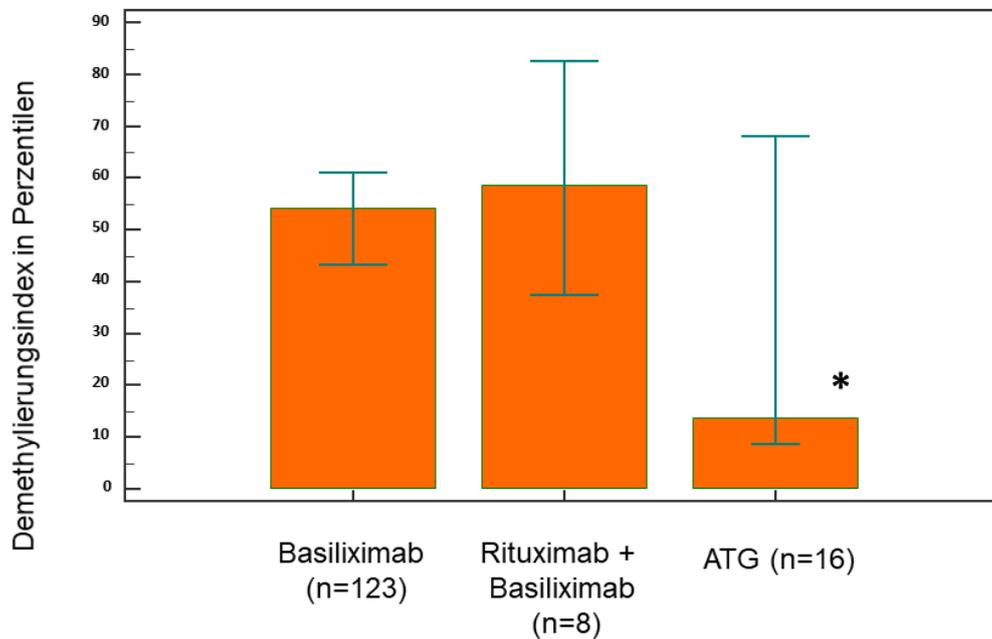


Abbildung 20: Vergleich der Treg-Frequenzen in der Woche 2-4 in Abhängigkeit von der Induktionstherapie (Median, 25., 75. Perzentile). Um Frauen und Männer als Gesamtkollektiv auswerten zu können, wurde die Treg-Frequenz bei beiden Geschlechtern in Perzentilen transformiert. \*  $p < 0,05$  vs. Basiliximab (mono) und vs. Rituximab + Basiliximab.

### 3.9.2 Induktionstherapien bei Männern

Es wurde untersucht, ob Unterschiede in der Treg-Frequenz bei Männern mit unterschiedlichen Induktionstherapien während des Beobachtungszeitraumes vorlagen. Die drei möglichen Induktionstherapien wurden untereinander geschlechterspezifisch mittels Mann-Whitney-Test verglichen.

Bei Männern zeigte sich im Vergleich zwischen Basiliximab (Monotherapie) und Rituximab/Basiliximab eine signifikante Reduktion der Treg-Frequenz für Basiliximab/Rituximab im Zeitraum der 1. Woche. Außerdem zeigte sich eine signifikante Reduktion der Treg-Frequenz unter Basiliximab im Vergleich mit

Basiliximab/Rituximab in der Woche 2-4. In den gleichen Zeiträumen zeigten sich signifikante Reduktionen der Treg-Frequenzen unter ATG beim Vergleich mit Basiliximab (Monotherapie). Ebenso zeigte sich unter ATG in Woche 2-4 eine signifikante Reduktion der Treg-Frequenz im Vergleich zu Basiliximab/Rituximab (Tabelle 27/A im Appendix).

### 3.9.3 Induktionstherapien bei Frauen

Bei Frauen ließen sich keine signifikanten Unterschiede bezüglich Treg-Frequenz zwischen den Induktionen Basiliximab (Monotherapie) und Basiliximab/Rituximab feststellen. Zum Zeitpunkt Monat 2-3 zeigte sich sowohl unter Basiliximab (Monotherapie) als auch unter Basiliximab/Rituximab eine signifikante Reduktion der Treg-Frequenz im Vergleich zu ATG (Tabelle 27/B im Appendix). Die Effekte im Gesamtkollektiv sind daher auf den Effekt der männlichen Patienten zurückzuführen.

### 3.9.4 Effekte der Erhaltungstherapie auf Treg

Für die Glukokortikosteroid-Dosis zeigte sich keine wesentliche Korrelation zwischen Dosis und Treg-Frequenzen (Tabelle 28 im Appendix).

Bei einer Immunsuppression mit Tacrolimus zeigte sich zu keinem Zeitpunkt eine Korrelation zwischen der Konzentration vor der nächsten Dosis und den Treg-Frequenzen (Tabelle 29 im Appendix).

Bei den MPA-Konzentrationen zeigte sich lediglich eine schwach positive Korrelation zwischen MPA-Konzentrationen und Treg-Frequenzen (Tabelle 30 im Appendix).

## 4 Diskussion

Treg spielen eine wichtige Rolle im Rahmen der physiologischen Immunsuppression. Sie können das Risiko für die Entstehung von Autoimmunerkrankungen senken, Rejektionen nach Transplantation verhindern oder eine überschießende Inflammation limitieren. Treg werden daher auch als Biomarker für wichtige klinische Ereignisse wie die Rejektion diskutiert.

In der vorliegenden Arbeit wurden nTreg in den ersten 15 Monaten nach Nierentransplantation gemessen und es wurde untersucht, ob ein Zusammenhang zwischen der Treg-Frequenz und klinischen Ereignissen wie beispielsweise Rejektion, Funktionsverschlechterung des Transplantats oder Infektion besteht. Weiterhin wurde der Zusammenhang zwischen der Treg-Frequenz und Geschlecht, Alter, immunologischem Risiko, Transplantationsart (ABOi, präemptiv) oder immunsuppressiver Therapie untersucht. Im Folgenden werden die entsprechenden Ergebnisse nun separat diskutiert.

### 4.1 Effekte der Induktionstherapie auf Treg

Patienten wurden mit Basiliximab, Basiliximab/Rituximab oder ATG induziert. In der gesamten Kohorte zeigte sich initial (Woche 1 und Woche 2-4) unter ATG eine signifikante Reduktion der Treg-Frequenz im Vergleich zu Basiliximab oder Basiliximab/Rituximab. Im restlichen Beobachtungszeitraum zeigte sich dieser Effekt nicht mehr. Weiterhin zeigte sich in der gesamten Kohorte und bei Männern in der 1. Woche eine signifikante Reduktion der Treg-Frequenz unter Basiliximab/Rituximab versus Basiliximab. Bei Männern zeigte sich zusätzlich eine signifikante Reduktion der Treg-Frequenz in Woche 2-4 unter Basiliximab versus Basiliximab/Rituximab. Bei Frauen zeigte sich interessanterweise bei den Induktionstherapien kein Effekt auf die Treg-Frequenz, lediglich zum Zeitpunkt Monat 2-3 konnte eine signifikante Reduktion unter Basiliximab oder Basiliximab/Rituximab versus ATG beobachtet werden.

ATG sind polyklonale Antikörper gegen humane Lymphozyten, sodass eine Reduktion der Treg-Frequenz prinzipiell zu erwarten ist. Allerdings zeigte sich dieser Effekt in der vorliegenden Arbeit nur initial und nicht über den gesamten Beobachtungszeitraum. Es ist jedoch auch beschrieben, dass rATG nur initial die Treg-Frequenz reduziert. Im Verlauf erholt diese sich wieder durch Verschiebung des Gleichgewichtes zwischen Treg und T-Effektor-Zellen (Furukawa et al. 2016). Zusammenfassend kann also festgehalten werden, dass die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit bezüglich ATG mit den Ergebnissen der Literatur übereinstimmen. Es ist jedoch anzumerken, dass eine Reduktion der Treg-Frequenz unter ATG bei Frauen nicht gezeigt werden konnte. Dies ist möglicherweise durch die geringe Fallzahl bedingt, zumindest ließ sich ein Trend zur Reduktion der Treg-Frequenz beobachten.

Auch unter Basiliximab ist eine Reduktion der Treg-Frequenz beschrieben. Passend zu den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit ist eine Reduktion der Treg-Frequenz unter Basiliximab beschrieben (Camirand und Riella 2017). Es ist anzumerken, dass die Reduktion der Treg-Frequenz in der vorliegenden Arbeit nicht nur unter Basiliximab, sondern auch unter Basiliximab/Rituximab beobachtet wurde, sodass sich die Frage des Einflusses von Rituximab stellt. Rituximab scheint allerdings keinen Effekt auf die Treg-Frequenz bei Nierentransplantierten zu besitzen (Furukawa et al. 2016). Die Rituximab Monotherapie wurde in der vorliegenden Arbeit nicht untersucht.

#### 4.2 Effekte der immunsuppressiven Erhaltungstherapie auf Treg

Es zeigte sich kein Zusammenhang zwischen Treg-Frequenz und der Glukokortikoiddosis. Es ist beschrieben, dass Glukokortikoide keinen wesentlichen Effekt auf die Treg-Frequenz bei Nierentransplantierten besitzen (Camirand und Riella 2017).

CNI besitzen suppressive Effekte auf Treg und reduzieren die Treg-Frequenz (Furukawa et al. 2016). In der vorliegenden Arbeit zeigte sich allerdings kein Zusammenhang zwischen der Treg-Frequenz und den Talspiegeln von

Tacrolimus. Ein Vergleich mit der zitierten Studie ist jedoch methodenbedingt eingeschränkt (Verwendung von FACS und Messung von FOXP3<sup>+</sup> Zellen).

In der vorliegenden Arbeit zeigte sich eine schwach positive Korrelation zwischen MPA-Konzentration und Treg-Frequenz. Es existieren wenige und teilweise widersprüchliche Daten über den Einfluss von MPA auf die Treg-Frequenz. So zeigte sich eine erhöhte Treg-Frequenz unter MPA bei Nierentransplantierten unter immunsuppressiver Triple-Therapie. Passend zum Ergebnis der vorliegenden Arbeit zeigten andere Arbeiten jedoch keinen eindeutigen Effekt auf die Treg-Frequenz, der Einfluss von MPA auf Treg bleibt bis heute unklar (Camirand und Riella 2017).

### 4.3 Immunologisches Risiko

#### 4.3.1 PRA und Treg

In der vorliegenden Arbeit zeigte sich in der Anfangsphase nach Transplantation (bis Woche 4) bei beiden Geschlechtern (bei Männern ebenso nach 7-15 Monaten) ein Unterschied in der Treg-Frequenz in Abhängigkeit von der Höhe der PRA. Die Treg-Frequenzen waren signifikant höher bei PRA < 15 % verglichen mit PRA ≥ 15 %. Anhand der PRA kann das Abstoßungsrisiko eingeschätzt werden. Ein geringer PRA-Wert gilt als Indikator für eine höhere HLA-Kompatibilität und ist somit mit einem geringeren Abstoßungsrisiko verbunden. Die beobachtete signifikant höhere Treg-Frequenz bei PRA < 15 % ist somit möglicherweise ein weiterer wichtiger Faktor für Toleranz nach Nierentransplantation. In der Literatur ist allerdings ebenso eine negative Korrelation zwischen HLA-Kompatibilität und der Treg-Frequenz beschrieben (Sienko et al. 2018). Sienko und Kollegen diskutierten dieses Ergebnis (geringere HLA-Kompatibilität, höhere Treg-Frequenz) jedoch als unerwartet und spekulierten, dass bei geringerer HLA-Kompatibilität möglicherweise mehrere immunologische Vorgänge getriggert werden, unter anderem auch eine Induktion der Treg.

#### 4.3.2 dnDSA und Treg

Im gesamten Beobachtungszeitraum zeigte sich kein signifikanter Zusammenhang zwischen Treg-Frequenz bei Patienten mit oder ohne Nachweis von dnDSA. Der Beobachtungszeitraum war mit 15 Monaten vermutlich zu kurz, da dnDSA sich oft erst später ausbilden (Zhang 2018). In der vorliegenden Arbeit wurden somit erwartungsgemäß relativ wenige Patienten mit dnDSA identifiziert, was die Aussagekraft weiter einschränkt. Passend zum Ergebnis der vorliegenden Arbeit konnte die Arbeitsgruppe um Alberu (Alberu et al. 2012) ebenso keinen Zusammenhang zwischen dnDSA und Treg-Frequenz in der Frühphase nach Transplantation (Monat 1-6) beobachten. Im weiteren Verlauf (Monat 12) zeigte sich jedoch bei Patienten ohne dnDSA eine höhere Treg-Frequenz. Die Autoren schlussfolgerten, dass Patienten mit höherer Treg-Frequenz eine höhere Toleranz zeigen und weniger dnDSA entwickeln. Die Vergleichbarkeit mit der vorliegenden Arbeit ist jedoch durch eine unterschiedliche Methodik (FACS vs. RT-PCR) eingeschränkt. Eine andere Arbeit, in welcher Treg ebenso mittels FACS gemessen wurden, zeigte ebenso keinen Zusammenhang zwischen der Treg-Frequenz und der Entstehung von HLA-Antikörpern (Topal et al. 2013).

#### 4.3.3 HLA-Mismatches und Treg

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde bei HLA-Mismatches  $\geq 3$  von einem erhöhten immunologischen Risiko ausgegangen. Es zeigte sich kein signifikanter Unterschied bezüglich der Treg-Frequenz bei Patienten mit HLA-Mismatches  $\geq 3$  versus HLA-Mismatches  $< 3$ . Es existieren wenige Arbeiten, die den Zusammenhang zwischen Treg-Frequenz und HLA-Kompatibilität untersuchen. Wie oben bereits erwähnt, zeigten Sienko und Kollegen eine negative Korrelation zwischen HLA-Kompatibilität und der Treg-Frequenz (Sienko et al. 2018), diskutierten diesen Zusammenhang als unerwartet und spekulierten darüber, dass bei geringer HLA-Kompatibilität unter anderem Treg induziert werden könnten. Die Vergleichbarkeit mit der vorliegenden Arbeit ist jedoch methodenbedingt eingeschränkt (FACS vs. RT-PCR).

#### 4.3.4 Zusammenhang zwischen Alter und Treg

Es zeigte sich keine signifikante Korrelation zwischen Treg-Frequenz und Alter. Ein jüngeres Alter ist allgemein mit einem potenteren Immunstatus assoziiert und gilt in der Transplantationsmedizin als Risikofaktor für eine Rejektion. Passend hierzu ist in der Literatur ein Anstieg der Treg-Frequenz im Alter beschrieben (Hou et al. 2017), insbesondere für die nTreg (Jagger et al. 2014). Allerdings sind die Daten nicht einheitlich, so wird ebenso über einen Abfall der Treg-Frequenz im Alter berichtet (Takano et al. 2020).

#### 4.3.5 Zusammenhang zwischen AB0i-Transplantation und Treg

Bei AB0i versus AB0k zeigte sich lediglich bei Männern im Zeitraum Woche 2-4 eine signifikant höhere Treg-Frequenz. Die Aussagekraft ist jedoch bei kleiner Fallzahl eingeschränkt. Bei Frauen (Fallzahl AB0i 2-3fach höher) zeigte sich kein Unterschied bezüglich der Treg-Frequenz bei AB0i versus AB0k. Bei AB0i kommt ein intensiveres immunsuppressives Therapieregime zur Anwendung. Im Wesentlichen wird die Plasmapherese oder Immunadsorption und die Gabe von Rituximab angewendet. Es existieren wenig Arbeiten, die den Effekt von Plasmapherese/Immunadsorption auf die Treg-Frequenz untersucht haben. Ein Anstieg der Treg-Frequenz nach Plasmapherese ist beschrieben (Koizumi et al. 2019). Ebenso ist über einen Abfall der Treg-Frequenz nach Immunadsorption, allerdings erst nach der 5. Behandlung, berichtet worden (Kamikozuru et al. 2009). Rituximab hat, wie bereits erwähnt, keinen Einfluss auf die Treg-Frequenz.

#### 4.4 Präemptive Transplantation und Treg

In der vorliegenden Arbeit zeigte sich kein signifikanter Unterschied bezüglich der Treg-Frequenz bei Patienten mit oder ohne Dialysetherapie. Auch in der Literatur in kein Unterschied bezüglich der Treg-Frequenz bei Patienten mit terminaler Niereninsuffizienz im Vergleich mit gesunden Kontrollen beschrieben (Caprara et al. 2016).

#### 4.5 Infektionen und Treg

In der vorliegenden Arbeit zeigte sich kein Zusammenhang zwischen der Treg-Frequenz und dem Vorliegen einer bakteriellen oder viralen Infektion. Auch ein Zusammenhang zwischen der Treg-Frequenz und der Wahrscheinlichkeit für das Auftreten von viralen Infektionen bestand nicht. Es wurden sowohl alle (virale und bakterielle) Infektionen wie auch nur virale Infektionen allein (für Überimmunsuppression charakteristisch) ausgewertet. Es scheint somit vielmehr die immunsuppressive Therapie im Allgemeinen (Fishman 2017), als die Treg-Frequenz nur allein, verantwortlich für das Auftreten von Infektionen zu sein.

#### 4.6 Funktionsverschlechterung des Transplantats und Treg

In der gesamten Kohorte zeigte sich im Zeitraum Monat 4-6 nach Transplantation ein Zusammenhang zwischen der Treg-Frequenz und der Funktionsverschlechterung des Transplantats. Patienten mit Funktionsverschlechterung hatten eine signifikant niedrigere Treg-Frequenz. Passend hierzu ist eine Assoziation zwischen erhöhter FOXP3-Expression und guter Transplantatfunktion beschrieben (Torabijahromi et al. 2021). Im Langzeitverlauf (Monat 7-15) zeigte sich in der vorliegenden Arbeit allerdings kein signifikanter Zusammenhang mehr zwischen Treg-Frequenz und Funktionsverschlechterung.

#### 4.7 Abstoßungen und Treg

In Woche 2-4 zeigte sich ein signifikanter Unterschied bezüglich Treg-Frequenz beim Vergleich aller Patienten mit und ohne Abstoßung. Eine höhere Treg-Frequenz war mit weniger Abstoßungen verbunden. Im restlichen Beobachtungszeitraum zeigte sich kein Unterschied.

Treg spielen eine wichtige Rolle nach Nierentransplantation und können Toleranz ermöglichen und Rejektionen verhindern (Mukhin et al. 2019; Romano et al. 2017). Eine reduzierte Treg-Frequenz bei Patienten mit akuter Rejektion

ist entsprechend beschrieben (Martin-Moreno et al. 2018). Weiterhin wurde eine normale Treg-Frequenz bei stabilen transplantierten Patienten und eine reduzierte Treg-Frequenz bei chronischer Rejektion beschrieben (Louis et al. 2006). Es konnte gezeigt werden, dass eine hohe FOXP3-Expression mit einer exzellenten Transplantatfunktion im Langzeitverlauf und hohen Rate an Transplantatüberleben assoziiert ist (Torabijahromi et al. 2021). Bei akuter Rejektion wurde allerdings auch ein Anstieg von FOXP3 mRNA sowohl im Blut als auch im Urin festgestellt (Barabadi et al. 2018; Luan et al. 2021). In der Konsequenz werden Treg als potentielle prädiktive Biomarker für die Rejektion diskutiert (Herrera-Gómez et al. 2018). Die ROC-Analyse der vorliegenden Arbeit ergab, dass die Treg-Frequenz mit einer Sensitivität und Spezifität von jeweils ca. 63 % für Abstoßungen in den folgenden Monaten prädiktiv war. Die Bestimmung der prädiktiven Werte ergab einen hohen negativen prädiktiven Wert von ca. 90 %. Die vorliegende Arbeit zeigt also, dass sich der „Biomarker Treg“ besser dafür eignet, zukünftige Abstoßungen auszuschließen, als diese vorherzusehen. Abschließend muss erwähnt werden, dass die Treg-Bestimmung aus dem Transplantat oder Urin als stabiler und aussagekräftiger gilt (Shan et al. 2011). In der vorliegenden Arbeit erfolgte die Bestimmung jedoch ausschließlich aus dem peripheren Blut.

#### 4.8 Abstoßungstyp und Treg

Zusätzlich wurde ein Zusammenhang zwischen der Treg-Frequenz und den unterschiedlichen Abstoßungstypen untersucht. Hierbei wurden ABMR sowie TCMR/Borderline-Rejektionen mit Patienten ohne Abstoßung verglichen. Es zeigte sich jeweils kein signifikanter Unterschied zwischen Abstoßungstyp und Treg-Frequenz. Einschränkend ist anzumerken, dass insgesamt nur 5 TCMR detektiert wurden und somit TCMR mit Borderline-Rejektionen zusammengefasst wurden. Der Zusammenhang zwischen Treg-Frequenz und Borderline-Rejektion ist in der Literatur uneinheitlich beschrieben. Es wurde eine erhöhte Treg-Frequenz (Taflin et al. 2010) wie auch eine reduzierte Treg-Frequenz (Schaier et al. 2013) beschrieben. Die Vergleichbarkeit mit der vorliegenden Arbeit ist eingeschränkt, da in beiden Arbeiten die Treg-

Bestimmung bioptisch erfolgte. Der Zusammenhang zwischen ABMR und Treg-Frequenz ist in der Literatur unzureichend beschrieben. Bei der ABMR spielen dnDSA eine entscheidende Rolle. Passend hierzu konnte, wie oben beschrieben, in der vorliegenden Arbeit kein Zusammenhang zwischen der Treg-Frequenz und dnDSA gezeigt werden.

#### 4.9 Geschlecht und Treg

In der vorliegenden Arbeit wurden die Treg über den Demethylierungsindex der TSDR im *foxp3*-Gen (X-chromosomale Lokalisation) untersucht. Die Auswertung wurde teilweise geschlechtsspezifisch durchgeführt, da bei Frauen eines der beiden TSDR-Allele bereits methyliert vorliegt.

Die geschlechterspezifische Betrachtung ergab Unterschiede zwischen Frauen und Männern hinsichtlich der Treg-Frequenz. So zeigte sich bei identischer Erhaltungstherapie (Glukokortikoid, MPA, Tacrolimus) über den Untersuchungszeitraum bei Frauen eine signifikante Reduktion der Treg-Frequenz, bei Männern maximal ein Trend zur Reduktion. Wie bereits beschrieben, zeigte sich keine Korrelation zwischen der Dosis der Erhaltungstherapie und der Treg-Frequenz, sodass die Dauer der Immunsuppression eine Rolle zu spielen scheint. Eine initiale Reduktion der Treg-Frequenz unter immunsuppressiver Therapie mit anschließender Regeneration ist in der Literatur beschrieben (Mederacke et al. 2019; San Segundo et al. 2010). In den genannten Studien wurde die Treg-Frequenz mittels FACS bestimmt, die verwendete immunsuppressive Therapie war vergleichbar mit der vorliegenden Arbeit (Glukokortikoid, CNI, MMF). Die Kollegen zeigten jeweils eine Reduktion der Treg-Frequenz in den ersten Monaten sowie eine Regeneration zu Monat 12 hin. Darüber hinaus zeigten San Segundo und Kollegen einen signifikanten Anstieg der Treg-Frequenz im Zeitraum Monat 12-24. In der vorliegenden Arbeit zeigten sich bei Männern, vergleichbar zu den Ergebnissen der beiden genannten Arbeiten, ähnliche Treg-Frequenzen zu Beginn und zum Ende (Monat 15) der Untersuchung. Eine längere Studiendauer wäre interessant gewesen, um einen möglichen Anstieg der Treg-Frequenz beurteilen zu können. Bei Frauen zeigte sich hingegen in

der vorliegenden Arbeit eine signifikante Reduktion der Treg-Frequenz über den Untersuchungszeitraum. Treg-Messungen aus FACS- und RT-PCR-Analysen lassen sich schwierig miteinander vergleichen (Brandhorst et al. 2015). Die Vergleichbarkeit der vorliegenden Arbeit mit den genannten Studien ist also methodenbedingt eingeschränkt. Dennoch stellt sich die Frage eines möglichen geschlechterspezifischen Einflusses auf die Treg-Frequenz. Auffällig war eine generell höhere und tendenziell mehr fluktuierende Treg-Frequenz bei Frauen im Vergleich zu Männern. Geschlechterspezifische Unterschiede bezüglich der Treg sind beschrieben (Nie et al. 2015). Östrogen besitzt unterschiedliche Effekte auf verschiedene Zelltypen des Immunsystems und erhöht beispielsweise die Treg-Frequenz (Abbildung 21, siehe Appendix). Durch den weiblichen Hormonzyklus werden Treg also unterschiedlich beeinflusst. Die Treg-Frequenz ist abhängig vom Menstruationszyklus und erreicht ihren Höhepunkt in der folliculären Phase (präovulatorisch) und fällt anschließend in der lutealen Phase wieder ab. Die Treg-Frequenz in Abhängigkeit des Menstruationszyklus ist in Abbildung 22 dargestellt (siehe Appendix). Diese Unterschiede werden auch beim Vergleich prä- versus postmenopausaler Frauen oder unter der Einnahme von Hormonpräparaten deutlich (Nie et al. 2015). Postmenopausal kommt es hingegen zu einem Östrogenabfall und somit zu konstanteren, aber deutlich geringeren Treg-Frequenzen im Vergleich zu jungen, fertilen Frauen.

In der vorliegenden Arbeit war das Verhältnis prä- und postmenopausaler Frauen weitgehend ausgeglichen (25 versus 33). Zusammenfassend muss also festgehalten werden, dass die Treg-Frequenz von hormonellen Schwankungen abhängig ist und somit das Stadium des Menstruationszyklus oder das Vorliegen der Menopause relevant für die Untersuchung der Treg-Frequenz ist. Dieser geschlechterspezifische Unterschied wird in den meisten Arbeiten nicht berücksichtigt oder diskutiert und kann zu einer Verzerrung der Ergebnisse führen. Weiterhin kann er die Vergleichbarkeit verschiedener Arbeiten zusätzlich erschweren.

#### 4.10 Stärken der vorliegenden Arbeit

In der vorliegenden Arbeit lag der Fokus auf der Bestimmung der nTreg (tTreg), welche bezüglich ihrer immunsuppressiven Fähigkeit im Vergleich zu den iTreg (pTreg) als potenter und stabiler gelten. Die Messung der nTreg erfolgte mittels RT-PCR über den Demethylierungsstatus der TSDR. In anderen Arbeiten werden häufig CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>FOXP3<sup>+</sup> Zellen mittels FACS bestimmt, welche vielmehr die Gesamtheit der Treg repräsentieren. Zusätzlich ist zu beachten, dass eine FOXP3-Expression nicht nur exklusiv bei CD4<sup>+</sup>-Zellen, sondern auch bei CD8<sup>+</sup>-Zellen beschrieben ist und FOXP3 als Marker somit nicht vollständig spezifisch für Treg ist. Die Messung über den Demethylierungsstatus der TSDR gilt spezifisch für nTreg und die RT-PCR erlaubt die Quantifizierung kleinster Mengen aus Blut, Urin oder Gewebe. Diese beiden Merkmale unterstreichen die hohe analytische Sensitivität der verwendeten Methode, welche möglicherweise der etablierteren FACS überlegen ist. Darüber hinaus wären die hier vorgestellten Untersuchungen mit der Durchflusszytometrie nicht möglich gewesen, da die eingefrorenen Proben aus einer Biobank stammten und für FACS-Untersuchungen in der Regel frische Blutproben benötigt werden. Unterschiede im Ergebnis der FACS-Analyse von Treg zwischen frischen und eingefrorenen Proben konnten kürzlich Duggleby und Kollegen mit Nabelschnurblut zeigen. Bei der Messung der TSDR von FOXP3 mittels RT-PCR traten hingegen keine Unterschiede auf (Duggleby et al. 2020). Die Autoren bestätigen auch die Beobachtung dieser Arbeit, dass es nach Korrektur des Demethylierungsindex bei Proben von Frauen (mit dem Faktor 2) zu höheren Werten, als bei Männern kommt. Als Ursache wird angenommen, dass mit der Multiplikation eine Überkompensation erfolgt, da nicht von einer hundertprozentigen X-Inaktivierung in weiblichen Zellen ausgegangen werden kann. Mit der FACS-Analyse sind teilweise erhebliche Messunterschiede im Rahmen der Treg-Quantifizierung beschrieben, da die Messung nicht unerheblich von den unterschiedlich verwendeten Antikörpern, Puffern oder Einstellungen der Gates abhängig ist. Interessanterweise bestätigte sich in der aktuellen Arbeit von Duggleby und Kollegen auch die eingeschränkte Vergleichbarkeit zwischen FACS-Analyse der nTreg und der

molekularbiologischen Methode. Schon 2010 konnten Liu und Kollegen zeigen, dass ein deutlicher Zusammenhang zwischen dem DI und dem suppressiven Potential von Treg besteht, weshalb dieser analytische Ansatz als zuverlässig zum Nachweis von nTreg angesehen wird (Liu et al. 2010).

Als weitere Stärke der vorliegenden Arbeit ist die Untersuchung mehrerer klinisch relevanter Ereignisse zu betonen. Darüber hinaus ist die geschlechterspezifische Betrachtung hervorzuheben, welche immunologisch bedeutend ist und in anderen Arbeiten oft nicht berücksichtigt wird.

#### 4.11 Limitationen der vorliegenden Arbeit

Die vorliegende Arbeit weist ebenso Limitationen auf. Es wurden ausschließlich Patienten nach Nierentransplantation eingeschlossen, eine gesunde Kontrollgruppe war nicht vorhanden. Weiterhin war die untersuchte Patientenkohorte heterogen. Es wurden Patienten mit unterschiedlichen nephrologischen Grunderkrankungen, Komorbiditäten und Begleitmedikationen eingeschlossen. Diese Faktoren beeinflussen möglicherweise die Ergebnisse zusätzlich. Eine multivariate Analyse wurde nicht durchgeführt.

Die Vergleichbarkeit der Ergebnisse mit anderen Arbeiten ist methodenbedingt eingeschränkt. Wie oben bereits erwähnt, werden in anderen Arbeiten häufig  $CD4^+CD25^+FOXP3^+$  Zellen und somit vielmehr die Gesamtheit der Treg mittels FACS bestimmt. Entsprechend unterscheiden sich die Treg-Messungen zwischen den Methoden RT-PCR und FACS (Duggleby et al. 2020). Die FACS-Analyse bietet somit auch Vorteile, da diese (im Gegensatz zur verwendeten Methode in der vorliegenden Arbeit) auch iTreg erfasst. Die Rolle von iTreg ist abschließend nicht geklärt, es ist jedoch unbestritten, dass iTreg (z.B. durch synergistische Effekte mit den nTreg) eine wichtige Rolle im Rahmen der immunologischen Toleranz spielen (Curotto de Lafaille und Lafaille 2009). Vermutlich ist neben der absoluten iTreg-Anzahl auch das Verhältnis nTreg/iTreg entscheidend, eine isolierte Messung der iTreg aufgrund fehlender spezifischer Marker gestaltet sich jedoch als schwierig (Shevyrev und Tereshchenko 2020).

Weiterhin wurden in der vorliegenden Arbeit wichtige immunologische Faktoren nicht berücksichtigt. Die Balance zwischen Treg und Teff spielt eine wichtige Rolle im Rahmen der immunologischen Toleranz. Weder die absolute Treg-Anzahl, noch die absolute Teff-Anzahl oder das Verhältnis Treg/Teff wurden berücksichtigt. Ebenso wurde der Einfluss bedeutender Zytokine (z.B. TGF- $\beta$ , IL-2, IL-4 und IL-10) nicht untersucht. In der vorliegenden Arbeit erfolgte eine quantitative, jedoch keine qualitative Beurteilung der Treg. Die Treg-Aktivität kann mit Suppressions-Assays beurteilt werden. Hierbei werden Treg und CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup>-Zellen (Responder-Zellen) zusammen kultiviert und proliferativ stimuliert. Die Suppression der Responder-Zellen durch die Treg kann anschließend mittels FACS gemessen werden (Kanjana et al. 2019). Eine qualitative Beurteilung der Treg wäre im Kontext der vorliegenden Arbeit sicherlich interessant gewesen. Grundsätzlich war es allerdings nicht Ziel dieser Arbeit, Methoden zum Nachweis von Treg zu vergleichen oder die Funktion der Zellen zu untersuchen. Es sollte vielmehr geprüft werden, ob der Biomarker, der relativ einfach aus eingefrorenen Zellen zu messen ist, ein Potenzial zur Individualisierung der immunsuppressiven Therapie nach Nierentransplantation besitzt.

## **5 Zusammenfassung**

In der vorliegenden Arbeit wurden nTreg in den ersten 15 Monaten nach Nierentransplantation gemessen. Es wurde untersucht, ob ein Zusammenhang zwischen der Treg-Frequenz und Patientencharakteristika oder wichtigen klinischen Ereignissen besteht. Die Ergebnisse sind mit den Angaben aus der Literatur vergleichbar, es ist jedoch zu betonen, dass in der vorliegenden Arbeit eine andere, möglicherweise präzisere Methode verwendet wurde (Bestimmung über den Demethylierungsstatus der TSDR mittels RT-PCR). Weiterhin ist hervorzuheben, dass eine geschlechterspezifische Betrachtung erfolgte. Abschließend sind die wesentlichen Ergebnisse der Arbeit zusammengefasst:

1. Frauen hatten höhere Treg-Frequenzen als Männer.
2. Die Treg-Frequenzen waren bei Frauen deutlichen Schwankungen ausgesetzt.
3. Es gab keinen Zusammenhang zwischen Alter und Treg-Frequenz.
4. Patienten mit PRA < 15 % hatten eine höhere Treg-Frequenz. Andere immunologische Risikofaktoren (HLA-Mismatches, DSA) zeigten keinen Einfluss auf die Treg-Frequenz.
5. Unter den Induktionstherapien zeigte ATG die deutlichste Reduktion der Treg-Frequenz.
6. Die Erhaltungstherapien zeigten keinen Einfluss auf die Treg-Frequenz.
7. Es zeigte sich kein Zusammenhang zwischen dem Auftreten von Infektionen und der Treg-Frequenz.
8. Bei einer Funktionsverschlechterung des Transplantats zeigte sich im Zeitraum Monat 4-6 eine signifikante Reduktion der Treg-Frequenz.
9. Eine höhere Treg-Frequenz war mit weniger Abstoßungen verbunden.
10. Die Treg-Frequenz könnte sich als nicht invasiver Biomarker zum Rejektionsausschluss eignen.

## **6 Ausblick**

Treg spielen eine wichtige Rolle im Rahmen der immunologischen Toleranz und sind Gegenstand aktueller Forschung im Bereich der Transplantationsmedizin. Einerseits ist die Verwendung von Treg als Biomarker zur Individualisierung der immunsuppressiven Therapie denkbar. Andererseits wird der klinische Einsatz von Treg bereits in Studien untersucht.

Die immunsuppressive Therapie nach Nierentransplantation besteht in aller Regel aus einer Kombinationstherapie und ist mit relevanten Nebenwirkungen (z.B. opportunistische Infektionen, Toxizität, Neoplasie) assoziiert. Durch das TDM kann die Sicherheit der Therapie verbessert werden, insbesondere kann

Toxizität reduziert werden. Es zeigt sich jedoch auch, dass Patienten unterschiedlich auf die Therapie reagieren, sodass die Notwendigkeit einer individualisierten Therapie besteht. Biomarker könnten ergänzend zum TDM eingesetzt werden, um das individuelle Ansprechen des Immunsystems besser beurteilen zu können (Wieland und Shipkova 2014). Idealerweise könnten operational tolerante Patienten erkannt oder zumindest bei ausgewählten Patienten die Dosierung der immunsuppressiven Therapie reduziert werden. Es existieren wenige Arbeiten, die den Stellenwert von Treg als Biomarker in der Transplantationsmedizin untersucht haben. San Segundo und Kollegen konnten zeigen, dass sich Treg vor Nierentransplantation als prädiktiver Biomarker für die akute Rejektion eignen (San Segundo et al. 2014). In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass sich die Treg-Frequenz als nicht invasiver Biomarker möglicherweise dazu eignet, zukünftige Rejektionen auszuschließen. Der prädiktive Stellenwert von Treg als Biomarker vor Nierentransplantation wird prospektiv in einer im Dezember 2021 initiierten Studie (NCT: 04414111) untersucht.

Immunologische Toleranz nach Nierentransplantation könnte durch Erhöhung der Treg-Anzahl erreicht werden. Hierfür ist eine Manipulation der Treg oder eine Applikation von Treg denkbar. Beide Ansätze sind Gegenstand aktueller Forschung (Martin-Moreno et al. 2018). Durch Expansion der Treg kann die Treg-Anzahl in vivo (z.B. durch Gabe von IL-2, Immunglobulin oder Rapamycin) oder in vitro erhöht werden (Zhang et al. 2015).

In der aktuell hochrangig publizierten „The One Studie“ wurde erstmals der Einsatz verschiedener immunmodulatorischer Zellprodukte (nTreg, Tr1, tolerogene dendritische Zellen und regulatorische Makrophagen, Mreg) bei nierentransplantierten Patienten im Rahmen einer multizentrischen Phase I/II Studie untersucht (Sawitzki et al. 2020). Insgesamt wurden 38 Patienten mit Zellprodukten behandelt (im Zeitraum 7 Tage vor, bis 10 Tage nach Transplantation). 66 Patienten dienten als Referenzgruppe und wurden mit einem Standardregime, bestehend aus Basiliximab, Steroiden, MMF und Tacrolimus, behandelt. Die Raten an akuten Rejektionen (gesichert mittels

Biopsie) waren in beiden Gruppen vergleichbar, jedoch konnte unter Anwendung der Zellprodukte MMF bei 40 % der Patienten im Verlauf ausgeschlichen und auf eine Monotherapie mit Tacrolimus umgestellt werden. Weiterhin zeigten sich unter Anwendung von Zellprodukten weniger Infektionen.

In der „ONEnTreg13 Studie“ wurde der klinische Einsatz (Phase I/IIa) von nTreg bei nierentransplantierten Patienten untersucht (Roemhild et al. 2020).

Insgesamt wurden 11 Patienten mit nTreg behandelt (7 Tage nach Transplantation). Die Triple-Immunsuppression wurde schrittweise ausgeschlichen, bis zu einer niedrig dosierten Erhaltungstherapie mit Tacrolimus (Woche 48). 9 Patienten dienten als Kontrollgruppe. Die Patienten wurden über 3 Jahre beobachtet. Unter nTreg-Therapie konnte in 73 % (8/11) die immunsuppressive Therapie auf eine Monotherapie mit Tacrolimus deeskaliert werden. In der Kontrollgruppe war eine anhaltende Zwei- oder Dreifachtherapie erforderlich. In beiden Gruppen lag das Transplantatüberleben nach 3 Jahren bei 100 %, relevante Toxizität wurde nicht beobachtet. Roemhild und Kollegen konnten zeigen, dass der klinische Einsatz von nTreg sicher ist.

Abschließend kann festgehalten werden, dass der klinische Einsatz von Treg im Rahmen der Transplantationsmedizin ein vielversprechendes und spannendes Forschungsgebiet darstellt. Möglicherweise kann zukünftig immunologische Toleranz nach Nierentransplantation durch eine alleinige Treg-Therapie erreicht werden. Zumindest könnte sie wesentlich dazu beitragen, dass die Dosierungen der klassischen Immunsuppressiva reduziert und potentielle Nebenwirkungen vermieden werden können.

## 7 Literaturverzeichnis

- (1) [https://www.iqwig.de/presse/pressemitteilungen/pressemitteilungen-detailseite\\_9947.html](https://www.iqwig.de/presse/pressemitteilungen/pressemitteilungen-detailseite_9947.html) [Zugriff 27.11.2021].
- (2) <https://dso.de/SiteCollectionDocuments/DSO-Jahresbericht%202020.pdf> [Zugriff 27.11.2021].
- (3) Akimova T, Kamath BM, Goebel JW, Meyers KE, Rand EB, Hawkins AF, 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.
- (4) Alberts B, Johnson A, Lewis J, Morgan D, Raff M, Roberts K, Walter P. *Molekularbiologie der Zelle*. 2015. 6. Auflage. Wiley-VCH: 530-532.
- (5) Alberu J, Vargas-Rojas MI, Morales-Buenrostro LE, Crispin JC, Rodriguez-Romo RF, Uribe-Uribe NO, Carrasco G, Gomez-Martin D, Alcocer-Varela J. De Novo Donor-Specific HLA Antibody Development and Peripheral CD4(+)CD25(high) Cells in Kidney Transplant Recipients: A Place for Interaction? *J Transplant* 2012;2012:302539.
- (6) Ashton-Chess J, Giral MF, Souillou JP, Brouard S. Can immune monitoring help to minimize immunosuppression in kidney transplantation? *Transpl Int* 2009;22(1):110-9.
- (7) Banham AH, Powrie FM, Suri-Payer E. FOXP3+ regulatory T cells: Current controversies and future perspectives. *Eur J Immunol* 2006;36(11):2832-6.
- (8) Barabadi M, Shahbaz SK, Foroughi F, et al. High Expression of FOXP3 mRNA in Blood and Urine as a Predictive Marker in Kidney Transplantation. *Prog Transplant* 2018;28(2):134–41.

- (9) Baron U, Floess S, Wieczorek GF, Baumann KF, Grutzkau AF, Dong JF, Thiel A, Boeld TJ, Hoffmann P, Edinger M, Türbachova 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.
- (10) Becker LE, Morath C, Suesal C. Immune mechanisms of acute and chronic rejection. *Clin Biochem* 2016;49(4-5):320-3.
- (11) Beyer M, Schultze JL. Regulatory T cells in cancer. *Blood* 2006;108(3):804-11.
- (12) Bluestone JA, Abbas AK. Natural versus adaptive regulatory T cells. *Nat Rev Immunol* 2003;3(3):253-7.
- (13) Boer MC, Joosten SA, Ottenhoff TH. Regulatory T-Cells at the Interface between Human Host and Pathogens in Infectious Diseases and Vaccination. *Front Immunol* 2015;6:215.
- (14) Bonnefoy-Berard N, Vincent CF, Revillard JP. Antibodies against functional leukocyte surface molecules in polyclonal antilymphocyte and antithymocyte globulins. *Transplantation* 1991;51(3):669-73.
- (15) Brandhorst G, Petrova DT, Weigand S, Eberle C, von Ahsen N, Schmitz J, Schultze FC, Raddatz D, Karaus M, Oellerich M, Walson PD. Lack of correlation between Treg quantification assays in inflammatory bowel disease patients. *World J Gastroenterol* 2015;21(11):3325-9.
- (16) Brunkow ME, Jeffery EW, Hjerrild KA, Paepfer BF, Clark LB, Yasayko SA, Wilkinson JE, Galas D, Ziegler SF, Ramsdell F. Disruption of a new forkhead/winged-helix protein, scurfin, results in the fatal lymphoproliferative disorder of the scurfy mouse. *Nat Genet* 2001;27(1):68-73.

- (17) Budde K, Matz M, Dürr M, Glander P. Biomarkers of over-immunosuppression. *Clin Pharmacol Ther* 2011;90(2):316–22
- (18) Camirand G, Riella LV. Treg-Centric View of Immunosuppressive Drugs in Transplantation: A Balancing Act. *Am J Transplant* 2017;17(3):601–10.
- (19) Caprara CF, Kinsey GR, Corradi VF, Xin WF, Ma JZ, Scalzotto E, Martino F, Okusa MD, Nalesso F, Ferrari F, Rosner M, Ronco C. The Influence of Hemodialysis on T Regulatory Cells: A Meta-Analysis and Systematic Review. *Blood Purif* 2016;42(4):307-13.
- (20) Caridade M, Graca LF, Ribeiro RM. Mechanisms Underlying CD4+ Treg Immune Regulation in the Adult: From Experiments to Models. *Front Immunol* 2013;4:378.
- (21) Chatenoud L, Bach JF. Adaptive human regulatory T cells: myth or reality? *J Clin Invest* 2006;116(9):2325-7.
- (22) Chaudhry A, Rudra DF, Treuting PF, Samstein RM, Liang YF, Kas AF, Rudensky AY. CD4+ regulatory T cells control TH17 responses in a Stat3-dependent manner. *Science* 2009;326(5955):986-91.
- (23) Crescioli C. Chemokines and transplant outcome. *Clin Biochem* 2016;49(4-5):355-62.
- (24) Curotto de Lafaille, Maria A, Lafaille JJ. Natural and adaptive foxp3+ regulatory T cells: more of the same or a division of labor? *Immunity* 2009;30(5):626–35.
- (25) De Serres SA, Sayegh MH, Najafian N. Immunosuppressive drugs and Tregs: a critical evaluation! *Clin J Am Soc Nephrol* 2009;4(10):1661-9.

- (26) Dejean AS, Beisner DR, Ch'en IL, Kerdiles YM, Babour AF, Arden KC, Castrillon D, DePinho RA, Hedrick SM. Transcription factor Foxo3 controls the magnitude of T cell immune responses by modulating the function of dendritic cells. *Nat Immunol* 2009;10(5):504-13.
- (27) Demirkiran A, Hendrikx TK, Baan CC, van der Laan LJ. Impact of immunosuppressive drugs on CD4+CD25+FOXP3+ regulatory T cells: does in vitro evidence translate to the clinical setting? *Transplantation* 2008;85(6):783-9.
- (28) Duggleby RC, Tsang HP, Strange K, et al. Enumerating regulatory T cells in cryopreserved umbilical cord blood samples using FOXP3 methylation specific quantitative PCR. *PLoS One* 2020;15(10):e0240190.
- (29) Fishman JA. Infection in Organ Transplantation. *Am J Transplant* 2017;17(4):856-79.
- (30) Fontenot JD, Gavin MA, Rudensky AY. Foxp3 programs the development and function of CD4+CD25+ regulatory T cells. *Nat Immunol* 2003;4(4):330-6.
- (31) Foster BJ, Dahhou MF, Zhang XF, Platt RW, Hanley JA. Change in mortality risk over time in young kidney transplant recipients. *Am J Transplant* 2011;11(11):2432-42.
- (32) Fourtounas C, Dousdampanis PF, Sakellaraki PF, Rodi MF, Georgakopoulos TF, Vlachojannis JG, Mouzaki A. Different immunosuppressive combinations on T-cell regulation in renal transplant recipients. *Am J Nephrol* 2010;32(1):1-9.
- (33) Furukawa A, Wisel SA, Tang Q. Impact of Immune-Modulatory Drugs on Regulatory T Cell. *Transplantation* 2016;100(11):2288-300.

- (34) Gavin MA, Torgerson TR, Houston E, DeRoos PF, Ho WY, Stray-Pedersen AF, Ocheltree EL, Greenberg PD, Ochs HD, Rudensky AY. Single-cell analysis of normal and FOXP3-mutant human T cells: FOXP3 expression without regulatory T cell development. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2006;103(17):6659-64.
- (35) Germain RN. T-cell development and the CD4-CD8 lineage decision. *Nat Rev Immunol* 2002;2(5):309-22.
- (36) Gershon RK, Kondo K. Cell interactions in the induction of tolerance: the role of thymic lymphocytes. *Immunology* 1970;18(5):723-37.
- (37) Getnet D, Grosso JF, Goldberg MV, Harris TJ, Yen HR, Bruno TC, Durham N, Hipkiss EL, Pyle KJ, Wada S, Pan F, Pardoll DM, Drake CG. A role for the transcription factor Helios in human CD4(+)CD25(+) regulatory T cells. *Mol Immunol* 2010;47(7-8):1595-600.
- (38) Gregori S, Casorati MF, Amuchastegui S, Smioldo S, Davalli AM, Adorini L. Regulatory T cells induced by 1 alpha,25-dihydroxyvitamin D3 and mycophenolate mofetil treatment mediate transplantation tolerance. *J Immunol* 2001;167(4):1945-53.
- (39) Halloran PF. Immunosuppressive drugs for kidney transplantation. *N Engl J Med* 2004;351(26):2715-29.
- (40) Hartigan-O'Connor DJ, Poon CF, Sinclair E, McCune JM. Human CD4+ regulatory T cells express lower levels of the IL-7 receptor alpha chain (CD127), allowing consistent identification and sorting of live cells. *J Immunol Methods* 2007;319(1-2):41-52.
- (41) Herrera-Gómez F, Del Aguila W, Tejero-Pedregosa A, et al. The number of FoxP3 regulatory T cells in the circulation may be a predictive biomarker for kidney transplant recipients: A multistage systematic review. *Int Immunopharmacol* 2018;65:483–92.

- (42) Himmel ME, MacDonald KG, Garcia RV, Steiner TS, Levings MK. Helios+ and Helios- cells coexist within the natural FOXP3+ T regulatory cell subset in humans. *J Immunol* 2013;190(5):2001–8.
- (43) Hori S, Nomura TF, Sakaguchi S. Control of regulatory T cell development by the transcription factor Foxp3. *Science* 2003;299(5609):1057-61.
- (44) Hou P-F, Zhu L-J, Chen X-Y, Qiu Z-Q. Age-related changes in CD4+CD25+FOXP3+ regulatory T cells and their relationship with lung cancer. *PLoS One* 2017;12(3):e0173048
- (45) Huehn J, Hoffmüller U, Olek S. Analyse regulatorischer T-Zellen anhand der FOXP3-DNA-Methylierung. *Laborwelt* 2008: 9-14.
- (46) Ixtlapale-Carmona X, Arvizu A, De-Santiago A, Gonzalez-Tableros N, Lopez M, Castelan N, Marino LA, Uribe-Urbe NO, Contreras AG, Vilatobá M, Morales-Buenrostro LE, Alberú J. Graft immunologic events in deceased donor kidney transplant recipients with preformed HLA-donor specific antibodies. *Transpl Immunol* 2018;46:8-13.
- (47) Jagger A, Shimojima YF, Goronzy JJ, Weyand CM. Regulatory T cells and the immune aging process: a mini-review. *Gerontology* 2014;60(2):130-7.
- (48) Kaczmarek A, Vandenabeele PF, Krysko DV. Necroptosis: the release of damage-associated molecular patterns and its physiological relevance. *Immunity* 2013;38(2):209-23
- (49) Kahan BD, Keown PF, Levy GA, Johnston A. Therapeutic drug monitoring of immunosuppressant drugs in clinical practice. *Clin Ther* 2002;24(3):330-50.

- (50) Kamikozuru K, Fukunaga K, Hirota S, et al. The expression profile of functional regulatory T cells, CD4+CD25high+/forkhead box protein P3+, in patients with ulcerative colitis during active and quiescent disease. *Clin Exp Immunol* 2009;156(2):320–7.
- (51) Kanjana K, Paisooksantivatana K, Matangkasombut P, Chevairakul P, Lumjiaktase P. Efficient short-term expansion of human peripheral blood regulatory T cells for co-culture suppression assay. *J Immunoassay Immunochem* 2019;40(6):573–89.
- (52) Kasiske BL, Andany MA, Hernandez DF, Silkensen JF, Rabb HF, McClean JF, Roel JP, Danielson B. Comparing methods for monitoring serum creatinine to predict late renal allograft failure. *Am J Kidney Dis* 2001;38(5):1065-73.
- (53) Kirste G. Abstoßungsprophylaxe nach Organtransplantation 2003. 17-19. UniMed-Verlag AG, Bremen.
- (54) Koizumi K, Hoshiai M, Moriguchi T, et al. Plasma Exchange Downregulates Activated Monocytes and Restores Regulatory T Cells in Kawasaki Disease. *Ther Apher Dial* 2019;23(1):92–8.
- (55) Kuypers DR, Vanrenterghem YF. Monoclonal antibodies in renal transplantation: old and new. *Nephrol Dial Transplant* 2004;19(2):297-300.
- (56) Lal G, Bromberg JS. Epigenetic mechanisms of regulation of Foxp3 expression. *Blood* 2009;114(18):3727-35.
- (57) Levitsky J, Miller J, Huang X, Gallon L, Leventhal JR, Mathew JM. Immunoregulatory Effects of Everolimus on In Vitro Alloimmune Responses. *PLoS One* 2016;11(6):e0156535.
- (58) Lim DG, Joe IY, Park YH, Chang SH, Wee YM, Han DJ, Kim SC. Effect of immunosuppressants on the expansion and function of naturally occurring regulatory T cells. *Transpl Immunol* 2007;18(2):94-100.

- (59) Linterman MA, Pierson WF, Lee SK, Kallies AF, Kawamoto S, Rayner TF, Srivastava M, Divekar DP, Beaton L, Hogan JJ, Fagarasan S, Liston A, Smith KG, Vinuesa CG. Foxp3+ follicular regulatory T cells control the germinal center response. *Nat Med* 2011;17(8):975-82.
- (60) Liu J, Lluís A, Illi S, et al. T regulatory cells in cord blood--FOXP3 demethylation as reliable quantitative marker. *PLoS One* 2010;5(10):e13267.
- (61) Liu W, Putnam AL, Xu-Yu ZF, Szot GL, Lee MR, Zhu S, Gottlieb P, Kapranov P, Gingeras TR, de St Groth BF, Clayberger C, Soper DM, Ziegler SF, Bluestone JA. CD127 expression inversely correlates with FoxP3 and suppressive function of human CD4+ T reg cells. *J Exp Med* 2006;203(7):1701-11.
- (62) Locke JE, Zachary AA, Warren DS, Segev DL, Houp JA, Montgomery RA, Leffell MS. Proinflammatory events are associated with significant increases in breadth and strength of HLA-specific antibody. *Am J Transplant* 2009;9(9):2136-9.
- (63) Lopez-Hoyos M, Segundo DS, Fernandez-Fresnedo GF, Marin MJ, Gonzalez-Martin VF, Arias M. Regulatory T cells in renal transplantation and modulation by immunosuppression. *Transplantation* 2009;88(Suppl 3):S31-S39.
- (64) Louis S, Braudeau CF, Giral MF, Dupont AF, Moizant FF, Robillard NF, Moreau A, Souillou JP, Brouard S. Contrasting CD25hiCD4+T cells/FOXP3 patterns in chronic rejection and operational drug-free tolerance. *Transplantation* 2006;81(3):398-407.
- (65) Luan D, Dadhania DM, Ding R, et al. FOXP3 mRNA Profile Prognostic of Acute T Cell-mediated Rejection and Human Kidney Allograft Survival. *Transplantation* 2021;105(8):1825–39.

- (66) Malek TR, Bayer AL. Tolerance, not immunity, crucially depends on IL-2. *Nat Rev Immunol* 2004;4(9):665-74.
- (67) Martinez-Llordella M, Puig-Pey IF, Orlando GF, Ramoni MF, Tisone GF, Rimola AF, Lerut J, Latinne D, Margarit C, Bilbao I, Brouard S, Hernandez-Fuentes M, Soullillou JP, Sanchez-Fueyo A. Multiparameter immune profiling of operational tolerance in liver transplantation. *Am J Transplant* 2007;7(2):309-19.
- (68) Martin-Moreno PL, Tripathi S, Chandraker A. Regulatory T Cells and Kidney Transplantation. *Clin J Am Soc Nephrol* 2018;13(11):1760–4.
- (69) Mathew J, H.-Voss J, LeFever A, Konieczna I, Stratton C, He J, Huang X, Gallon L, Skaro A, Ansari MJ, Leventhal JR. A Phase I Clinical Trial with Ex Vivo Expanded Recipient Regulatory T cells in Living Donor Kidney Transplants. *Sci Rep* 2018;8(1):7428.
- (70) McCaughan JA, McKnight AJ, Courtney AE, Maxwell AP. Epigenetics: time to translate into transplantation. *Transplantation* 2012;94(1):1-7.
- (71) Mederacke YS, Vondran FW, Kollrich S, Schulde E, Schmitt R, Manns MP, Klempnauer J, Schwitzer R, Noyan F, Jaeckel E. Transient increase of activated regulatory T cells early after kidney transplantation. *Sci Rep* 2019;9(1):1021.
- (72) Meier-Kriesche HU, Magee JC, Kaplan B. Trials and tribulations of steroid withdrawal after kidney transplantation. *Am J Transplant* 2008;8(2):265-6.
- (73) Merrill JP, Murray JE, Harrison JH, Guild WR. Successful homotransplantation of the human kidney between identical twins. *J Am Med Assoc* 1956;160(4):277-82.

- (74) Metzker M, Shipkova M, von Ahsen N, Andag R, Abe M, Canzler O, Klett C, Leicht S, Olbricht C, Wieland E. Analytical evaluation of a real-time PCR-based DNA demethylation assay to assess the frequency of naturally occurring regulatory T cells in peripheral blood. *Clin Biochem* 2016;49(15):1173-80.
- (75) Millan O, Brunet M. Cytokine-based immune monitoring. *Clin Biochem* 2016;49(4-5):338-46.
- (76) Mohan S, Palanisamy AF, Tsapepas DF, Tanriover BF, Crew RJ, Dube G, Ratner LE, Cohen DJ, Radhakrishnan J. Donor-specific antibodies adversely affect kidney allograft outcomes. *J Am Soc Nephrol* 2012;23(12):2061-71.
- (77) Morath C, Schäfer S, Süsal C. Nierentransplantation: Immunologische Barrieren überwinden. *Dtsch Arztebl* 2013;110(9):384-385.
- (78) Morgan ME, van Bilsen JH, Bakker AM, Heemskerk BF, Schilham MW, Hartgers FC, Elferink B, van der Zanden L, de Vries RR, Huizinga TW, Ottenhoff TH, Toes RE. Expression of FOXP3 mRNA is not confined to CD4+CD25+ T regulatory cells in humans. *Hum Immunol* 2005;66(1):13-20.
- (79) Mosmann TR, Coffman RL. TH1 and TH2 cells: different patterns of lymphokine secretion lead to different functional properties. *Annu Rev Immunol* 1989;7:145-73.
- (80) Mukhin VE, Polyakova YV, Kaabak MM, Babenko NN, Bryzgalina EV, V'yunkova YN. Control and prevention of kidney transplant rejection: the role and possibilities for the clinical use of regulatory T-cells in transplantation. *Khirurgiia (Mosk)* 2019;(9):80–5.

- (81) Mutis T, van Rijn RS, Simonetti ER, Aarts-Riemens TF, Emmelot ME, van Bloois LF, Martens A, Verdonck LF, Ebeling SB. Human regulatory T cells control xenogeneic graft-versus-host disease induced by autologous T cells in RAG2<sup>-/-</sup>-gammac<sup>-/-</sup> immunodeficient mice. *Clin Cancer Res* 2006;12(18):5520-5.
- (82) Nankivell BJ, Borrows RJ, Fung CL, O'Connell PJ, Allen RD, Chapman JR. The natural history of chronic allograft nephropathy. *N Engl J Med* 2003;349(24):2326-33.
- (83) Newell KA, Asare AF, Kirk AD, Gisler TD, Bourcier KF, Suthanthiran MF, Burlingham WJ, Marks WH, Sanz I, Lechler RI, Hernandez-Fuentes MP, Turka LA, Seyfert-Margolis VL. Identification of a B cell signature associated with renal transplant tolerance in humans. *J Clin Invest* 2010;120(6):1836-47.
- (84) Nie J, Li YY, Zheng SG, Tsun A, Li B. FOXP3(+) Treg Cells and Gender Bias in Autoimmune Diseases. *Front Immunol* 2015;6:493.
- (85) Oertelt-Prigione S. Immunology and the menstrual cycle. *Autoimmun Rev* 2012;11(6-7):486-92.
- (86) Oniscu GC, Brown HF, Forsythe JL. Impact of cadaveric renal transplantation on survival in patients listed for transplantation. *J Am Soc Nephrol* 2005;16(6):1859-65.
- (87) Piccirillo CA, Thornton AM. Cornerstone of peripheral tolerance: naturally occurring CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> regulatory T cells. *Trends Immunol* 2004;25(7):374-80.
- (88) Roemhild A, Otto NM, Moll G, et al. Regulatory T cells for minimising immune suppression in kidney transplantation: phase I/IIa clinical trial. *BMJ* 2020;371:m3734.

- (89) Romano M, Tung SL, Smyth LA, Lombardi G. Treg therapy in transplantation: a general overview. *Transpl Int* 2017;30(8):745-53.
- (90) Sakaguchi S, Fukuma KF, Kuribayashi KF, Masuda T. Organ-specific autoimmune diseases induced in mice by elimination of T cell subset. I. Evidence for the active participation of T cells in natural self-tolerance; deficit of a T cell subset as a possible cause of autoimmune disease. *J Exp Med* 1985;61(1):72-87.
- (91) Sakaguchi S, Sakaguchi NF, Asano MF, Itoh MF, Toda M. Pillars article: 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. *J Immunol* 2011;186(7):3808-21.
- (92) 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.
- (93) Salama AD, Remuzzi GF, Harmon WE, Sayegh MH. Challenges to achieving clinical transplantation tolerance. *J Clin Invest* 2001;108(7):943-8.
- (94) San Segundo D, Fernandez-Fresnedo GF, Ruiz JC, Rodrigo E, Benito MJ, Arias MF, Lopez-Hoyos M. Two-year follow-up of a prospective study of circulating regulatory T cells in renal transplant patients. *Clin Transplant* 2010;24(3):386-93.
- (95) San Segundo D, Millan OF, Munoz-Cacho PF, Boix FF, Paz-Artal E, Talayero PF, Morales JM, Muro M, Angeles M, Cos D, Guirado L, Llorente S, Pascual J, Arias M, Brunet M, Lopez-Hoyos M. High proportion of pretransplantation activated regulatory T cells (CD4+CD25<sup>high</sup>CD62L+CD45RO<sup>+</sup>) predicts acute rejection in kidney transplantation: results of a multicenter study. *Transplantation* 2014;98(11):1213-8.

- (96) Sarwal MM. Fingerprints of transplant tolerance suggest opportunities for immunosuppression minimization. *Clin Biochem* 2016;49(4-5):404-10.
- (97) Sawitzki B, Harden PN, Reinke P, Moreau A, Hutchinson JA, Game DS, Tang Q, Guinan EC, Battaglia M, Burlingham WJ, Roberts IS, Streitz M, Josien R, Böger CA, Scotta C, Markmann JF, Hester JL, Juerchot K, Braudeau C, James B, Contreras-Ruiz L, van der Net JB, Bergler T, Caldara R, Petchey W, Edinger M, Dupas N, Kapinsky M, Mutzbauer I, Otto NM, Öllinger R, Hernandez-Fuentes MP, Issa F, Ahrens N, Meyenberg C, Karitzky S, Kunzendorf U, Knechtle SJ, Grinyo J, Morris PJ, Brent L, Bushell A, Turka LA, Bluestone JA, Lechler RI, Schlitt HJ, Cuturi MC; Schlickeiser S, Friend PJ, Miloud T, Scheffold A, Secchi A, Crisalli K, Kang SM, Hilton R, Banas B, Blancho G, Volk HD, Lombardi G, Wood KJ, Geissler EK. Regulatory cell therapy in kidney transplantation (The ONE Study): a harmonised design and analysis of seven non-randomised, single-arm, phase 1/2A trials. *Lancet* 2020 May 23;395(10237):1627-39.
- (98) Schaier M, Seissler N, Becker LE, et al. The extent of HLA-DR expression on HLA-DR(+) Tregs allows the identification of patients with clinically relevant borderline rejection. *Transpl Int* 2013;26(3):290-9.
- (99) Schlickeiser S, Sawitzki B. Peripheral biomarkers for individualizing immunosuppression in transplantation--regulatory T cells. *Clin Chim Acta* 2012;413(17-18):1406-13.
- (100) Schliesser U, Streitz MF, Sawitzki B. Tregs: application for solid-organ transplantation. *Curr Opin Organ Transplant* 2012;17(1):34-41.
- (101) Segoloni GP, Quaglia M. New immunosuppressive drugs for prevention and treatment of rejection in renal transplant. *J Nephrol* 2006;19(5):578-86.

- (102) Shan J, Guo YF, Luo LF, Lu JF, Li CF, Zhang CF, Huang Y, Feng L, Wu W, Long D, Li S, Li Y. Do CD4+ Foxp3+ Treg cells correlate with transplant outcomes: a systematic review on recipients of solid organ transplantation. *Cell Immunol* 2011;270(1):5-12.
- (103) Shevach EM. CD4+ CD25+ suppressor T cells: more questions than answers. *Nat Rev Immunol* 2002;2(6):389-400.
- (104) Shevryev D, Tereshchenko V. Treg Heterogeneity, Function, and Homeostasis. *Front Immunol* 2020;10:3100.
- (105) Shipkova M, Wieland E. Editorial: Immune monitoring in solid organ transplantation. *Clin Biochem* 2016;49(4-5):317-9.
- (106) Sienko J, Kotowski M, Dziewanowski K, Wojciuk B, Paczkowska E, Kedzierska K, Tejchman K, Stasiuk R, Zair L, Ostrowski M, Machalinski B. Correlation Between Percentage of Immunocompetent CD4(+) and CD4(+)CD25(+) Cells and Compatibility in the HLA System and Selected Parameters Assessing Transplanted Kidney Function. *Transplant Proc* 2018;50(6):1738-43.
- (107) Sijpkens YW, Doxiadis II, van Kemenade FJ, Zwinderman AH, de Fijter JW, Claas FH, Bruijn JA, Paul LC. Chronic rejection with or without transplant vasculopathy. *Clin Transplant* 2003;17(3):163-70.
- (108) Singh K, Hjort M, Thorvaldson L, Sandler S. Concomitant analysis of Helios and Neuropilin-1 as a marker to detect thymic derived regulatory T cells in naïve mice. *Sci Rep* 2015; 5:7767.
- (109) Stolp J, Turka LA, Wood KJ. B cells with immune-regulating function in transplantation. *Nat Rev Nephrol* 2014;10(7):389-97.
- (110) Taflin C, Nochy DF, Hill GF, Frouget TF, Rioux NF, Verine JF, Bruneval P, Glotz D. Regulatory T cells in kidney allograft infiltrates correlate with initial inflammation and graft function. *Transplantation* 2010;89(2):194-9.

- (111) Takahashi T, Kuniyasu YF, Toda MF, Sakaguchi NF, Itoh MF, Iwata MF, Shimizu J, Sakaguchi S. Immunologic self-tolerance maintained by CD25+CD4+ naturally anergic and suppressive T cells: induction of autoimmune disease by breaking their anergic/suppressive state. *Int Immunol* 1998;10(12):1969-80.
- (112) Takano T, Kotaki R, Park J, et al. Age-Dependent Decrease in the Induction of Regulatory T Cells Is Associated With Decreased Expression of RALDH2 in Mesenteric Lymph Node Dendritic Cells. *Front Immunol* 2020;11:1555.
- (113) Taylor AL, Watson CJ, Bradley JA. Immunosuppressive agents in solid organ transplantation: Mechanisms of action and therapeutic efficacy. *Crit Rev Oncol Hematol* 2005;56(1):23-46.
- (114) Teh HS, Kisielow PF, Scott BF, Kishi HF, Uematsu YF, Bluthmann HF, von Boehmer H. Thymic major histocompatibility complex antigens and the alpha beta T-cell receptor determine the CD4/CD8 phenotype of T cells. *Nature* 1988;335(6187):229-33.
- (115) Thornton AM, Shevach EM. Helios: still behind the clouds. *Immunology* 2019;158(3):161–70.
- (116) Topal C, Koksoy S, Suleymanlar GF, Yakuboglu GF, Fevzi EF. Peripheral Treg count and its determinants in unsensitized and sensitized chronic kidney disease patients. *Int Urol Nephrol* 2013;45(6):1647-52.
- (117) Torabijahromi M, Roozbeh J, Raeesjalali G, et al. Comparison of FOXP3 and Interleukin 35 Expression Profiles in Kidney Transplant Recipients With Excellent Long-Term Graft Function and Acute Rejection. *Exp Clin Transplant* 2021;19(11):1142–8.

- (118) Torgerson TR, Ochs HD. Immune dysregulation, polyendocrinopathy, enteropathy, X-linked: forkhead box protein 3 mutations and lack of regulatory T cells. *J Allergy Clin Immunol* 2007;120(4):744-50.
- (119) Valencia X, Lipsky PE. CD4+CD25+FoxP3+ regulatory T cells in autoimmune diseases. *Nat Clin Pract Rheumatol* 2007;3(11):619-29.
- (120) van Besouw NM, Zuijderwijk JM, Vaessen LM, Balk AH, Maat AP, van der Meide PH, Weimar W. The direct and indirect allogeneic presentation pathway during acute rejection after human cardiac transplantation. *Clin Exp Immunol* 2005;141(3):534-40.
- (121) van Rood JJ, van Leeuwen A, Eernisse JG. The identification of transplantation antigens in leukocytes. *Ned Tijdschr Geneesk* 1969;113(52):2346-59.
- (122) Velthuis JH, Mol WM, Weimar WF, Baan CC. CD4+CD25bright+ regulatory T cells can mediate donor nonreactivity in long-term immunosuppressed kidney allograft patients. *Am J Transplant* 2006;6(12):2955-64.
- (123) Waldmann H, Adams E, Fairchild PF, Cobbold S. Infectious tolerance and the long-term acceptance of transplanted tissue. *Immunol Rev* 2006;212:301-13.
- (124) Walsh PT, Taylor DK, Turka LA. Tregs and transplantation tolerance. *J Clin Invest* 2004;114(10):1398–403.
- (125) Wang J, Ioan-Facsinay AF, van der Voort EI, Huizinga TW, Toes RE. Transient expression of FOXP3 in human activated nonregulatory CD4+ T cells. *Eur J Immunol* 2007;37(1):129-38.
- (126) Webster AC, Nagler EV, Morton RL, Masson P. Chronic Kidney Disease. *Lancet* 2017;389(10075):1238-52.

- (127) Wieckiewicz J, Goto RF, Wood KJ. T regulatory cells and the control of alloimmunity: from characterisation to clinical application. *Curr Opin Immunol* 2010;22(5):662-8.
- (128) Wieczorek G, Asemissen AF, Model FF, Turbachova IF, Floess S, Liebenberg VF, Baron U, Stauch D, Kotsch K, Pratschke J, Hamann A, Loddenkemper C, Stein H, Volk HD, Hoffmüller U, Grützkau 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.
- (129) Wieland E, Olbricht CJ, Susal CF, Gurrachaa PF, Bohler TF, Israeli MF, Sommerer C, Budde K, Hartmann B, Shipkova M, Oellerich M. Biomarkers as a tool for management of immunosuppression in transplant patients. *Ther Drug Monit* 2010;32(5):560-72.
- (130) Wieland E, Shipkova M. Lymphocyte surface molecules as immune activation biomarkers. *Clin Biochem* 2016;49(4-5):347-54.
- (131) Wieland, E. and Shipkova, M. Biomarker im Blut zur Individualisierung der immunsuppressiven Therapie nach der Transplantation solider Organe. *LaboratoriumsMedizin* 2014;38(6):333-343.
- (132) Zhang R. Donor-Specific Antibodies in Kidney Transplant Recipients. *Clin J Am Soc Nephrol* 2018;13(1):182–92.
- (133) Zhang H, Xiao YF, Zhu ZF, Li BF, Greene MI. Immune regulation by histone deacetylases: a focus on the alteration of FOXP3 activity. *Immunol Cell Biol* 2012;90(1):95-100.
- (134) Zhang D, Tu E, Kasagi S, Zanvit P, Chen Q, Chen W. Manipulating regulatory T cells: a promising strategy to treat autoimmunity. *Immunotherapy* 2015;7(11):1201–11.

- (135) Zheng Y, Rudensky AY. Foxp3 in control of the regulatory T cell lineage. *Nat Immunol* 2007;8(5):457-62.
- (136) Ziegler SF. FOXP3: of mice and men. *Annu Rev Immunol* 2006;24:209-26.
- (137) Zorn E, Nelson EA, Mohseni MF, Porcheray FF, Kim HF, Litsa DF, Bellucci R, Raderschall E, Canning C, Soiffer RJ, Frank DA, Ritz J. IL-2 regulates FOXP3 expression in human CD4+CD25+ regulatory T cells through a STAT-dependent mechanism and induces the expansion of these cells in vivo. *Blood* 2006;108(5):1571-9.
- (138) Zwar TD, van Driel IR, Gleeson PA. Guarding the immune system: suppression of autoimmunity by CD4+CD25+ immunoregulatory T cells. *Immunol Cell Biol* 2006;84(6):487-501.

## 8 Abbildungsverzeichnis und Tabellenverzeichnis

### 8.1 Abbildungen

Abbildung 1: Natürliche und induzierte Treg (modifiziert nach Huehn et al. 2008), Kapitel 1.5.4

Abbildung 2: Aufbau FOXP3 mit seinen Bindungsdomänen (modifiziert nach Ziegler 2006), Kapitel 1.5.7

Abbildung 3: Effekte der Treg (modifiziert nach Caridade et al. 2013), Kapitel 1.5.10

Abbildung 4: Prinzip der Real-Time-PCR mit Taq-Man-Sonden (mit freundlicher Genehmigung, inspiriert und modifiziert von: <https://www.medizinische-genetik.de>), Kapitel 2.2

Abbildung 5: Treg-Frequenzen der Männer (Demethylierungsindex in %, Median, 25., 75. Perzentile) über den Beobachtungszeitraum von 15 Monaten nach Transplantation, Kapitel 3.1

Abbildung 6: Treg-Frequenzen der Frauen (Demethylierungsindex in %, Median, 25., 75. Perzentile) über den Beobachtungszeitraum von 15 Monaten nach Transplantation, Kapitel 3.2

Abbildung 7: Vergleich der Treg-Frequenzen (Demethylierungsindex in %, Median, 25., 75. Perzentile) bei Männern und Frauen mittels Mann-Whitney-Analyse über den Beobachtungszeitraum von 15 Monaten nach Transplantation, Kapitel 3.2.1

Abbildung 8: Wahrscheinlichkeit im Beobachtungszeitraum (15 Monate) keine Abstoßung zu erleiden, in Abhängigkeit der Treg-Frequenz in der 1. Woche. Um Frauen und Männer als Gesamtkollektiv auswerten zu können, wurde die Treg-Frequenz bei beiden Geschlechtern in Perzentilen transformiert und dann in Quartile aufgeteilt, Kapitel 3.4

Abbildung 9: Wahrscheinlichkeit im Beobachtungszeitraum (15 Monate) keine Abstoßung zu erleiden, in Abhängigkeit der Treg-Frequenz in Woche 2-4. Um Frauen und Männer als Gesamtkollektiv auswerten zu können, wurde die Treg-Frequenz bei beiden Geschlechtern in Perzentilen transformiert und dann in Quartile aufgeteilt, Kapitel 3.4

Abbildung 10: Wahrscheinlichkeit im Beobachtungszeitraum (15 Monate) keine Abstoßung zu erleiden, in Abhängigkeit der Treg-Frequenz in der 1. Woche nach Transplantation. Vergleich der Daten oberhalb und unterhalb des Medians. Um Frauen und Männer als Gesamtkollektiv auswerten zu können, wurde die Treg-Frequenz bei beiden Geschlechtern in Perzentilen transformiert, Kapitel 3.4

Abbildung 11: Wahrscheinlichkeit im Beobachtungszeitraum (15 Monate) keine Abstoßung zu erleiden, in Abhängigkeit der Treg-Frequenz in Woche 2-4 nach Transplantation. Vergleich der Daten oberhalb und unterhalb des Medians. Um Frauen und Männer als Gesamtkollektiv auswerten zu können, wurde die Treg-Frequenz bei beiden Geschlechtern in Perzentilen transformiert, Kapitel 3.4

Abbildung 12: Unterschied der Treg-Frequenzen bei Patienten mit antikörpervermittelter Abstoßung (ABMR) versus keine Rejektion in Woche 2-4 (Box-Whisker-Blot, Minimum, Median, 25. und 75. Perzentile, Maximum). Für die gemeinsame Auswertung der Daten bei Frauen und Männern wurden die Daten vor der Auswertung in Perzentilen transformiert, Kapitel 3.5

Abbildung 13: Unterschied der Treg-Frequenzen bei Patienten mit (TCMR) und ohne T-zellvermittelter Abstoßung in Woche 2-4 (Box-Whisker-Blot, Minimum, Median, 25. und 75. Perzentile, Maximum; Borderline-Rejektionen inkludiert). Für die gemeinsame Auswertung der Daten bei Frauen und Männern wurden die Daten vor der Auswertung in Perzentilen transformiert, Kapitel 3.5

Abbildung 14: Receiver-Operating-Characteristics (ROC)-Kurve: Perzentile der Treg-Frequenz im Gesamtkollektiv zum Zeitpunkt Woche 2-4 und Abstoßungen im und nach dem 1. Monat., Kapitel 3.5.1

Abbildung 15: Vergleich der Treg-Frequenzen bei Patienten mit (n=63) und ohne (n=89) Funktionsverschlechterung im Zeitraum Monat 4-6 nach Transplantation (Box-Whisker-Blot, Median, 25. und 75. Perzentile). Für die gemeinsame Auswertung der Daten bei Frauen und Männern wurden die Daten vor der Auswertung in Perzentilen transformiert, Kapitel 3.6

Abbildung 16: Wahrscheinlichkeit im Beobachtungszeitraum keine Funktionsverschlechterung (Delta-Kreatinin) zu erleiden, in Abhängigkeit der Treg-Frequenz. Um Frauen und Männer als Gesamtkollektiv auswerten zu können, wurde die Treg-Frequenz bei beiden Geschlechtern in Perzentilen transformiert, Kapitel 3.6

Abbildung 17: Wahrscheinlichkeit im Beobachtungszeitraum keine Funktionsverschlechterung (Delta-Kreatinin) zu erleiden, in Abhängigkeit der Treg-Frequenz. Vergleich der Daten oberhalb und unterhalb des Medians. Um Frauen und Männer als Gesamtkollektiv auswerten zu können, wurde die Treg-Frequenz bei beiden Geschlechtern in Perzentilen transformiert, Kapitel 3.6

Abbildung 18: Wahrscheinlichkeit im Beobachtungszeitraum (15 Monate) keine virale Infektion zu erleiden, in Abhängigkeit von der Treg-Frequenz. Um Frauen und Männer als Gesamtkollektiv auswerten zu können, wurde die Treg-Frequenz bei beiden Geschlechtern in Perzentilen transformiert, Kapitel 3.8

Abbildung 19: Vergleich der Treg-Frequenzen in der 1. Woche in Abhängigkeit von der Induktionstherapie (Median, 25., 75. Perzentile). Um Frauen und Männer als Gesamtkollektiv auswerten zu können, wurde die Treg-Frequenz bei beiden Geschlechtern in Perzentilen transformiert, Kapitel 3.9.1

Abbildung 20: Vergleich der Treg-Frequenzen in Woche 2-4 in Abhängigkeit von der Induktionstherapie (Median, 25., 75. Perzentile). Um Frauen und Männer als Gesamtkollektiv auswerten zu können, wurde die Treg-Frequenz bei beiden Geschlechtern in Perzentilen transformiert, Kapitel 3.9.1

Abbildung 21: Effekt von Östrogen auf einzelne Zelltypen (modifiziert nach Fish: The X-files in immunity: sex-based differences predispose immune responses. Nat Rev Immunol. 2008 Sep;8(9):737-44), Kapitel 4.9

Abbildung 22: Treg-Frequenz während der folliculären Phase und Lutealphase (modifiziert nach Oertelt-Prigione 2012), Kapitel 4.9

## 8.2 Tabellen

Tabelle 1: Banff-Klassifikation (histologische Klassifikation der Rejektion), Kapitel 10

Tabelle 2: Standardisierte Therapie mit Tacrolimus, Kapitel 2.1.7

Tabelle 3: Standardisierte Therapie mit Prednisolon, Kapitel 2.1.7

Tabelle 4: Standardisierte Therapie mit ECMP/5-ASA, Kapitel 2.1.7

Tabelle 5: Chemikalien für RT-PCR-basierte Methode, Kapitel 2.2

Tabelle 6: Primer und Sonden der Firma Eurofins MWG operon, Kapitel 2.2

Tabelle 7: Standards der Firma GenExpress GmbH, Kapitel 2.2

Tabelle 8: Geräte für die RT-PCR-basierte Methode, Kapitel 2.2

Tabelle 9: verwendete Analyseprogramme, Kapitel 2.2

Tabelle 10: Komponenten des methylierten Ansatzes (gelöst in 6 µl Wasser, steril), Kapitel 2.2.3.3

Tabelle 11: Komponenten des demethylierten Ansatzes (gelöst in 6 µl Wasser, steril), Kapitel 2.2.3.3

Tabelle 12: Treg-Frequenzen bei Männern über den Beobachtungszeitraum, Kapitel 10

Tabelle 13: Treg-Frequenzen bei Frauen über den Beobachtungszeitraum, Kapitel 10

Tabelle 14: Vergleich Treg-Frequenzen Männer vs. Frauen (Mann-Whitney-Analyse), Kapitel 10

Tabelle 15/A: Vergleich Treg-Frequenzen bei Männern mit und ohne Panel Reactive Antibodies (PRA) > 15 % (Mann-Whitney-Analyse), Kapitel 10

Tabelle 15/B: Vergleich Treg-Frequenzen bei Frauen mit und ohne Panel Reactive Antibodies (PRA) > 15 % (Mann-Whitney-Analyse), Kapitel 10

Tabelle 16: Vergleich Treg-Frequenzen mit und ohne dnDSA bei A) Männer; B) Frauen; C) Männer & Frauen (Mann-Whitney-Analyse). dnDSA = de novo donospezifische Antikörper, Kapitel 10

Tabelle 17/A: Vergleich der Treg-Frequenzen bei Männern mit und ohne hohes HLA-Mismatches  $\geq 3$  (Mann-Whitney-Analyse), Kapitel 10

Tabelle 17/B: Vergleich der Treg-Frequenzen bei Frauen mit und ohne hohes HLA-Mismatches  $\geq 3$  (Mann-Whitney-Analyse), Kapitel 10

Tabelle 18: Treg-Frequenzen und Korrelation zum Alter bei A) Männern B) Frauen, Kapitel 10

Tabelle 19/A: Vergleich Treg-Frequenzen bei AB0-inkompatibel und AB0-kompatibel transplantierten Männern (Mann-Whitney-Analyse), Kapitel 10

Tabelle 19/B: Vergleich Treg-Frequenzen bei AB0-inkompatibel und AB0-kompatibel transplantierten Frauen (Mann-Whitney-Analyse), Kapitel 10

Tabelle 20: Vergleich Treg-Frequenzen bei präemptiv und nicht präemptiv transplantierten A) Frauen und B) Männern (Mann-Whitney-Analyse), Kapitel 10

Tabelle 21: Vergleich der Treg-Frequenzen bei allen Patienten (Frauen und Männer) mit und ohne Abstoßung (Mann-Whitney-Analyse). Zur Vergleichbarkeit wurden die Daten normalisiert und in Perzentile transformiert, Kapitel 10

Tabelle 22: Vergleich der Treg-Frequenzen bei Patienten mit und ohne antikörper-vermittelte Abstoßung (ABMR) Woche 2-4 nach Transplantation (Mann-Whitney-Analyse verglichen), Kapitel 10

Tabelle 23: Vergleich der Treg-Frequenzen bei Patienten mit und ohne T-zell-vermittelte Abstoßung (TCMR & Borderline) Woche 2-4 nach Transplantation (Mann-Whitney-Analyse), Kapitel 10

Tabelle 24: Vergleich der Treg-Frequenzen bei allen Patienten (Frauen und Männer) mit und ohne Funktionsverschlechterung (FVS) (Mann-Whitney-Analyse). Zur Vergleichbarkeit wurden die Daten normalisiert und in Perzentile transformiert, Kapitel 10

Tabelle 25: Vergleich Treg-Frequenzen bei Patienten mit und ohne Infektion (viral und bakteriell), Mann-Whitney-Analyse. Zur Vergleichbarkeit wurden die Daten normalisiert und in Perzentile transformiert, Kapitel 10

Tabelle 26: Vergleich Treg-Frequenzen bei Patienten mit und ohne virale Infektion (Mann-Whitney-Analyse). Zur Vergleichbarkeit wurden die Daten normalisiert und in Perzentile transformiert, Kapitel 10

Tabelle 27/A: Treg-Frequenzen bei unterschiedlichen Induktionstherapien bei Männern (Mann-Whitney-Analyse), Kapitel 10

Tabelle 27/B: Treg-Frequenzen bei unterschiedlichen Induktionstherapien bei Frauen (Mann-Whitney-Analyse), Kapitel 10

Tabelle 27/C: Treg-Frequenzen bei unterschiedlichen Induktionstherapien bei Männern und Frauen (Mann-Whitney-Analyse). Zur Vergleichbarkeit wurden die Daten normalisiert und in Perzentile transformiert, Kapitel 10

Tabelle 28: Effekte der immunsuppressiven Therapie auf die Treg-Frequenz (Korrelation Treg-Frequenz/Perzentile und Steroiddosis mg/Tag), Kapitel 10

Tabelle 29: Effekte der immunsuppressiven Therapie auf die Treg-Frequenz (Korrelation Treg-Frequenz/Perzentile und Tacrolimus-Talspiegel ng/ml), Kapitel 10

Tabelle 30: Effekte der immunsuppressiven Therapie auf die Treg-Frequenz (Korrelation Treg-Frequenz/Perzentile und Mycophenolsäure-Talspiegel g/l), Kapitel 10

Tabelle 31: Effekte von Immunsuppressiva auf Treg, Kapitel 10

## 9 Abkürzungen

|            |  |
|------------|--|
| AB0i       | AB0-inkompatibel                                 |
| AB0k       | AB0-kompatibel                                   |
| ABMR       | Antibody-mediated Rejection                      |
| APC        | antigenpräsentierende Zellen                     |
| ATG        | Antithymozyten Globulin                          |
| AUC        | area under the curve                             |
| BKV        | Humanes Polyomavirus 1, BK-Polyomavirus          |
| Breg       | regulatorische B-Zellen                          |
| cAMP       | cyclisches Adenosinmonophosphat                  |
| CMV        | Zytomegalievirus                                 |
| CNI        | Calcineurininhibitor                             |
| CsA        | Ciclosporin A                                    |
| C-Terminus | Carboxy-Terminus                                 |
| CTLA       | zytotoxisches T-Lymphozyten assoziiertes Protein |
| DC         | dendritische Zellen                              |
| DI         | Demethylierungsindex                             |
| dnDSA      | de novo Donorspezifische Antikörper              |

|       |  |
|-------|--|
| DNA   | aus dem Englischen:<br>Desoxyribonukleinsäure (DNS)          |
| DSA   | donorspezifische Antikörper                                  |
| DSO   | Deutsche Stiftung<br>Organtransplantation                    |
| EBV   | Epstein-Barr-Virus   |
| ECMPS | enteric coated mycophenolate<br>sodium                       |
| FACS  | fluorescence-activated cell<br>sorting, Durchflusszytometrie |
| FKH   | forkhead   |
| FOXP3 | Forkhead-Box-Protein P3                                      |
| FSC   | forward scatter,<br>Vorwärtsstreulicht                       |
| hATG  | horse Antithymozyten Globulin                                |
| HLA   | Humane Leukozyten-Antigene                                   |
| HBV   | Hepatitis-B-Virus  |
| HIV   | humanes Immundefizienz-Virus                                 |
| HSV   | Herpes-Simplex-Virus   |
| IDO   | Indolamin-2,3-Desoxygenase                                   |
| IL    | Interleukin  |
| IMPDH | Inosinmonophosphat-<br>Dehydrogenase                         |
| iTreg | induzierte Treg  |

|            |  |
|------------|--|
| KDIGO      | Kidney disease: Improving global outcomes  |
| LR         | Likelihood-Ratio   |
| MAC        | Membrane-Attack-Complex  |
| MHC        | Major Histocompatibility Complex   |
| MMF        | Mycophenolatmofetil  |
| MPA        | Mycophenolat   |
| mTORi      | mTOR-Inhibitoren   |
| mTreg      | Memory like Treg   |
| NCT        | National Clinical Trial<br>( <a href="https://clinicaltrials.gov">https://clinicaltrials.gov</a> ) |
| NFAT       | Nuclear factor of activated T-cells  |
| N-Terminus | Amino-Terminus   |
| nTreg      | natürliche Treg  |
| PBMC       | peripheral blood mononuclear cell  |
| PCP        | Pneumocystis-jirovecii-Pneumonie   |
| PCR        | Polymerase Kettenreaktion  |
| pTreg      | periphere Treg   |
| PRA        | Präformierte Antikörper  |

|             |   |
|-------------|---|
| PVpos       | positive prädiktive Wert                  |
| PVneg       | negativer prädiktive Wert                 |
| rATG        | rabbit Antithymozyten Globulin            |
| RNA         | Ribonucleic acid                          |
| ROC         | Receiver-Operating-Characteristics        |
| RT          | Reverse-Transkriptase                     |
| RT-PCR      | Real-Time-PCR                             |
| SSC         | sidewards scatter,<br>Seitwärtsstreulicht |
| TCMR        | T-cell-mediated rejection                 |
| TDM         | Therapeutisches Drug Monitoring           |
| Teff        | Effektor-T-Zellen                         |
| TGF $\beta$ | Transforming Growth factor beta           |
| TNF         | Tumor-Nekrosefaktor                       |
| tTreg       | thymus-derived Treg                       |
| Treg        | T-regulatorische Zellen                   |
| TSDR        | Treg-Specific-Demethylated-Region         |
| TZR         | T-Zell-Rezeptor                           |
| vs          | versus                                    |
| VZV         | Varizella-Zoster-Virus                    |

## 10 Appendix

Tabelle 1: Banff-Klassifikation (histologische Klassifikation der Rejektion).

| Klasse | Typ  |  |  |
|--------|--|--|--|
| 1      | Keine signifikanten Veränderungen          |  |  |
| 2      | Antikörper vermittelt                      | Zirkuläre C4d-Positivität der peritubulären Kapillaren   | 1: ATN (akute Tubulonekrose) -ähnlich mit minimaler Entzündung<br>2: Kapillaritis, Glomerulitis mit/ohne Thromben  |
| 3      | Borderline                                 | V.a. T-Zell-vermittelte Rejektion ohne Arteriitis bei fokaler Tubulitis, mit minimaler interstitieller Infiltration oder interstitieller Infiltration mit geringer Tubulitis |  |
| 4      | T-Zell-vermittelte Rejektion               | Typ 1  | A interstitielle Infiltration, milde Tubulitis<br>B interstitielle Infiltration, schwere Tubulitis   |
|        | T-Zell-vermittelte Rejektion               | Typ 2  | A milde bis moderate Intima-Arteriitis<br>B schwere Arteriitis<br>C transmurale Arteriitis mit/ohne fibrinoiden, nekrotischen Veränderungen und lymphozytären Infiltrationen |
| 5      | Interstitielle Fibrose und Tubulusatrophie |  |  |
| 6      | Nicht rejektionsbedingte Veränderungen     |  |  |

Tabelle 12: Treg-Frequenzen bei Männern über den Beobachtungszeitraum

| Zeitfenster | n  | Median DI (%) | 95 % KI DI | p Wilcoxon-Test             |
|-------------|----|---------------|------------|-----------------------------|
| Woche 1     | 83 | 1,30          | 1,10-1,50  | p > 0,05 vs. alle Zeiträume |
| Woche 2-4   | 77 | 1,30          | 1,20-1,56  | p > 0,05 vs. alle Zeiträume |
| Monat 2-3   | 83 | 1,30          | 1,10-1,50  | p > 0,05 vs. alle Zeiträume |
| Monat 4-6   | 70 | 1,40          | 1,13-1,70  | p > 0,05 vs. alle Zeiträume |
| Monat 7-15  | 86 | 1,20          | 1,02-1,30  | p > 0,05 vs. alle Zeiträume |

Tabelle 13: Treg-Frequenzen bei Frauen über den Beobachtungszeitraum

| Zeitfenster | n  | Median DI (%) | 95 % KI   | p Wilcoxon-Test   |
|-------------|----|---------------|-----------|---|
| Woche 1     | 50 | 2,30          | 1,82-2,90 | <b>p &lt; 0,05</b> vs. Monat 7-15<br>p > 0,05 vs. restliche Zeiträume               |
| Woche 2-4   | 41 | 2,10          | 1,20-3,85 | p > 0,05 vs. alle Zeiträume   |
| Monat 2-3   | 47 | 2,60          | 2,03-2,87 | <b>p &lt; 0,05</b> vs. Monat 7-15<br>p > 0,05 vs. restliche Zeiträume               |
| Monat 4-6   | 50 | 2,28          | 1,56-2,80 | p > 0,05 vs. alle Zeiträume   |
| Monat 7-15  | 51 | 1,80          | 1,60-2,40 | <b>p &lt; 0,05</b> vs. Woche 1 und<br>Monat 2-3<br>p > 0,05 vs. restliche Zeiträume |

Tabelle 14: Vergleich Treg-Frequenzen Männer vs. Frauen (Mann-Whitney-Analyse)

| Zeitfenster | Männer |               | Frauen |               | p                |
|-------------|--------|---------------|--------|---------------|------------------|
|             | n      | Median DI (%) | n      | Median DI (%) |                  |
| Woche 1     | 83     | 1,30          | 50     | 2,30          | <b>&lt; 0,05</b> |
| Woche 2-4   | 77     | 1,30          | 41     | 2,10          | = 0,05           |
| Monat 2-3   | 83     | 1,30          | 47     | 2,60          | <b>&lt; 0,05</b> |
| Monat 4-6   | 70     | 1,40          | 50     | 2,28          | <b>&lt; 0,05</b> |
| Monat 7-15  | 86     | 1,20          | 51     | 1,80          | <b>&lt; 0,05</b> |

Tabelle 15/A: Vergleich Treg-Frequenzen bei Männern mit und ohne Panel Reactive Antibodies (PRA) > 15 % (Mann-Whitney-Analyse)

| Zeitfenster | PRA <15 % |               |           | PRA >15 % |               |                | p             |
|-------------|-----------|---------------|-----------|-----------|---------------|----------------|---------------|
|             | n         | Median DI (%) | 95% KI    | n         | Median DI (%) | 95 % KI        |               |
| Woche 1     | 74        | 1,35          | 1,11-1,78 | 9         | 0,50          | 0,21-1,07      | < <b>0,05</b> |
| Woche 2-4   | 67        | 1,40          | 1,20-1,70 | 9         | 0,80          | 0,31-1,49      | <b>0,03</b>   |
| Monat 2-3   | 72        | 1,33          | 1,20-1,60 | 10        | 1,05          | 0,35-1,36      | 0,07          |
| Monat 4-6   | 65        | 1,45          | 1,20-1,79 | 4         | 1,10          | zu wenig Fälle | -             |
| Monat 7-15  | 76        | 1,25          | 1,10-1,60 | 9         | 0,80          | 0,34-1,27      | <b>0,01</b>   |

Tabelle 15/B: Vergleich Treg-Frequenzen bei Frauen mit und ohne Panel Reactive Antibodies (PRA) > 15 % (Mann-Whitney-Analyse)

| Zeitfenster | PRA <15 % |               |           | PRA >15 % |               |                | p           |
|-------------|-----------|---------------|-----------|-----------|---------------|----------------|-------------|
|             | n         | Median DI (%) | 95 % KI   | n         | Median DI (%) | 95 % KI        |             |
| Woche 1     | 39        | 2,60          | 2,01-3,6  | 8         | 1,90          | 0,68-2,49      | <b>0,03</b> |
| Woche 2-4   | 36        | 1,90          | 1,10-2,68 | 5         | 3,00          | zu wenig Fälle | -           |
| Monat 2-3   | 38        | 2,65          | 2,05-2,85 | 8         | 2,15          | 1,50-8,66      | 0,93        |
| Monat 4-6   | 39        | 2,30          | 1,44-3,02 | 9         | 2,25          | 1,34-2,87      | 0,88        |
| Monat 7-15  | 42        | 1,85          | 1,60-2,48 | 8         | 1,60          | 0,80-3,85      | 0,76        |

Tabelle 16: Vergleich Treg-Frequenzen mit und ohne dnDSA bei A) Männern; B) Frauen; C) Männer & Frauen (Mann-Whitney-Analyse). dnDSA = de novo donorspezifische Antikörper

A) Vergleich der Treg-Frequenzen bei Männern mit und ohne dnDSA

| Zeitfenster | dnDSA |               |                | keine dn DSA |               |                | p    |
|-------------|-------|---------------|----------------|--------------|---------------|----------------|------|
|             | n     | Median DI (%) | 95 % KI (DI %) | n            | Median DI (%) | 95 % KI (DI %) |      |
| Woche 1     | 4     | 2,40          | zu wenig Fälle | 67           | 1,20          | 1,00-1,40      | 0,17 |
| Woche 2-4   | 5     | 0,70          | zu wenig Fälle | 63           | 1,40          | 1,21-1,70      | 0,35 |
| Monat 2-3   | 4     | 1,15          | zu wenig Fälle | 67           | 1,35          | 1,10-1,60      | 0,61 |
| Monat 4-6   | 6     | 2,75          | 0,84-4,99      | 58           | 1,35          | 1,07-1,70      | 0,09 |
| Monat 7-15  | 5     | 1,05          | zu wenig Fälle | 72           | 1,20          | 1,01-1,56      | 0,61 |

B) Vergleich der Treg-Frequenzen bei Frauen mit und ohne dnDSA

| Zeitfenster | dnDSA |               |                | keine dnDSA |               |                | p    |
|-------------|-------|---------------|----------------|-------------|---------------|----------------|------|
|             | n     | Median DI (%) | 95 % KI        | n           | Median DI (%) | 95 % KI        |      |
| Woche 1     | 1     | 3,00          | zu wenig Fälle | 40          | 2,20          | zu wenig Fälle | -    |
| Woche 2-4   | 1     | 0,90          | zu wenig Fälle | 34          | 2,15          | zu wenig Fälle | -    |
| Monat 2-3   | 1     | 1,90          | zu wenig Fälle | 39          | 2,70          | zu wenig Fälle | -    |
| Monat 4-6   | 2     | 1,88          | zu wenig Fälle | 40          | 2,10          | 1,35-2,87      | 0,81 |
| Monat 7-15  | 2     | 1,00          | zu wenig Fälle | 40          | 1,80          | 1,43-2,47      | 0,13 |

C) Vergleich der Treg-Frequenzen im Gesamtkollektiv bei Patienten (Frauen und Männer) mit und ohne dnDSA. Zur Normalisierung und Vergleichbarkeit wurden die Daten in Perzentile transformiert.

| Zeitfenster | dnDSA |                     |                | keine dnDSA |                     |             | p    |
|-------------|-------|---------------------|----------------|-------------|---------------------|-------------|------|
|             | n     | Median Treg (Perz.) | 95 % KI        | n           | Median Treg (Perz.) | 95 % KI     |      |
| Woche 1     | 5     | 82,38               | zu wenig Fälle | 107         | 49,16               | 41,37-56,89 | 0,16 |
| Woche 2-4   | 6     | 16,03               | 4,63-93,39     | 97          | 54,38               | 47,38-65,94 | 0,21 |
| Monat 2-3   | 5     | 43,31               | zu wenig Fälle | 105         | 58,38               | 47,38-63,88 | 0,42 |
| Monat 4-6   | 8     | 70,38               | 29,76-94,62    | 98          | 54,38               | 43,31-63,88 | 0,20 |
| Monat 7-15  | 7     | 32,01               | 8,03-71,54     | 113         | 43,31               | 38,77-55,30 | 0,24 |

Tabelle 17/A: Vergleich der Treg-Frequenzen bei Männern mit und ohne hohem HLA-Mismatches  $\geq 3$  (Mann-Whitney-Analyse).

| Zeitfenster | HLA-Mismatches $\geq 3$ |               |           | HLA-Mismatches $< 3$ |               |           | p    |
|-------------|-------------------------|---------------|-----------|----------------------|---------------|-----------|------|
|             | n                       | Median DI (%) | 95 % KI   | n                    | Median DI (%) | 95 % KI   |      |
| Woche 1     | 38                      | 1,35          | 1,10-1,75 | 45                   | 1,20          | 1,00-1,80 | 0,57 |
| Woche 2-4   | 33                      | 1,40          | 1,20-1,96 | 44                   | 1,30          | 1,10-1,60 | 0,47 |
| Monat 2-3   | 34                      | 1,30          | 1,10-1,52 | 49                   | 1,30          | 1,02-1,70 | 0,72 |
| Monat 4-6   | 30                      | 1,70          | 1,12-2,70 | 40                   | 1,20          | 1,10-1,63 | 0,22 |
| Monat 7-15  | 34                      | 1,10          | 0,94-1,70 | 52                   | 1,20          | 1,02-1,40 | 0,79 |

Tabelle 17/B: Vergleich der Treg-Frequenzen bei Frauen mit und ohne hohem HLA-Mismatches  $\geq 3$  (Mann-Whitney-Analyse).

| Zeitfenster | HLA-Mismatches $\geq 3$ |               |           | n  | HLA-Mismatches $< 3$ |           | p    |
|-------------|-------------------------|---------------|-----------|----|----------------------|-----------|------|
|             | n                       | Median DI (%) | 95 % KI   |    | Median DI (%)        | 95 % KI   |      |
| Woche 1     | 19                      | 2,20          | 1,48-3,44 | 30 | 2,40                 | 1,45-3,41 | 0,76 |
| Woche 2-4   | 16                      | 2,05          | 1,10-2,75 | 25 | 2,10                 | 1,15-3,09 | 0,98 |
| Monat 2-3   | 19                      | 2,79          | 1,83-3,42 | 27 | 2,40                 | 1,90-2,80 | 0,81 |
| Monat 4-6   | 21                      | 2,00          | 1,28-2,83 | 28 | 2,35                 | 1,53-3,09 | 0,38 |
| Monat 7-15  | 21                      | 1,80          | 1,46-2,60 | 29 | 1,80                 | 1,40-2,56 | 0,83 |

Tabelle 18: Treg-Frequenzen und Korrelation zum Alter bei A) Männern B) Frauen.  
r = Spearman-Korrelationskoeffizient.

A) Männer

| Zeitfenster | Anzahl (n) | r     | p    |
|-------------|------------|-------|------|
| Woche 1     | 83         | 0,20  | 0,06 |
| Woche 2-4   | 77         | 0,10  | 0,38 |
| Monat 2-3   | 83         | -0,02 | 0,87 |
| Monat 4-6   | 70         | -0,13 | 0,28 |
| Monat 7-15  | 86         | 0,07  | 0,54 |

B) Frauen

| Zeitfenster | Anzahl (n) | r     | p    |
|-------------|------------|-------|------|
| Woche 1     | 50         | 0,04  | 0,76 |
| Woche 2-4   | 41         | 0,05  | 0,77 |
| Monat 2-3   | 47         | 0,07  | 0,65 |
| Monat 4-6   | 50         | -0,26 | 0,07 |
| Monat 7-15  | 51         | 0,11  | 0,46 |

Tabelle 19/A: Vergleich Treg-Frequenzen bei AB0-inkompatibel und AB0-kompatibel transplantierten Männern (Mann-Whitney-Analyse).

| Zeitfenster | AB0i |               |                | AB0k |               |           | p           |
|-------------|------|---------------|----------------|------|---------------|-----------|-------------|
|             | n    | Median DI (%) | 95 % KI        | n    | Median DI (%) | 95 % KI   |             |
| Woche 1     | 6    | 0,85          | 0,26-1,46      | 77   | 1,30          | 1,10-1,71 | 0,06        |
| Woche 2-4   | 4    | 2,25          | zu wenig Fälle | 73   | 1,30          | 1,15-1,43 | <b>0,02</b> |
| Monat 2-3   | 4    | 1,40          | zu wenig Fälle | 79   | 1,30          | 1,10-1,50 | 0,82        |
| Monat 4-6   | 5    | 2,00          | zu wenig Fälle | 65   | 1,40          | 1,10-1,64 | 0,52        |
| Monat 7-15  | 5    | 1,40          | zu wenig Fälle | 81   | 1,10          | 1,00-1,30 | 0,26        |

Tabelle 19/B: Vergleich Treg-Frequenzen bei AB0-inkompatibel und AB0-kompatibel transplantierten Frauen (Mann-Whitney-Analyse).

| Zeitfenster | AB0i |               |           | AB0k |               |           | p    |
|-------------|------|---------------|-----------|------|---------------|-----------|------|
|             | n    | Median DI (%) | 95 % KI   | n    | Median DI (%) | 95 % KI   |      |
| Woche 1     | 14   | 2,10          | 1,05-3,42 | 36   | 2,30          | 1,92-3,38 | 0,26 |
| Woche 2-4   | 12   | 2,20          | 1,17-3,41 | 29   | 1,80          | 1,10-3,02 | 0,74 |
| Monat 2-3   | 13   | 2,10          | 1,51-3,44 | 34   | 2,65          | 2,00-2,96 | 0,49 |
| Monat 4-6   | 14   | 2,40          | 1,56-2,90 | 36   | 2,20          | 1,30-2,98 | 0,75 |
| Monat 7-15  | 13   | 2,50          | 1,40-3,18 | 38   | 1,80          | 1,60-2,10 | 0,51 |

Tabelle 20: Vergleich Treg-Frequenzen bei präemptiv und nicht präemptiv transplantierten A) Frauen und B) Männern (Mann-Whitney-Analyse).

A) Frauen

| Zeitfenster | Präemptiv |               |           | Nicht Präemptiv |               |                | p    |
|-------------|-----------|---------------|-----------|-----------------|---------------|----------------|------|
|             | n         | Median DI (%) | 95 % KI   | n               | Median DI (%) | 95 % KI        |      |
| Woche 1     | 41        | 2,40          | 1,85-3,12 | 7               | 2,50          | 1,45-5,52      | 0,64 |
| Woche 2-4   | 37        | 1,90          | 1,20-2,48 | 4               | 3,75          | Zu wenig Fälle | 0,07 |
| Monat 2-3   | 39        | 2,60          | 1,90-2,80 | 7               | 2,20          | 1,44-5,32      | 0,63 |
| Monat 4-6   | 42        | 2,23          | 1,52-2,88 | 7               | 1,90          | 0,75-4,45      | 0,52 |
| Monat 7-15  | 44        | 1,90          | 1,60-2,55 | 6               | 1,60          | 1,08-2,46      | 0,43 |

B) Männer

| Zeitfenster | Präemptiv |               |           | Nicht Präemptiv |               |             | p    |
|-------------|-----------|---------------|-----------|-----------------|---------------|-------------|------|
|             | n         | Median DI (%) | 95 % KI   | n               | Median DI (%) | 95 % KI     |      |
| Woche 1     | 75        | 1,30          | 1,10-1,55 | 8               | 1,25          | 0,44-3,51   | 0,95 |
| Woche 2-4   | 71        | 1,30          | 1,89-1,52 | 6               | 1,60          | 0,34-4,18   | 0,92 |
| Monat 2-3   | 74        | 1,30          | 1,10-1,49 | 9               | 1,50          | 0,914-2,46- | 0,74 |
| Monat 4-6   | 62        | 1,40          | 1,10-1,70 | 8               | 1,60          | 0,70-3,32   | 0,70 |
| Monat 7-15  | 78        | 1,10          | 1,00-1,30 | 8               | 1,75          | 0,95-2,12   | 0,29 |

Tabelle 21: Vergleich der Treg-Frequenzen bei allen Patienten (Frauen und Männer) mit und ohne Abstoßung (Mann-Whitney-Analyse). Zur Vergleichbarkeit wurden die Daten normalisiert und in Perzentile transformiert.

| Zeitfenster | Abstoßung |                     |                | keine Abstoßung |                     |             | p    |
|-------------|-----------|---------------------|----------------|-----------------|---------------------|-------------|------|
|             | n         | Median Treg (Perz.) | 95 % KI        | n               | Median Treg (Perz.) | 95 % KI     |      |
| Woche 1     | 15        | 61,13               | 43,81-81,19    | 118             | 54,38               | 41,88-59,08 | 0,45 |
| Woche 2-4   | 25        | 32,01               | 13,88-60,79    | 93              | 54,38               | 47,38-67,25 | 0,07 |
| Monat 2-3   | 4         | 54,63               | zu wenig Fälle | 125             | 54,38               | 47,38-61,68 | 0,80 |
| Monat 4-6   | 22        | 38,83               | 25,20-70,32    | 97              | 58,79               | 47,38-66,13 | 0,20 |
| Monat 7-15  | 15        | 28,24               | 20,13-56,06    | 122             | 46,6                | 39,54-54,38 | 0,09 |

Tabelle 22: Vergleich der Treg-Frequenzen bei Patienten mit und ohne antikörper-vermittelte Abstoßung (ABMR) Woche 2-4 nach Transplantation (Mann-Whitney-Analyse).

| ABMR (n) | ABMR (Median) | ABMR 95 % KI | keine Abstoßung (n) | keine Abstoßung (median) | keine Abstoßung 95 % KI | p    |
|----------|---------------|--------------|---------------------|--------------------------|-------------------------|------|
| 14       | 44,6          | 17,7-74,0    | 75                  | 58,4                     | 51,0-68,6               | 0,37 |

Tabelle 23: Vergleich der Treg-Frequenzen bei Patienten mit und ohne T-zell-vermittelte Abstoßung (TCMR) & Borderline-Abstoßungen in Woche 2-4 nach Transplantation (Mann-Whitney-Analyse).

| Borderline & TCMR (n) | Borderline & TCMR (median) | Borderline & TCMR 95 % KI | keine Abstoßung | keine Abstoßung (median) | keine Abstoßung 95 % KI | p    |
|-----------------------|----------------------------|---------------------------|-----------------|--------------------------|-------------------------|------|
| 28                    | 38,6                       | 19,4-68,6                 | 75              | 54,4                     | 48,3-67,4               | 0,07 |

Tabelle 24: Vergleich der Treg-Frequenzen bei allen Patienten (Frauen und Männer) mit und ohne Funktionsverschlechterung (FVS) (Mann-Whitney-Analyse). Zur Vergleichbarkeit wurden die Daten normalisiert und in Perzentile transformiert.

|            | keine FVS |                     |               | FVS |                     |               | p           |
|------------|-----------|---------------------|---------------|-----|---------------------|---------------|-------------|
|            | n         | Median Treg (Perz.) | 95 % KI       | n   | Median Treg (Perz.) | 95 % KI       |             |
| Woche 2-4  | 75        | 54,38               | 42,88 - 59,87 | 43  | 52,51               | 40,97 - 71,24 | 0,43        |
| Monat 2-3  | 62        | 59,76               | 43,04 - 67,38 | 66  | 53,45               | 46,71 - 62,63 | 0,79        |
| Monat 4-6  | 69        | 61,13               | 51,93 - 72,96 | 50  | 41,88               | 25,38 - 60,86 | <b>0,01</b> |
| Monat 7-15 | 94        | 47,38               | 37,50 - 58,38 | 43  | 39,54               | 29,28 - 54,38 | 0,31        |

Tabelle 25: Vergleich der Treg-Frequenzen bei Patienten mit und ohne Infektion (viral und bakteriell), Mann-Whitney-Analyse. Zur Vergleichbarkeit wurden die Daten normalisiert und in Perzentile transformiert.

|            | Infektion |                    |               | keine Infektion |                     |               | p    |
|------------|-----------|--------------------|---------------|-----------------|---------------------|---------------|------|
|            | n         | MedianTreg (Perz.) | 95 % KI       | n               | Median Treg (Perz.) | 95 % KI       |      |
| Monat 2-3  | 14        | 48,13              | 27,54 - 64,22 | 115             | 54,38               | 47,38 - 63,84 | 0,22 |
| Monat 4-6  | 30        | 54,61              | 30,01 - 71,07 | 89              | 58,38               | 43,31 - 67,21 | 0,78 |
| Monat 7-15 | 17        | 47,38              | 34,89- 77,82  | 120             | 42,60               | 35,58 - 54,38 | 0,32 |

Tabelle 26: Vergleich der Treg-Frequenzen bei Patienten mit und ohne virale Infektion (Mann-Whitney-Analyse). Zur Vergleichbarkeit wurden die Daten normalisiert und in Perzentile transformiert.

|            | Virale Infekte |                     |               | keine Infekte |                     |                 | p    |
|------------|----------------|---------------------|---------------|---------------|---------------------|-----------------|------|
|            | n              | Median Treg (Perz.) | 95 % KI       | n             | Median Treg (Perz.) | 95 % KI         |      |
| Woche 2-4  | 27             | 42,38               | 25,36 - 78,97 | 90            | 54,08               | 47,38 - 60,60   | 0,99 |
| Monat 2-3  | 52             | 61,13               | 45,21 - 67,16 | 77            | 49,16               | 44,3823 - 61,49 | 0,55 |
| Monat 4-6  | 47             | 47,38               | 29,13 - 70,08 | 72            | 58,84               | 47,38 - 67,16   | 0,23 |
| Monat 7-15 | 39             | 39,54               | 31,79 - 54,71 | 98            | 47,38               | 38,87 - 56,70   | 0,50 |

Tabelle 27/A: Treg-Frequenzen bei unterschiedlichen Induktionstherapien bei Männern (Mann-Whitney-Analyse).

| Zeitfenster | a) Basiliximab |               |           | b) Ritixumab + Basiliximab |               |                | C) ATG |               |           | p   |
|-------------|----------------|---------------|-----------|----------------------------|---------------|----------------|--------|---------------|-----------|---|
|             | n              | Median DI (%) | 95 % KI   | n                          | Median DI (%) | 95 % KI        | n      | Median DI (%) | 95 % KI   |   |
| Woche 1     | 65             | 1,50          | 1,30-1,90 | 6                          | 0,85          | 0,26-1,46      | 12     | 0,65          | 0,33-0,98 | <b>0,02 a) vs. b) &lt;0,01 a) vs. c)</b>                |
| Woche 2-4   | 61             | 1,30          | 1,20-1,66 | 4                          | 2,25          | zu wenig Fälle | 11     | 0,60          | 0,32-1,47 | <b>0,03 a) vs. b) &lt;0,01 a) vs. c) 0,01 b) vs. c)</b> |
| Monat 2-3   | 66             | 1,33          | 1,10-1,70 | 4                          | 1,40          | zu wenig Fälle | 13     | 1,10          | 0,66-1,35 | > 0,05  |
| Monat 4-6   | 57             | 1,45          | 1,20-1,87 | 5                          | 2,00          | zu wenig Fälle | 7      | 0,80          | 0,68-2,32 | > 0,05  |
| Monat 7-15  | 70             | 1,20          | 1,00-1,50 | 5                          | 1,40          | zu wenig Fälle | 11     | 1,05          | 0,63-1,44 | > 0,05  |

Tabelle 27/B: Treg-Frequenzen bei unterschiedlichen Induktionstherapien bei Frauen (Mann-Whitney-Analyse).

| Zeitfenster | a) Basiliximab |               |           | b) Ritixumab + Basiliximab |               |           | c) ATG |               |                | p  |
|-------------|----------------|---------------|-----------|----------------------------|---------------|-----------|--------|---------------|----------------|--|
|             | n              | Median DI (%) | 95 % KI   | n                          | Median DI (%) | 95 % KI   | n      | Median DI (%) | 95 % KI        |  |
| Woche 1     | 30             | 2,60          | 2,02      | 13                         | 1,70          | 0,91-3,13 | 6      | 2,15          | 0,74-2,80      | > 0,05   |
| Woche 2-4   | 25             | 1,80          | 1,11-2,97 | 11                         | 2,20          | 1,03-3,62 | 5      | 3,00          | zu wenig Fälle | > 0,05   |
| Monat 2-3   | 28             | 2,20          | 1,90-2,80 | 12                         | 2,10          | 1,43-3,55 | 6      | 4,15          | 2,50-18,95     | <b>0,01 a) vs. c)</b><br><b>0,03 b) vs. c)</b> |
| Monat 4-6   | 30             | 2,05          | 2,12-3,15 | 14                         | 2,40          | 1,56-2,90 | 5      | 2,90          | zu wenig Fälle | -  |
| Monat 7-15  | 32             | 1,95          | 1,60-2,50 | 12                         | 2,05          | 1,40-3,33 | 6      | 1,50          | 0,80-3,33      | > 0,05   |

Tabelle 27/C: Treg-Frequenzen bei unterschiedlichen Induktionstherapien bei Männern und Frauen (Mann-Whitney-Analyse). Zur Vergleichbarkeit wurden die Daten normalisiert und in Perzentile transformiert.

| Zeitfenster | a) Basiliximab |                |             | b) Ritixumab + Basiliximab |                |             | c) ATG |                |             | p  |
|-------------|----------------|----------------|-------------|----------------------------|----------------|-------------|--------|----------------|-------------|--|
|             | n              | Median (Perz.) | 95 % KI     | n                          | Median (Perz.) | 95 % KI     | n      | Median (Perz.) | 95 % KI     |  |
| Woche 1     | 95             | 61,13          | 53,39-72,88 | 19                         | 34,13          | 16,33-61,26 | 18     | 20,13          | 9,63-42,2   | <b>&lt;0,01 a) vs. b)</b><br><b>&lt;0,01 a) vs. c)</b> |
| Woche 2-4   | 86             | 54,38          | 43,30-61,16 | 15                         | 58,79          | 37,44-82,80 | 16     | 13,88          | 8,59-68,04  | <b>0,04 a) vs. c)</b><br><b>&lt; 0,05 b) vs. c)</b>    |
| Monat 2-3   | 94             | 54,38          | 45,86-63,88 | 16                         | 49,16          | 33,05-77,75 | 19     | 54,38          | 38,28-70,90 | > 0,05   |
| Monat 4-6   | 87             | 58,38          | 46,91-67,19 | 19                         | 58,79          | 41,67-78,08 | 12     | 25,38          | 20,13-71,26 | > 0,05   |
| Monat 7-15  | 102            | 45,82          | 37,61-54,38 | 17                         | 58,38          | 28,30-72,88 | 17     | 34,88          | 20,21-47,29 | > 0,05   |

Tabelle 28: Effekte der immunsuppressiven Therapie auf die Treg-Frequenz (Korrelation Treg-Frequenz/Perzentile und Steroiddosis mg/Tag).

| Steroiddosis      |                              | Treg-Frequenz Woche 1 | Treg-Frequenz Woche 2-4 | Treg-Frequenz Monat 2-3 | Treg-Frequenz Monat 4-6 | Treg-Frequenz Monat 7-15 |
|-------------------|------------------------------|-----------------------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|--------------------------|
| <b>Woche 1</b>    | Korrelations Koeffizient (r) | -0,11                 | 0,09                    | -0,07                   | 0,15                    | -0,04                    |
|                   | p- Wert                      | 0,22                  | 0,32                    | 0,43                    | 0,08                    | 0,64                     |
|                   | Anzahl (n)                   | 133                   | 129                     | 119                     | 137                     | 118                      |
| <b>Woche 2-4</b>  | Korrelations Koeffizient (r) | -0,05                 | 0,02                    | -0,04                   | 0,13                    | 0,13                     |
|                   | p- Wert                      | 0,55                  | 0,80                    | 0,70                    | 0,14                    | 0,18                     |
|                   | Anzahl (n)                   | 132                   | 128                     | 118                     | 136                     | 118                      |
| <b>Monat 2-3</b>  | Korrelations Koeffizient (r) | -0,08                 | -0,25                   | 0,11                    | -0,20                   | -0,04                    |
|                   | p- Wert                      | 0,37                  | 0,01                    | 0,25                    | 0,02                    | 0,67                     |
|                   | Anzahl (n)                   | 128                   | 127                     | 117                     | 135                     | 114                      |
| <b>Monat 4-6</b>  | Korrelations Koeffizient (r) | -0,01                 | -0,16                   | 0,01                    | 0,02                    | 0,09                     |
|                   | p- Wert                      | 0,88                  | 0,09                    | 0,91                    | 0,85                    | 0,37                     |
|                   | Anzahl (n)                   | 116                   | 115                     | 111                     | 127                     | 103                      |
| <b>Monat 7-15</b> | Korrelations Koeffizient (r) | -0,12                 | -0,10                   | -0,15                   | -0,22                   | -0,22                    |
|                   | p- Wert                      | 0,19                  | 0,28                    | 0,12                    | 0,01                    | 0,02                     |
|                   | Anzahl (n)                   | 117                   | 115                     | 108                     | 130                     | 106                      |

Tabelle 29: Effekte der immunsuppressiven Therapie auf die Treg-Frequenz (Korrelation Treg-Frequenz/Perzentile und Tacrolimus-Talspiegel ng/ml).

| Tac               |                              | Treg-Frequenz Woche 1 | Treg-Frequenz Woche 2-4 | Treg-Frequenz Monat 2-3 | Treg-Frequenz Monat 4-6 | Treg-Frequenz Monat 7-15 |
|-------------------|------------------------------|-----------------------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|--------------------------|
| <b>Woche 1</b>    | Korrelations Koeffizient (r) | 0,04                  | -0,10                   | -0,15                   | 0,07                    | 0,02                     |
|                   | p- Wert                      | 0,66                  | 0,29                    | 0,11                    | 0,42                    | 0,87                     |
|                   | Anzahl (n)                   | 133                   | 128                     | 118                     | 136                     | 117                      |
| <b>Woche 2-4</b>  | Korrelations Koeffizient (r) | -0,11                 | -0,04                   | -0,01                   | 0,03                    | 0,01                     |
|                   | p- Wert                      | 0,21                  | 0,67                    | 0,90                    | 0,77                    | 0,90                     |
|                   | Anzahl (n)                   | 129                   | 126                     | 117                     | 134                     | 118                      |
| <b>Monat 2-3</b>  | Korrelations Koeffizient (r) | -0,05                 | -0,03                   | -0,04                   | -0,15                   | 0,07                     |
|                   | p- Wert                      | 0,62                  | 0,73                    | 0,64                    | 0,09                    | 0,45                     |
|                   | Anzahl (n)                   | 123                   | 122                     | 113                     | 129                     | 111                      |
| <b>Monat 4-6</b>  | Korrelations Koeffizient (r) | -0,18                 | -0,13                   | -0,04                   | -0,05                   | -0,04                    |
|                   | p- Wert                      | 0,05                  | 0,17                    | 0,66                    | 0,59                    | 0,67                     |
|                   | Anzahl (n)                   | 122                   | 120                     | 115                     | 130                     | 107                      |
| <b>Monat 7-15</b> | Korrelations Koeffizient (r) | -0,22                 | 0,01                    | -0,06                   | 0,00                    | -0,04                    |
|                   | p- Wert                      | 0,02                  | 0,92                    | 0,54                    | 0,99                    | 0,66                     |
|                   | Anzahl (n)                   | 118                   | 118                     | 110                     | 132                     | 107                      |

Tabelle 30: Effekte der immunsuppressiven Therapie auf die Treg-Frequenz (Korrelation Treg-Frequenz/Perzentile und Mycophenolsäure-Talspiegel g/l).

| MPA               |                              | Treg-Frequenz Woche 1 | Treg-Frequenz Woche 2-4 | Treg-Frequenz Monat 2-3 | Treg-Frequenz Monat 4-6 | Treg-Frequenz Monat 7-15 |
|-------------------|------------------------------|-----------------------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|--------------------------|
| <b>Woche 1</b>    | Korrelations Koeffizient (r) | 0,02                  | 0,13                    | -0,08                   | 0,00                    | 0,11                     |
|                   | p- Wert                      | 0,86                  | 0,17                    | 0,45                    | 0,98                    | 0,25                     |
|                   | Anzahl (n)                   | 130                   | 118                     | 105                     | 119                     | 111                      |
| <b>Woche 2-4</b>  | Korrelations Koeffizient (r) | 0,16                  | 0,06                    | -0,12                   | 0,05                    | 0,23                     |
|                   | p- Wert                      | 0,08                  | 0,50                    | 0,24                    | 0,57                    | 0,01                     |
|                   | Anzahl (n)                   | 128                   | 120                     | 107                     | 122                     | 114                      |
| <b>Monat 2-3</b>  | Korrelations Koeffizient (r) | 0,05                  | 0,08                    | -0,06                   | -0,01                   | -0,03                    |
|                   | p- Wert                      | 0,58                  | 0,39                    | 0,56                    | 0,94                    | 0,80                     |
|                   | Anzahl (n)                   | 126                   | 126                     | 110                     | 127                     | 113                      |
| <b>Monat 4-6</b>  | Korrelations Koeffizient (r) | 0,03                  | -0,16                   | 0,11                    | 0,06                    | 0,10                     |
|                   | p- Wert                      | 0,76                  | 0,08                    | 0,25                    | 0,48                    | 0,33                     |
|                   | Anzahl (n)                   | 117                   | 117                     | 116                     | 126                     | 104                      |
| <b>Monat 7-15</b> | Korrelations Koeffizient (r) | -0,08                 | -0,10                   | -0,06                   | -0,09                   | -0,01                    |
|                   | p- Wert                      | 0,36                  | 0,25                    | 0,56                    | 0,30                    | 0,96                     |
|                   | Anzahl (n)                   | 122                   | 122                     | 114                     | 135                     | 109                      |

Tabelle 31: Effekte von Immunsuppressiva auf Treg.

| Kein Einfluss auf Treg   | Passagere Reduktion der Treg-Frequenz | Unklarer Effekt auf die Treg-Frequenz  | Reduktion der Treg-Frequenz   | Erhöhung der Treg-Frequenz  |
|--|---------------------------------------|--|---|---|
| <b>Rituximab</b><br>Furukawa et al. 2016<br><br><b>Glukokortikoide</b><br>Camirand und Riella 2017 | <b>ATG</b><br>Furukawa et al. 2016    | <b>MPA</b><br>Camirand und Riella 2017 | <b>CNI</b><br>Akimova et al. 2012<br>Levitsky et al. 2016<br><br><b>Basiliximab</b><br>Camirand und Riella 2017 | <b>mTOR-Inhibitoren (Everolimus, Rapamycin)</b><br>Levitsky et al. 2016, Camirand und Riella 2017 |

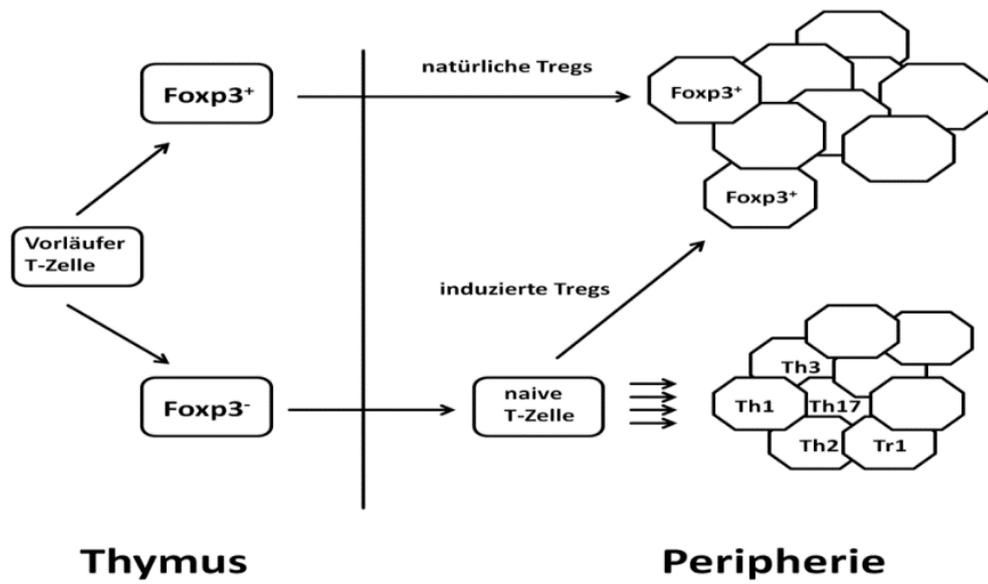


Abbildung 1: Natürliche und induzierte Treg (modifiziert nach Huehn et al. 2008).

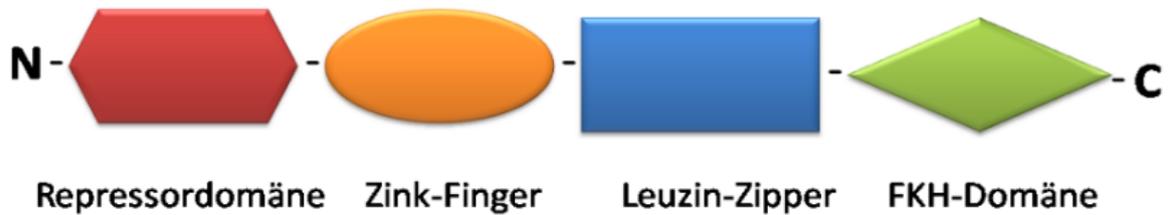


Abbildung 2: Aufbau FOXP3 mit seinen Bindungsdomänen (modifiziert nach Ziegler 2006).  
FKH: forkhead.

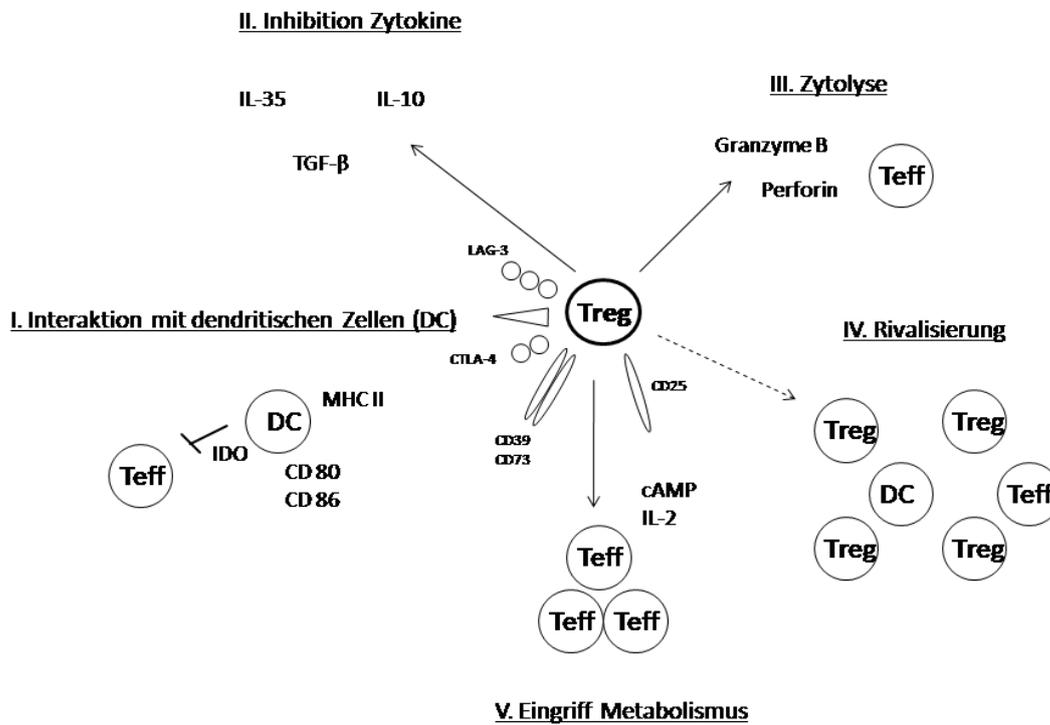


Abbildung 3: Effekte der Treg (modifiziert nach Caridade et al. 2013). IL: Interleukin, DC: dendritische Zellen, IDO: Indolamin-2,3-Desoxygenase. CTLA: zytotoxisches T-Lymphozyten assoziiertes Protein, LAG: Lymphozyten-Aktivierungsgen, TGF: transformierender Wachstumsfaktor, Teff: T-Effektor-Zellen, Treg: T-regulatorische-Zellen, cAMP: cyclisches Adenosinmonophosphat.

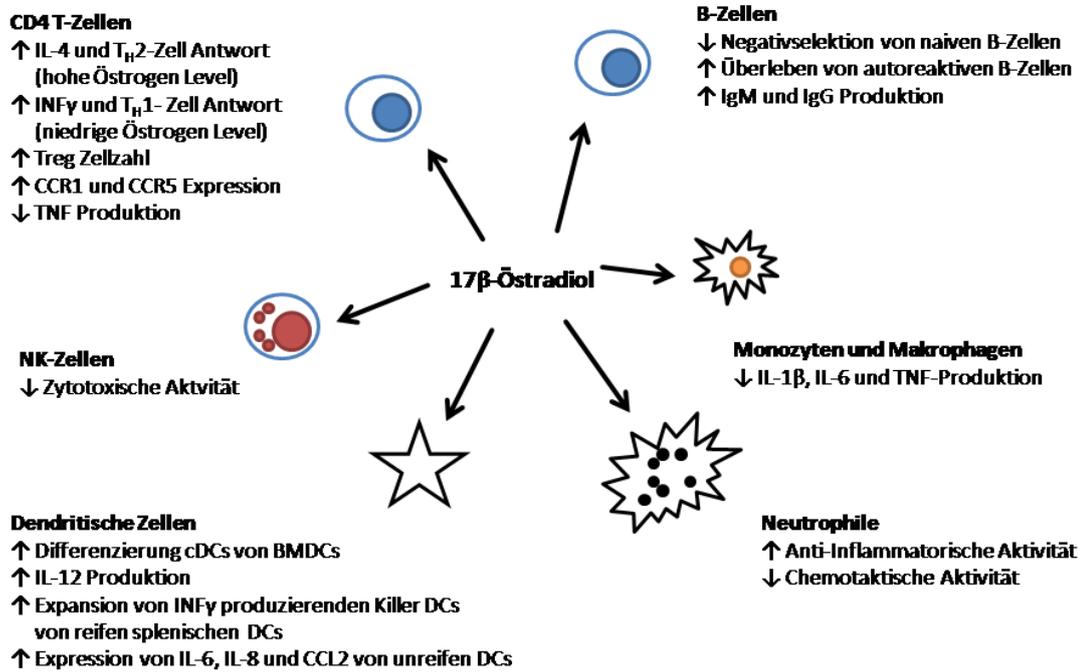


Abbildung 21: Effekt von Östrogen auf einzelne Zelltypen (modifiziert nach Fish: The X-files in immunity: sex-based differences predispose immune responses. Nat Rev Immunol. 2008 Sep;8(9):737-44)

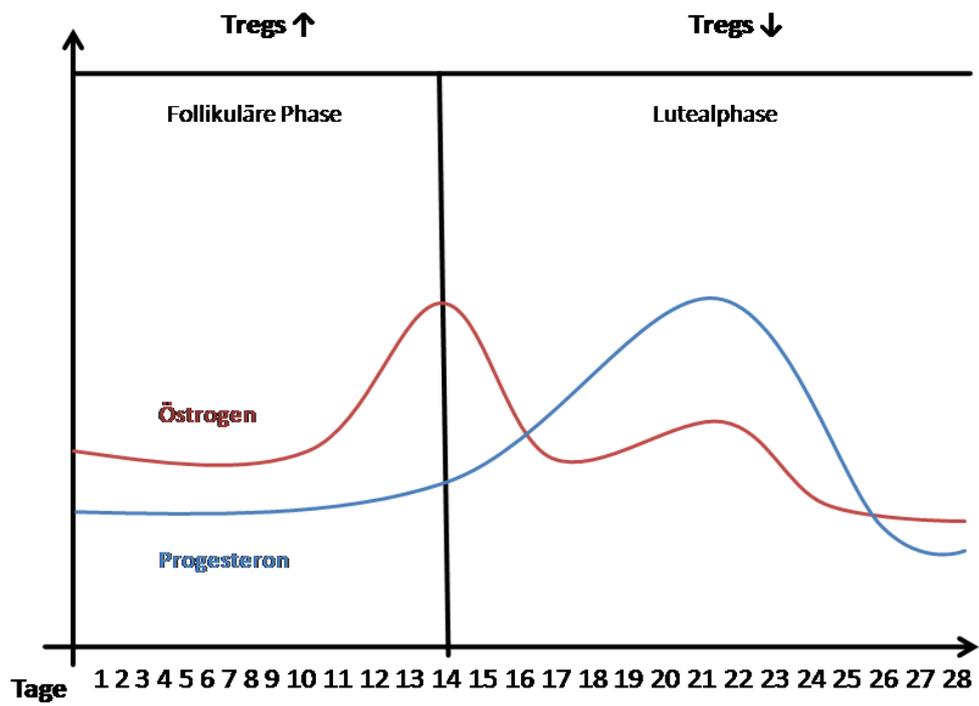


Abbildung 22: Treg-Frequenz während der folliculären Phase und Lutealphase (modifiziert nach Oertelt-Prigione 2012).

## 11 Erklärung zum Eigenanteil

In der Nephrologie am Klinikum Stuttgart wurde für die wissenschaftliche Untersuchung Nierentransplantierte eine Biodatenbank angelegt („Aufbau einer Blut-/Gewebe-/Datenbank im Zentrum für Innere Medizin Klinik für Nieren- und Hochdruck-Krankheiten des Klinikums Stuttgart – Katharinenhospital“ Version 1.0 vom 04.02.2013, Prof. Wieland und Prof. Olbricht/Prof. Schwenger – Projekt-Nr. 192/2013B01). Patienten mit passenden Einschlusskriterien wurde von einer Gruppe von vier Doktoranden (Dominique Adelhof, Verena Schauerte, Silvia Hubel und Ortrun Canzler) identifiziert und eingeschlossen. Zu definierten Visiten wurden klinische Ereignisse, Medikamentenspiegel und Laborparameter von der Doktorandengruppe dokumentiert. Die Daten wurden pseudonymisiert in eine Excel-Tabelle überführt (durchgeführt von Frau Dr. Maria Shipkova und Frau Mariana Kabakchiev) und nach abgeschlossenem Follow-Up (15 Monate) ausgewertet.

Meine Doktorarbeit wurde von Herrn Professor Dr. Eberhard Wieland, Frau Dr. Maria Shipkova und Herrn Professor Dr. Christoph-Joachim Olbricht konzipiert und von Herrn Professor Dr. Eberhard Wieland und Frau Dr. Maria Shipkova betreut.

Die Messungen (RT-PCR) der Treg wurden von Mitarbeitern der Abteilung für Labormedizin des Klinikums Stuttgart durchgeführt. Etabliert wurde die Methode der RT-PCR von Frau Maria Metzger (Masterarbeit) und Frau Dr. Maria Shipkova.

Die Auswertungen und Interpretationen sind meine Eigenleistung. Die statistischen Auswertungen wurden von Frau Dr. Tanja Kottmann (CRO Dr. med. Kottmann GmbH & Co. KG) sowie Herrn Professor Dr. Eberhard Wieland und Frau Dr. Maria Shipkova unterstützt.

Die vorliegende Dissertationsschrift (inklusive der enthaltenen Abbildungen) wurde von mir eigenständig verfasst. Die Literaturrecherche sowie die

Quellenangaben innerhalb der Dissertationsschrift wurden eigenständig von mir durchgeführt. Die Dissertationsschrift wurde von Herrn Professor Dr. Eberhard Wieland korrigiert. Das Zweitgutachten erfolgte von Privatdozent Dr. D. Schneidawind.

Basierend auf Arbeiten aus unserer Biodatenbank konnte ich bereits eine Koautorenschaft in „Clinical Biochemistry“ erwerben (Metzger M. et al. „Analytical evaluation of a real-time PCR-based DNA demethylation assay to assess the frequency of naturally occurring regulatory T cells in peripheral blood“). Weiterhin konnte ich auf dem IATDMCT-Kongress (The International Association of Therapeutic Drug Monitoring and Clinical Toxicology) in Kyoto 2017 einen Beitrag mit einer Koautorenschaft leisten (“Natural regulatory T cell-specific demethylated region in FOXP3 as a biomarker to predict acute rejection in kidney transplant patients under immunosuppression with tacrolimus, mycophenolic acid and steroids”).

## 12 Danksagung

Ich danke Herrn Professor Dr. Eberhard Wieland für die Überlassung des spannenden Themas und die Einführung in die Wissenschaft. Ganz besonders danke ich ihm für die ständige Förderung und exzellente Betreuung meiner Doktorarbeit.

Ich danke Herrn Privatdozent Dr. D. Schneidawind für die Übernahme des Zweitgutachtens.

Frau Dr. Maria Shipkova danke ich für die ständige Unterstützung, Beratung und Hilfestellung.

Ich danke der gesamten Doktorandengruppe (Dominique Adelhof, Verena Schauerte und Silvia Hubel) für den Austausch und die gegenseitige Unterstützung.

Frau Mariana Kabakchiev und Frau Inge Lautner danke ich für ihre Unterstützung bei der Pflege der Biodatenbank.

Den Personen aus meinem privaten Umfeld, die mich während meiner Promotion auf unterschiedliche Art und Weise unterstützt haben, danke ich ganz besonders. Eine besondere Rolle spielte hierbei mein Mann, der mir motivierend und wissenschaftlich unterstützend mit seinem Wissen stets zur Seite stand.