Aus dem Med. Zentrum für Kinderheilkunde
der Philipps-Universität Marburg
Geschäftsf. Direktor: Prof. Dr. H. W. Seyberth
Arbeitsgruppe pädiatrische Nephrologie
Leiter: Prof. Dr. H. W. Seyberth

Lymphozytensubpopulationen bei nierentransplantierten Kindern -Langzeitveränderungen nach Induktionstherapie mit polyklonalen Antilymphozytenantikörpern

Untersuchungen von Lymphozytensubpopulationen mit fluoreszenzaktivierter Durchflusszytometrie bei drei verschiedenen pädiatrischen Patientengruppen

INAUGURAL-DISSERTATION
zur Erlangung des Doktorgrades der gesamten Medizin

dem Fachbereich Humanmedizin der
Philipps-Universität Marburg
vorgelegt

von
Marthe Katharina Mostert
aus Frankfurt am Main

Marburg 2004

Angenommen vom Fachbereich Humanmedizin der Philipps-Univerität Marburg am
18.11.2004
Gedruckt mit Genehmigung des Fachbereichs.

Dekan: Prof. Dr. Maisch
Referent: Professor Dr. Klaus
Korreferent: PD Dr. Herz
2. Korreferent: Prof. Dr. Steiniger

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung 1

1.1 Besondere Aspekte der Nierentransplantation bei Kindern 1

1.2 Immunsuppressive Therapie 2

1.2.1 Steroide 2

1.2.2 Azathioprin 3

1.2.3 Cyclosporin 3

1.2.4 Antilymphozytäre Antikörper 3

1.3 Das lymphatische System 5

1.3.1 Intrathymale T-Zellentwicklung 5

1.3.2 Postthymale T-Zelldifferenzierung 6

1.3.3 Altersabhängige Veränderungen der T-Zellzusammensetzung 6

2. Fragestellung 7

3. Methodik 7

3.1. Patientenkollektiv 7

3.2. Erhebung klinischer Daten 8

3.3. Fluoreszenzaktivierte Durchflusszytometrie 8

3.3.1 Was ist Durchflusszytometrie? 8

3.3.2 Das Auswertefenster 8

3.3.3 Aufbereitung der Proben 10

3.3.4 Durchführung der Messungen 10

3.4. Weitere Laborparameter und Diagnostik 12

3.5. Computergestützte statistische Auswerteverfahren 12

4. Ergebnisse 13

4.1 Krankengut 13

4.2 Messergebnisse 14

4.3 Lymphozyten 14

4.4 T-Zellen 15

4.4.1 T-Helferzellen 15

4.4.2 Zytotoxische T-Zellen 16

4.4.3 Doppelt positive T-Zellen 17

4.4.4 CD4:CD8-Quotient 17

4.4.5 CD57 positive T-Zellen 18

4.4.6 CD45R0 und CD45RA auf T-Helferzellen 19

4.4.7 CD45R0 und CD45RA auf zytotoxischen T-Zellen 19
4.4.7.1 CD45R0 auf CD8+Zellen 20
4.4.7.2 CD45RA auf CD8+Zellen 20
4.4.8 T-Zellen mit NK-Markern 21
4.5 Natürliche Killerzellen 22
4.6 B-Lymphozyten 23
4.6.1 B-Lymphozyten mit HLA-DR-Expression 24
4.6.2 B-Lymphozyten mit CD5-Expression 25
4.7 T-Zellrezeptorverteilung 26
4.8 Beispiele aus den FACS-Analysen der PoAk-Gruppe 26
4.8.1 T-Zellen 26
4.8.2 CD57-positive Subpopulation 27
4.8.3 NK-Zellen 27
4.8.4 Memory/naive T-Helferzellen 28
4.8.5 Memory/naive zytotoxische T-Zellen 28
4.8.6 Aktivierte B- und T-Zellen
4.8.7 CD5-positive B-Zellen 29
4.8.8 T-Zellrezeptoren 30
4.9 T-Zellsubpopulationen der ersten und zweiten Messung 30
4.9.1 T-Zellen 30
4.9.2 T-Helferzellen und zytotoxische T-Zellen 31
4.9.3 CD4:CD8-Quotient 31
4.9.4 CD45R0 und RA auf T-Helferzellen 32
4.9.5 CD45R0 und RA auf zytotoxischen T-Zellen 32
4.9.6 CD57-positive T-Zellen 33
4.10 Deskriptive Statistik und p-Werte 34

5. Diskussion 38

5.1 Zielsetzung der Untersuchung 38
5.1.1 Studiendesign 38
5.1.2 Statistik 38
5.1.3 Messmethode 39
5.2 Homöostase 39
5.3 Subset- und altersspezifische Regenerationsmuster von T-Zellen 40
5.3.1 CD4+Zellen 40
5.3.2 CD8+Zellen 41
5.4 Die Rolle des antigenen Stimulus 42
5.5 Spezifische Oberflächenmarker 43
5.5.1 CD57 auf CD8+Zellen 43
5.5.2 CD16, CD56 und CD2 auf T-Zellen 43
5.6 B-Zellen 43

5.7 Vorzeitige Alterung des Immunsystems 44
5.8 Funktionelle Aspekte 44
5.9 Ausblick 45

6. Zusammenfassung 46

7. Literatur 47

8. Abkürzungsverzeichnis 56

9. Verzeichnis der Abbildungen 57

10. Verzeichnis der Tabellen 60

11. Anhang 61

1. Einleitung

1.1 Besondere Aspekte der Nierentransplantation bei Kindern

Transplantation einer Niere gilt heute als Therapie der Wahl bei Kindern mit chronischem Nierenversagen (Moudgil 1999). Aus den Erhebungen der North American Pediatric Renal Transplant Cooperative Study (NAPRTC) ergeben sich für das Jahr 2001 Ein-, Drei und Fünfjahrestransplantatüberlebensraten von 91%, 85% und 80% für die Empfänger von Lebendspenden beziehungsweise 83%, 73% und 65% für Nierenspenden Verstorbener. Gegenüber früheren Zahlen aus den Jahren 1987 und 1991 (88% Einjahres- und 81% Dreijahresüberlebensraten für Lebendspenden beziehungsweise 74% und 63% für Kadaverspenden) spiegelt sich hier eine deutliche Verbesserung wider (Seikaly 2001). Fortschritte der HLA-Typisierung, der immunsuppressiven Therapie, peri- und postoperativen Versorgung sowie Diagnostik und Behandlung von Abstoßungsreaktionen haben dazu beigetragen, Patienten- und Transplantatüberleben in der pädiatrischen Nierentransplantation zu verbessern. Faktoren, die die spezielle Situation bei Kindern beeinflussen, ergeben sich aus dem Empfängeralter, dessen besonderer Immunitätslage, dem Spenderalter und auch den emotional-psychologischen Besonderheiten dieser Patientengruppe (Yadin 1993). Zwar hat man heute deutlich bessere Transplantatüberlebensraten auch bei jüngeren Kindern, aber dennoch existieren eine Reihe von Gründen für die oftmals niedrigeren Erfolgsraten als bei Erwachsenen, welche sich aus den oben angeführten Punkten ergeben:
1.) Kinder metabolisieren Cyclosporin sehr viel schneller als Erwachsene, so dass es schwieriger sein kann, Zielblutspiegel zu erreichen. Kleinkinder wiederum haben außerdem eine begrenzte Resorptionsoberfläche ihres Dünndarms, so dass sie sehr viel höhere Dosen (pro kg KG) benötigen, um nicht Abstoßungsreaktionen zu erleiden (Ettenger 1991, Neiberger 1987, Whitington 1990).
2.) Auch aus technischer Sicht stellen Kinder, aufgrund ihrer Größe eine besondere Herausforderung an den Transplantationschirurgen dar. Lange Anastomosenzeiten und resultierende Transplantatdysfunktion können den Erfolg gefährden (Harmon 1991, Canadian Multicenter Transplant Study Group 1983).
3.) Transplantatüberlebenszeiten sind schlechter bei jüngeren Spendern insbesondere, wenn Nieren junger Spender in sehr junge Empfänger verpflanzt werden (Hoyer 1989, Arbus 1991).
4.) Nicht selten sind Complianceprobleme: Im Alter zwischen 12 und 20 Jahren findet sich bei 64% der Patienten mindestens eine Phase von Noncompliance, insbesondere wenn die Medikation das physische Erscheinungsbild beeinflusst (Ettenger 1991).
5.) Man weiß außerdem, dass jüngere Kinder eine stärkere unspezifische Immunreaktivität besitzen im Vergleich zu älteren Kindern und Erwachsenen. Dies zeigt sich etwa in höheren Werten absoluter und aktivierter T-Zellzahlen, einem erhöhten Verhältnis von CD4+ zu CD8+Zellen sowie der Lymphozytenproliferation nach mitogener Stimulation bei jüngeren Kindern (Kerman 1989, Ettenger 1987). Damit geht ein höheres Risiko immunologisch vermittelter Abstoßungsreaktionen einher.
Trotz dieser mannigfaltigen Besonderheiten der pädiatrischen Patienten stammen die meisten therapeutischen Protokolle von Erwachsenen (Laine 1998). Wenngleich, wie oben angeführt, die Ein-, Drei- und Fünfjahrestransplantatüberlebenszeiten bei Kindern heute exzellente Erfolge dokumentieren, so spielen chronische Abstoßungsreaktionen eine nicht unerhebliche Rolle, denn der pädiatrische Patient besitzt ein hohes Risiko im Laufe seines Lebens retransplantiert werden zu müssen. Dies sollte den Blick auf die langfristigen Effekte und Besonderheiten einer bei Kindern angewandten Therapie lenken, im Hinblick auf ein optimales

Transplantatüberleben bei gleichzeitiger Minimierung von Folgekomplikationen.
Moderne Transplantationstechnologie und die Anwendung hochpotenter spezifischer Immunsuppressiva müssen sich in ein Verständnis für die besonderen Bedürfnisse des kindlichen Transplantatempfängers, insbesondere seiner immunologischen Eigenheiten integrieren.

1.2 Immunsuppressive Therapie

Man unterscheidet zwischen einer Basisimmunsuppression und einer perioperativen Induktionstherapie, beziehungsweise einer sequentiellen Therapie, welche sich in der jüngeren Vergangenheit in der pädiatrischen Nierentransplantation bewährt hat, da sie mit einem besseren Transplantatüberleben einhergeht (Ettenger 1991, McEnery 1992). Im Rahmen eines sequentiellen Therapieprotokolls wird ein Antilymphozytenpräparat zur Induktionstherapie während der initialen Phase der Transplantatdysfunktion eingesetzt, was einen verzögerten Beginn des Einsatzes von Cyclosporin erlaubt, da dieses den renalen Blutfluss vermindern kann und so zu einer Verlängerung der Dysfunktion führen und damit das Transplantatüberleben gefährden kann.
Im Rahmen der dauerhaft erforderlichen Basisimmunsuppression beziehungsweise Erhaltungstherapie, welche der Vermeidung von Abstoßungsreaktionen dient, werden Steroide, Azathioprin und Cyclosporin eingesetzt, meist als Tripel- oder Zweifachtherapie (Yadin 1993). Daneben gibt es eine Reihe neuerer und zum Teil hochspezifischer Präparate wie Tacrolimus, Mycophenolat Mofetil und Daclizumab, ein monoklonaler Antikörper gegen die Alpha-Untereinheit des Interleukin-2-Rezeptors auf aktivierten T-Zellen, zu welchen bislang nur wenige Erfahrungsberichte über den Einsatz in der pädiatrischen Nierentransplantation vorliegen (Ettenger 1998).
Angriffspunkt jeder immunsuppressiven Therapie sind die immunkompetenten Zellen des Transplantatempfängers und hier insbesondere die T-Zellen, welche die Hauptrolle bei Transplantatabstoßungen spielen (Denton 1999).
Die Hemmung der immunologischen Auseinandersetzung mit dem transplantierten Gewebe erfolgt über unterschiedliche Mechanismen.

1.2.1 Steroide

Corticosteroide verringern die Produktion von Entzündungsmediatoren wie Cytokinen (hier insbesondere IL-1 und TNF-alpha), Prostaglandinen und Stickoxid. Sie blockieren die Einwanderung von Entzündungszellen an den Ort der Entzündung, indem sie die Expression der entsprechenden Adhäsionsmoleküle verhindern und sie fördern bei Leukozyten und Lymphozyten den Zelltod durch Apoptose.
Da sie über intrazelluläre Rezeptoren, welche in fast jeder Körperzelle exprimiert werden, wirken und die Expression von bis zu einem Prozent aller Gene regulieren, sind sie mit einer großen Anzahl von Nebenwirkungen behaftet (Janeway 1997).
In der Langzeittherapie bei Kindern spielen hier unter anderem die Infektneigung und das verminderte Längenwachstum eine wichtige Rolle. Hohe Dosen können das Wachstum nahezu vollständig hemmen (Ettenger 1987, Potter 1970). Dies ist ein wesentlicher Grund für den Pädiater, wenn irgend möglich, Steroide zu reduzieren oder ganz abzusetzen.

1.2.2 Azathioprin

Vor Einführung von Cyclosporin war Azathioprin in Kombination mit Prednison Bestandteil der Standarderhaltungstherapie. Heute wird es recht häufig im Rahmen einer Tripel-Basisimmunsuppression verwendet und kann so der Einsparung von Steroiden und Cyclosporin dienen. Azathioprin wirkt über einen Eingriff in die Nukleinsäuresynthese. Zu seinen aktiven Metaboliten gehören 6-Mercaptopurin und 6-Thioinosinsäure, welche die Synthese von Adenosinmonophosphat und Guanosinmonophosphat und damit die Synthese von DNA und RNA blockiert (Yadin 1993). Entsprechend dem unspezifischen Wirkprinzip betrifft dies nicht nur die sich teilenden Lymphozyten sondern auch andere sich teilende Zellen des Organismus.

1.2.3 Cyclosporin

Mit der Einführung von Cyclosporin gelang in den 80er Jahren ein Durchbruch in der Verbesserung der immunsuppressiven Therapie, wenngleich bei Kindern zunächst nicht die gleichen Erfolge bei den Transplantatüberlebenszeiten gesehen wurden, wie bei Erwachsenen (Ettenger 1989). Man musste zunächst lernen, dass die auf Kinder übertragenen Dosierungsschemata aufgrund der altersabhängigen rascheren Metabolisierung nicht ausreichend waren (Neiberger 1987).
Cyclosporin ist ein zyklisches 11-Aminosäurepeptid, welches aus dem Pilz Tolypocladium inflatum isoliert wurde. Seine pharmakologische Wirkung entfaltet es durch Bindung an eine Gruppe intrazellulärer Proteine, den sogenannten Cyclophilinen, einer Untergruppe der Immunophiline. Die so gebildeten Komplexe inhibieren die Phosphataseaktivität von Calcineurin und unterbrechen auf diese Weise den calciumabhängigen Signaltransduktionsweg in der frühen T-Zellaktivierung. Dabei werden verschiedene Zytokingene wichtiger Wachstumsfaktoren für T-Zellen vermindert exprimiert, wie zum Beispiel von IL-2. Zwar handelt es sich um einen sehr spezifischen Wirkmechanismus, jedoch wirkt Cyclosporin nicht ausschließlich auf T-Zellen. Auf B-Zellen etwa wirkt es indirekt inhibitorisch infolge der verminderten Cytokinproduktion durch die T-Lymphozyten. Bei Granulozyten kommt es zu einer verminderten calciumabhängigen Exozytose von Granula-assoziierten Serinesterasen.
Des weiteren kommen Immunophiline auch in vielen anderen Zelltypen vor, so dass eine Wirkung auf andere Gewebe wahrscheinlich ist (Janeway 1997, Holländer 1994, Carpenter 2000). Klinischerseits bereiten unter anderem die Nephrotoxizität sowie die typische Veränderung der Gesichtszüge in Kombination mit einer teilweise sehr ausgeprägten Gingivahyperplasie nicht selten Probleme.

1.2.4 Antilymphozytäre Antikörper

Antilymphozytäre Antikörper sind hochpotente Immunsuppressiva, die seit etwa 30 Jahren im klinischen Gebrauch sind und auch in der pädiatrischen Nierentransplantation ihre routinemäßige Anwendung finden, da Kinder nach Induktionstherapie mit einem Antilymphozytenantikörper ein signifikant besseres Transplantatüberleben und eine bessere GFR aufweisen, wie die North American Pediatric Renal Transplant Cooperative Study zeigt (Waraday1997). Bei polyklonalen Antilymphozytenseren handelt es sich um heterologe Präparate, welche, basierend auf den Untersuchungen von E Metchnikoff, P Medawar, MFA Woodruff, AP Monaco sowie TE Starzl und vielen anderen (Revillard 1999, Metchnikoff 1899, Brent 1997, Starzl 1968) nach

Immunisierung durch Lymphozyten (ALS), Thymozyten (ATG) oder Lymphoblasten (ALG) aus Pferde- oder Kaninchenserum gewonnen werden. Polyklonale Antilymphozytenseren enthalten eine Reihe verschiedener Antikörper gegen eine große Anzahl unterschiedlicher Lymphozytenantigene, wie zum Beispiel CD2, CD3, CD4, CD8, CD25, CD11a, CD18, HLA-DR, CD45, CD58, CD44 sowie ß2-Mikroglobulin und HLA-Klasse I-Molekülen. Weiterhin enthalten sie auch Antikörper gegen Antigene auf nicht-lymphatischen Zellen, wie Erythrozyten, Neutrophile Granulozyten, Thrombozyten und Endothelzellen (Bonnefoy-Bérard 1991, Rebellato 1994, Revillard 1999, Michallet 2003).

Monoklonale Antikörper hingegen werden mittels der durch Köhler und Milstein 1975 entwickelten Hybridom-Technik hergestellt (Köhler 1975). Der erste und am häufigsten verwendete monoklonale Antikörper ist OKT3. Es handelt sich um einen 1981 durch Cosimi in die klinische Praxis eingeführten monoklonalen Maus-Antikörper gegen den CD3/T-Zellrezeptorkomplex (Cosimi 1981).

Antilymphozytäre Antikörper finden neben der Verwendung zur Induktionstherapie bei Organtransplantationen Anwendung bei akuten Abstoßungsreaktionen und in der Therapie von Graft-versus-Host-Reaktionen.

Sowohl monoklonale als auch polyklonale Antilymphozytenantikörper induzieren relativ rasch eine Lymphozytopenie, welche durch unterschiedliche Wirkmechanismen zustande kommen kann (Bonnefoy-Bérard 1996). Für den monoklonalen Antikörper OKT3 ist hier insbesondere die Antigenmodulation des T-Zellrezeptorkomplexes zu nennen sowie Zytolyse und die vermehrte Adhäsion an Endothelzellen durch eine Heraufregulation von Adhäsionsmolekülen wie CD11a und CD11b (Bonnefoy-Berard 1996, Wong 1990, Ten Berge 1995) die dazu führen, dass 30-60 Minuten nach der ersten OKT3-Injektion die meisten T-Zellen aus der Peripherie verschwinden, wobei es sich um einen reversiblen Prozess handelt (Chatenoud 1983, Buysmann 1996).

Nach Applikation von polyklonalen T-Zellantikörpern kommt es zu einer ausgeprägten Lymphopenie, welche während der gesamten Behandlungsdauer bestehen bleibt (Bonnefoy-Berard 1996). Obwohl einige der Antikörper auch an B-Zellen binden, stellt sich keine wesentliche B-Zelldepletion ein. Zur Depletion der T-Zellen tragen verschiedene Mechanismen bei: Antikörperabhängige T-Zell-vermittelte Zytoloyse, komplementabhängige Opsonisierung und Zytolyse, Opsonisierung und Phagozytose durch Makrophagen des retikuloendothelialen Systems sowie Fas-vermittelte Apotose (Revillard 1999, Genestier 1998, Preville 2001). Daneben sind weitere Mechanismen wie Aktivierung, Blockierung, Modulation von Oberflächenantigenen sowie die Induktion von Anergie, also eines Zustandes fehlender Reaktivität aufgrund der polyklonalen Natur dieser Präparatgruppe beschrieben (Merion 1998, Bonnefoy-Bérard 1991, Michallet 2003).

Die ersten Applikationen antilymphozytärer Antikörper können mit einem sogenannten Cytokine-Release-Syndrom einhergehen. Die Zytokin-Ausschüttung kann dabei unter anderem zu Fieber, Schüttelfrost und Luftnot führen (Müller 1999, Guttman 1997). Zu häufig beobachteten Nebenwirkungen bei Kindern zählen Fieber, Diarrhöen und Kopfschmerzen; seltener werden Ausschläge, Konjunktivitis und Krämpfe beobachtet (Yadin 1993). Im langfristigen Verlauf besteht ein vermehrtes Risiko für opportunistische Infekte, vor allem durch Viren sowie ein erhöhtes Risiko für lymphoproliferative Erkrankungen. Bei letzteren sind insbesondere EBV-assoziierte Lymphome zu nennen, welche bei Kindern ein besonderes Problem darstellen, da sie oftmals zum Zeitpunkt der Transplantation EBV-seronegativ sind (Schroeder 1992).

Bei erwachsenen nierentransplantierten Patienten beobachtet man signifikante langfristige Effekte einer Therapie mit polyklonalen antilymphozytären Antikörpern. Diese betreffen insbesondere T-Zellregeneration und die konsekutive Zusammensetzung des Lymphozytenrepertoires, wie etwa persistierend niedrige CD4-Zellzahlen,

eine Inversion des CD4:CD8-Quotienten sowie einen Anstieg von CD8+CD57+Zellen (Müller 1999). Erfahrungen mit der Anwendung polyklonaler Antilymphozytenpräparate bei Kindern wurden von verschiedenen Autoren beschrieben (Bell 1997, Soulillou 1990, Laske 1992, Imakita 1986) wobei keine dieser Studien einen Beobachtungszeitraum von 6 Monaten überschritt.

1.3 Das lymphatische System

Aufgrund ihrer besonderen Bedeutung in der Infektabwehr, der Pathogenese von Autoimmunerkrankungen und klinischen Situationen der Immundefizienz sind lymphatische Zellreihen Gegenstand zahlloser Untersuchungen. Beim Menschen umfasst das lymphatische System primäre lymphatische Organe wie Knochenmark und Thymus sowie die sekundären lymphatischen Organe Milz, Lymphknoten, Tonsillen und die Payerschen Plaques des Darms. Die lymphatischen Zellinien, welche durch die sekundären lymphatischen Organe zirkulieren, sind die aus dem Thymus stammenden T-Lymphozyten, die dem Knochenmark entstammenden B-Lymphozyten sowie die Natürlichen Killerzellen (NK-Zellen) (Haynes 1994). Während ihrer Differenzierung exprimieren diese Zellen in charakteristischer Abfolge eine große Anzahl von Oberflächenmolekülen. Die Entdeckung, dass letztere mit monoklonalen Antikörpern dargestellt werden können, führte zur Etablierung der sogenannten CD (cluster of differentiation)-Klassifikation auf dem „First International Workshop on Leukocyte Differentiation Antigens“ 1982 (Bernard 1984).
Unter den lymphatischen Zellinien kommt den T-Lymphozyten als Teil des erworbenen Immunsytems im Rahmen der sogenannten zellulären (im Unterschied zur humoralen) Immunabwehr eine Schlüsselrolle zu. Im Rahmen ihrer vielfältigen Funktionen können sie Zielzellen direkt vernichten, Killerzellen bei der Immunabwehr unterstützen, andere Immunzellen aktivieren und B-Zellen zu einer Antikörperantwort stimulieren. Daneben können sie Immunreaktionen auch herunterregulieren. Sie sezernieren Zytokine, Chemokine und andere Mediatoren. So tragen sie über vielerlei Mechanismen zu klinisch relevanten Immunphänomenen wie etwa der zellvermittelten Zytolyse, Transplantatabstoßung, Graft-versus-Host- und Autoimmunerkrankungen bei (Benoist 1999). T-Zellpopulationen sind daher auch in der Transplantationsimmunologie im Fokus besonderen Interesses.

1.3.1 Intrathymale T-Zellentwicklung

T-Zellen entwickeln sich aus Knochenmarksstammzellen, welche kontinuierlich zur Reifung in den Thymus wandern. Dort werden einzelne Entwicklungsstadien durchlaufen, in denen jeweils verschiedene Kombinationen von Oberflächenmarkern exprimiert werden. Es erfolgen Rekombinationen der T-Zellrezeptorgene, wodurch eine große Anzahl unreifer T-Zellen hervorgebracht wird, welche sich auf zwei unterschiedliche T-Zellinien mit alpha/beta- oder gamma/delta-Rezeptoren verteilen. Nach der Geburt exprimieren mehr als 90% der T-Zellen alpha/beta-Rezeptoren. Diese durchlaufen zuvor eine Reihe von Reifungsstadien, welche durch die Änderung der Oberflächenmoleküle charakterisiert ist. Die früheste Population exprimiert weder die für T-Zellen charakteristischen Oberflächenmarker CD4, CD8 noch den CD3-T-Zellrezeptorkomplex und wird daher „doppelt negativ“ genannt. Es folgen verschiedene weitere Schritte und schließlich ein Stadium „doppelt positiver“ Thymozyten, die sowohl CD4 als auch CD8 exprimieren. Von diesen gehen mehr als 95% zugrunde, da sie nicht positiv selektioniert werden, das heißt, keine körpereigenen MHC-Moleküle auf Zelloberflächen erkennen können. Die verbleibenden Zellen durchlaufen eine weitere sogenannte negative Selektion, die zur

Apoptose solcher Zellen führt, welche auf körpereigene Peptide im Komplex mit körpereigenem MHC eine hohe Affinität besitzen.
Übrig bleiben solche T-Zellen, deren (alpha/beta-)T-Zellrezeptor körpereigene MHC-Moleküle zusammen mit Peptiden aus fremden Antigenstrukturen erkennt, und die entweder CD4 oder CD8 zusammen mit CD3 exprimieren. Sie werden auch als reife oder naive CD4- beziehungsweise CD8-Zellen bezeichnet (Janeway 1997, Delves 2000).
Ähnlich wie im Thymus können T-Zellen wahrscheinlich auch an anderen Orten reifen (Spits 1995).
CD4 bindet an MHC-Klasse-II-Moleküle und CD8 an MHC-Klasse-I. CD4-Zellen sind sogenannte Helferzellen und CD8-Zellen werden auch zytotoxische T-Zellen genannt. Während MHC-Klasse-I-Moleküle auf allen nukleären Zellen exprimiert werden, findet sich MHC-Klasse-II auf antigenpräsentierenden Zellen (Delves 2000).

1.3.2 Postthymale T-Zelldifferenzierung

Nachdem sie den Thymus verlassen haben, zirkulieren die naiven T-Zellen, welche unter anderem durch die Expression von CD45RA auf ihrer Oberfläche charakterisiert sind, kontinuierlich durch das Blut und die sekundären lymphatischen Organe. Treffen sie auf ihr spezifisches Antigen auf der Oberfläche einer professionellen antigenpräsentierenden Zelle (Makrophagen, B-Zellen oder dendritische Zellen) zusammen mit einem kostimulatorischen Signal, so folgen die Proliferation und Differenzierung zu Effektorzellen und Memoryzellen. Letztere exprimieren CD45R0 anstelle von CD45RA auf ihrer Oberfläche. Während im Nabelschnurblut nahezu alle T-Zellen CD45RA exprimieren, steigt der Anteil an CD45R0-Expression physiologischerweise mit dem Alter (Haynes 1994, Paul 1999, Janeway 1997).

1.3.3 Altersabhängige Veränderung der T-Zellzusammensetzung

Das Immunsystem unterliegt einer sequentiellen Entwicklung, welche einerseits genetisch programmiert und andererseits extern durch Antigenkontakt beeinflusst wird. Nur wenige Studien haben bisher phänotypische Unterschiede von Lymphozyten systematisch in den verschiedenen Altersstufen untersucht (Erkeller-Yuksel 1992). Altersabhängige Unterschiede finden sich sowohl bei zellvermittelten als auch bei humoralen Immunantworten im Sinne einer Abnahme der Immunantwort mit zunehmendem Alter. Unter den Lymphozytensubpopulationen finden sich ebenfalls verschiedene altersabhängige Veränderungen. Während die meisten Untersuchungen konstante CD4- und CD8-Zellzahlen zeigten, so lassen sich jedoch Veränderungen innerhalb dieser beiden T-Zellpopulationen reproduzierbar aufzeigen, etwa die Verschiebung von RA- zu R0-exprimierenden Zellen, welche im wesentlichen auf die progrediente Thymusinvolution zurückgeführt wird (Miller 1999). Weiterhin findet sich eine altersabhängige Zunahme der CD57-Expression sowie eine Abnahme der Expression von CD28 (Merino 1998).

2. Fragestellung

In der vorliegenden Arbeit sollte der Frage nachgegangen werden, ob sich bei über einen kurzen Zeitraum postoperativ mit antilymphozytären Antikörpern behandelten pädiatrischen nierentransplantierte Patienten langfristige Unterschiede in der Zusammensetzung der Lymphozytensubpopulationen finden.
Als Vergleichsgruppen dienten eine Gruppe nierentransplantierter pädiatrischer Patienten, die lediglich eine Basisimmunsuppression erhalten hatten sowie eine Gruppe nicht immunsuppressiv behandelter pädiatrischer Kontrollen.

Im Einzelnen ergaben sich folgende Fragen:

1.) Gibt es Hinweise für Langzeitveränderungen in den Lymphozytensubpopulationen in Abhängigkeit von der postoperativ durchgeführten immunsuppressiven Therapie?

2.) Welche Charakteristika tragen diese Veränderungen? Wie unterscheiden sie sich von den für erwachsene Patienten beschriebenen Lymphozytensubpopulationen?

3.) Welche funktionelle Folgen könnten spezifische Veränderungen bei pädiatrischen Patienten mit sich bringen?

3. Methodik

3.1. Patientenkollektiv

In dieser Querschnittsuntersuchung wurden Lymphozytensubpopulationen aus Restblut von 21 zwischen 1987 und 1997 nierentransplantierten Kindern bestimmt, das im Rahmen von Routineuntersuchungen abgenommen wurde, sowie aus Blut von 46 Kindern und Jugendlichen ohne Nierenerkrankungen, welche für elektive chirurgische oder unfallchirurgische Eingriffe stationär aufgenommen worden waren und keine Hinweise auf akute Infektionen oder immunologische Erkrankungen boten.
Alle Patienten beziehungsweise deren Erziehungsberechtigte gaben ihr Einverständnis zur Bestimmung dieser zusätzlichen Parameter. Es waren keine zusätzlichen Blutentnahmen notwendig.
Die Patienten wurden entsprechend ihrer initialen immunsuppressiven Therapie nach Nierentransplantation sowie aufgrund ihres Alters beziehungsweise der Zeit seit Transplantation retrospektiv ausgewählt.
Bei allen Patienten bestand die initiale Basisimmunsuppression aus Cyclosporin, Azathioprin und Methylprednisolon. Zehn Patienten hatten aufgrund verzögerter Transplantatfunktion, im Rahmen von Zweittransplantationen oder wegen des Vorhandenseins cytotoxischer Antikörper außer der Basisimmunsuppression polyklonale T-Zell-Antikörper (PoAk, Thymoglobulin, SangStat®) als Induktionstherapie erhalten. Die anderen elf Patienten erhielten ausschließlich die Basisimmunsuppression (BI).

3.2. Erhebung klinischer Daten

Klinische Daten wurden retrospektiv den aufgezeichneten Krankengeschichten, -kurven, Ambulanzakten, Operationsberichten und Transplantationsakten entnommen und in Datenbögen übertragen. Hierbei wurden folgende Parameter erfasst: Zeitpunkt der Transplantation, Geschlecht, Alter und Größe des Patienten zum Zeitpunkt der Transplantation und bei Blutentnahme, HLA-Klassifikation, zytotoxische Antikörper, CMV-Status bei Spender und Empfänger, aktuelle und vorangegangene Medikation, Serum-Kreatininwerte, glomeruläre Filtrationsraten, Grunderkrankung, Dauer der vorangehenden Dialyse, warme Ischämiezeit, kalte Ischämiezeit, Komplikationen.

3.3. Fluoreszenzaktivierte Durchflusszytometrie

3.3.1 Was ist Durchflusszytometrie?

In einem Durchflusszytometer wird die Eigenschaft von Zellen ausgenutzt, Licht in charakteristischer Weise zu streuen. Die Zellen passieren in einem Flüssigkeitsstrom einen Laserstrahl. Das in der vorliegenden Untersuchung verwendete Durchflusszytometer verfügte dazu über einen Argonlaser.
Die Messung der Lichtstreuung zweier verschiedener Winkel erlaubt die Unterscheidung zwischen Lymphozyten, Monozyten und Granulozyten. Das sogenannte Vorwärtsstreulicht (Forward Scatter) ist in einem Winkel unter 2° und das Seitwärtsstreulicht (Side Scatter) um 90° gestreut.
Während das Vorwärtsstreulicht als Maß für die Zellgröße steht, entspricht das Seitwärtsstreulicht der Zellgranularität. Trägt man Vorwärts- und Seitwärtslichtstreuung in einem Punktdiagramm gegeneinander auf, so entsteht bei Auswertung einer Probe aus Leukozyten die typische Darstellung der drei Zellpopulationen aus Lymphozyten, Monozyten und Granulozyten (siehe Abbildung 1).
Im Rahmen einer fluoreszenzaktivierten durchflusszytometrischen Analyse werden Zellen mit Antikörpern markiert, an welche Fluoreszenzfarbstoffe gebunden sind. Bei Passage des Laserstrahls kommt es zu einer Fluoreszenzanregung, so dass dann mittels Photodetektoren neben der Streuung auch emittiertes Licht gemessen werden kann, und so die Expression von Oberflächenmolekülen quantifiziert werden kann.
Bei Verwendung von zwei oder mehr markierten Antikörpern liefern die verwendeten Auswerteprogramme Darstellungen jeweils zweier Fluoreszenzen gegeneinander als Punktdiagramme, wobei jeder Punkt einer Zelle entspricht. Zellen gleicher Eigenschaften bilden „Haufen“, die sich in der zweidimensionalen Abbildung als Wolken darstellen.

3.3.2 Das Auswertefenster

Da in der vorliegenden Untersuchung die Expression von verschiedenen Oberflächenmolekülen auf lymphozytären Zellen gemessen werden sollte, musste ein Auswertefenster gewählt werden, welches idealerweise nur Fluoreszenzsignale solcher Zellen in die Auswertung einfließen ließ. Dieses „Lymphozytengate“ ergab sich aus den Streulichteigenschaften dieser Zellen. Lymphozyten lassen sich von Monozyten und Granulozyten dadurch abgrenzen, dass sie die niedrigste Vorwärts- und Seitwärtslichtstreuung aufweisen und in der durch das Analyseprogramm gelieferten Darstellung dieser beiden Streulichteigenschaften

gegeneinander eine charakteristische Punktwolke ergeben. Durch Markierung dieser Wolke innerhalb des Auswerteprogramms wurde also ein „gate“ gesetzt, welches für die folgenden Fluoreszenzanalysen vorgab, nur Signale von Zellen mit diesen charakteristischen Streulichteigenschaften (also von Lymphozyten) zu verwerten. Die Güte dieses Auswertefensters beziehungsweise der Grad an Verunreinigung durch Zelldebris aus Erythrozyten und Thrombozyten und anderen leukozytären Zellen wurde mittels „Backgating“ überprüft (Loken 1990). Dabei macht man sich die Tatsache zunutze, dass das von allen leukozytären Zellen exprimierte Oberflächenmolekül CD45 auf Lymphozyten am stärksten exprimiert wird, das CD14-Antigen hingegen nur sehr schwach (im Unterschied zu Monozyten). Durch Erstellung eines solchen immunologischen Differentialblutbildes ergab sich ein Korrekturfaktor für die jeweils anschließenden Messungen. Dieser Vorgang wurde für jeden einzelnen Messansatz durchgeführt.
In den Ansätzen zur Messung der Expression von R0 und RA wurde ein Auswertefenster jeweils nur für CD4- beziehungsweise CD8-positive Zellen gewählt. Zur Analyse der T-Zellrezeptorverteilung wurde ein „gate“ für CD3-positive Zellen gewählt.

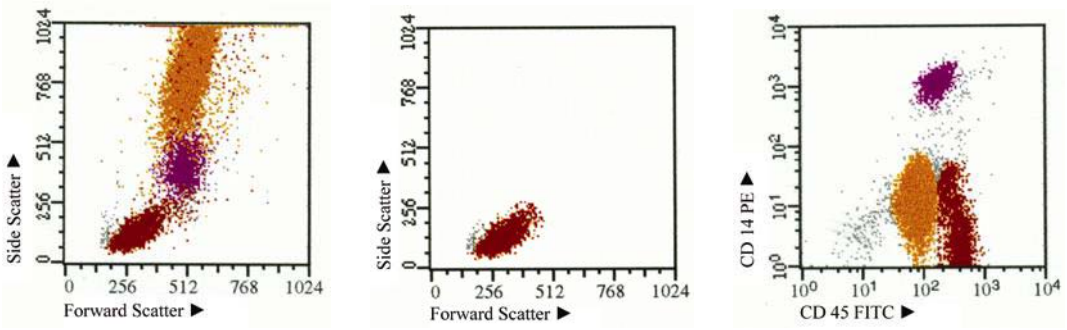


Abb. 1: Das Lymphozyten-„gate“
In der Abbildung ist links die typische Darstellung der drei leukozytären Zellreihen nach Messung der Vorwärts- und Seitwärtslichtstreuung durch das Durchflusszytometer zu sehen. Lymphozytäre Zellen zeichnen sich hier durch die niedrigste Streuung aus und bilden die Punktwolke, welche in der Mitte alleine zu sehen ist. Im immunologischen Differentialblutbild (rechte Abbildung), welches mittels Anfärbung durch fluoreszenzmarkierten CD14- und CD45-Antikörpern erstellt wird, entspricht diese idealerweise einer Punktwolke mit der höchsten CD45-und der niedrigsten CD14-Expression. Lymphozyten entsprechen der roten, Monozyten der violetten und Granulozyten der gelben Punktwolke in den obigen Darstellungen.

3.3.3 Aufbereitung der Proben

In der vorliegenden Arbeit wurden Lymphozytensubpopulationen mit Hilfe einer durchflusszytometrischen Dreifarbanalyse bestimmt.
Dazu wurden jeweils 100 µl peripheres venöses EDTA-antikoaguliertes Blut in 11 verschiedenen Ansätzen mit je drei unterschiedlichen fluoreszenzmarkierten monoklonalen Antikörpern versetzt, vermischt und anschließend 15 Minuten dunkel bei Raumtemperatur inkubiert.
Monoklonale Antikörper gegen folgende Oberflächeneigenschaften wurden verwendet: CD14/CD45, CD3, CD4, CD8, CD57, CD2, CD56, CD16, CD45R0, CD45RA, alpha/beta-, gamma/delta-T-Zellrezeptoren.
Die verwendeten Fluorochrome waren Fluorescein (FITC), Phycoerythrin (PE) und Peridinin-Chlorophyll-Protein (PerCP).
Nach der Inkubation wurden jedem Ansatz 2ml eines 1:10 mit Aqua dest. verdünnten Erythrozytenlyse-Reagenz (FACS™ Lyse Solution Becton Dickinson San Jose, CA) zugegeben, vermischt und erneut für 10 Minuten dunkel inkubiert.
Die Proben wurden dann bei 1100 U/min über 5 Minuten bei Raumtemperatur abzentrifugiert. Nach Abgießen des Überstandes wurden die zurückgebliebenen Granulozyten, Lymphozyten und Monozyten mit 3ml Phosphat-gepufferter isotonischer Natriumchlorid-Lösung (PBS Puffer, Dade Behring, Marburg) versetzt und vermischt. Nach erneutem Zentrifugieren bei 1100 U/min über 5 Minuten und Verwerfen des Überstandes wurden sie mit 500µl 0,5%formaldehydhaltiger FACS-Flow-Trägerflüssigkeit (Trägerflüssigkeit für Durchflusszytometer, Becton Dickinson, Heidelberg) versetzt und entweder sofort gemessen oder für höchstens 24 Stunden bei 4°C vor der Messung aufbewahrt.

3.3.4 Durchführung der Messungen

Die Proben wurden ausgewertet mit Hilfe des FACScan-Durchflusszytometers von Becton Dickinson. Dabei wurde die CELLQuest-Software (Becton Dickinson) zur Datenaufnahme und das PAINT-A-GATE-Programm (Becton Dickinson) zur Datenanalyse verwendet.
Zur Justierung der Instrumenteneinstellung, Einstellung der Fluoreszenzkompensation und Überprüfung der Instrumentenempfindlichkeit wurden die CaliBRITE™Beads der Firma Becton Dickinson entsprechend der Herstellerangaben verwendet.
Das Lymphozytengate wurde gemäß der durch Vorwärts- und Seitwärtslichtstreuung charakterisierten Population gewählt und überprüft beziehungsweise anschließend korrigiert mit Hilfe des Ansatzes aus CD45 und CD14.
Zur Ermittlung der Verteilung von R0 und RA wurden CD4- beziehungsweise CD8-Zellen gegatet, CD3-Zellen zur Ermittlung der T-Zell-Rezeptorverteilung auf diesen Zellen.
Jeweils 12000 Zellen wurden gemessen und deren Fluoreszenzmarkierung in Prozent durch das Auswerteprogramm angegeben.

Tabelle 1: Ansätze der Dreifarbanalyse

Tube-Nr.	**Fluoreszein-Isothiozyanat (FITC) -markierter Antikörper**	**Phycoerythrin (PE) -markierter Antikörper**	**Peridinin-Chlorophyll-Protein (PerCP) -markierter Antikörper**	
1.	CD45 (BD)	CD14 (BD)	-	Immunol. Differential-Blutbild
2.	IgG1 (BD)	IgG2a (BD)	IgG1 (BD)	Kontrolle der BD-Antikörper
3.	IgG2a (Caltag)	IgG1 (Immunotech)	IgG1 (BD)	Kontrolle der übrigen Antikörper
4.	CD4 (BD)	CD8 (BD)	CD3 (BD)	T-Zellen
5.	CD57 (BD)	CD8 (BD)	CD3 (BD)	CD57-Subpopulation
6.	CD2 (BD)	CD16+CD56 (BD)	CD3 (BD)	NK-Zellen
7.	CD45RO (Caltag)	CD45RA (Immunotech)	CD4 (BD)	Memory/Naive T-Helferzellen
8.	CD45RO (Caltag)	CD45RA (Immunotech)	CD8 (BD)	Memory/Naive Zytotoxische T-Zellen
9.	HLA-DR (BD)	CD19 (BD)	CD3 (BD)	B-,T-Zellen (aktiviert)
10.	CD5 (BD)	CD19 (BD)	CD3 (BD)	CD5-Subpopulation
11.	TCR alpha/beta (BD)	TCR gamma/delta (BD)	CD3 (BD)	T-Zell-Rezeptoren

Legende:
Die Tabelle führt die Zusammensetzung der einzelnen Messansätze (Tubes) auf. In jedem Ansatz wurden drei mit verschiedenen Fluoreszenzfarbstoffen markierte Antikörper unterschiedlicher Hersteller (Caltag CA, USA; Immunotech Ca; Becton Dickinson, Heidelberg) gegen die genannten Antigene verwendet.

3.4. Weitere Laborparameter und Diagnostik

Die absoluten peripheren Leukozyten- bzw. Lymphozytenzahlen wurden mit Hilfe eines Coulter Counters (MaxM, Coulter®, Hamburg) im Zentrallabor des Klinikums bestimmt. So konnten durch Multiplikation mit den durch die FACS-Analyse bestimmten prozentualen Werten die Absolutzahlen für die jeweiligen Subpopulationen errechnet werden.
Serum-Kreatinin wurde mit der modifizierten Jaffe-Reaktion gemessen.

Die glomerulären Filtrationsraten beziehungsweise Kreatininclearances wurden nach der Schwartz-Formel errechnet (Schwartz et al. 1976 und 1984, Brion et al. 1986):

Kretininclearance (ml/min/1,73m2)=(k)x(Größe in cm)/Serum-Kreatinin
k= 0,33 für Frühgeborene bis zum Alter von einem Jahr
0,45 für Termingeborene bis zum Alter von einem Jahr
0,55 für Kinder zwischen einem und 18 Jahren

3.5. Computergestützte statistische Auswerteverfahren

Von den betreffenden Zellpopulationen wurden absolute und relative Werte erhoben und zunächst eine deskriptive Statistik erstellt, die Mittelwert, Median, Standardabweichung, Maximum und Minimum umfasste. Für den Gruppenvergleich wurden die zu vergleichenden Variablen zunächst mit Hilfe des Kolmogorov-Smirnov-Anpassungstests auf Normalverteilung geprüft. Sofern diese gegeben war, wurde der 2-Stichproben t-Test angewandt, andernfalls der Mann-Whitney U-Test und jeweils zwei Gruppen (also PoAk- vs. BI- , PoAk vs. Kontroll- und BI- vs. Kontrollgruppe) gegeneinander verglichen. Das Signifikanzniveau wurde bei $p<0,05$ angesetzt. (Dazu wurde das Statistikprogramm SPSS verwendet).

4. Ergebnisse

4.1 Krankengut

Im Rahmen dieser Querschnittsstudie wurden 21 zwischen 1987 und 1997 transplantierte pädiatrische Patienten mit funktionierendem Transplantat, die sich in ambulanter Kontrolle befanden, untersucht.
Zum Zeitpunkt der Untersuchung lag die Nierentransplantation durchschnittlich 3,7 Jahre zurück.
In der initial mit polyklonalen depletierenden Antilymphozytenantikörpern behandelten Patientengruppe (PoAk) betrug die mediane kumulative Dosis von Thymoglobulin® 210 mg beziehungsweise 4,34 mg/kg/KG. Thymoglobulin® war über einen medianen Zeitraum von 4 Tagen gegeben worden.
Zum Zeitpunkt der Untersuchung erhielten noch sieben Patienten der PoAk-Gruppe und vier der BI-Gruppe Azathioprin. Fünf Patienten erhielten aufgrund von Steroidtoxizität kein Kortikoidpräparat mehr. Dies betraf zwei Patienten der PoAk- und drei der BI-Gruppe. Alle Patienten hatten eine stabile Transplantatfunktion.
Der Transplantation war eine mittlere Dialysedauer von 19 Monaten in der PoAk- und 15 Monaten in der BI-Gruppe vorangegangen. In vier Fällen handelte es sich um die zweite, in allen übrigen um die erste Transplantation. Die mediane Anzahl von HLA-missmatches war in beiden Gruppen ähnlich, sie betrug 2,2 in der PoAk- und 1,5 in der BI-Gruppe. Die kalte Ischämiezeit betrug durchschnittlich 18,7 Stunden in der PoAk und 12,3 Stunden in der BI-Gruppe. Für die warme Ischämiezeit ergaben sich mittlere Werte von 46 und 45 Minuten für die beiden Gruppen. Komplikationen fanden sich in beiden Gruppen wie folgt: In der PoAk-Gruppe traten akute tubuläre Nekrosen in einem Fall am ersten und in einem weiteren Fall am 22. postoperativen Tag auf. In der BI-Gruppe fand sich ein Fall am achten postoperativen Tag. Reversible Abstoßungsreaktionen ereigneten sich in fünf und drei Fällen. In beiden Gruppen trat ein Fall einer CMV-Infektion auf. Weitere Komplikationen umfassten in der PoAk-Gruppe eine Lymphozele, eine Ureterstenose, eine Nierenarterienstenose, eine Candidasepsis, einen Harnwegsinfekt, einen Krampfanfall und eine Nervus-Femoralis-Läsion. In der BI-Gruppe kam es in einem Fall zu einer abdominellen Blutung, einer Nierenkelchsystemblutung, einem Krampfanfall, einer Pneumonie, einem Lungenödem, einer subglottischen Stenose, einer Nierenarterienstenose sowie einem Fall von Transplantatglomerulonephritis. Zum Zeitpunkt der Untersuchung waren alle Patienten infekt- und dialysefrei.
Weitere klinische und biochemische Daten sind der Tabelle 2 zu entnehmen.

Tabelle 2: Patientendaten

	PoAk	BI
N	10	11
Alter bei Transplantation [Jahre]	11,3	12,3
Alter zum Zeitpunkt der Untersuchung [Jahre]	13,4 (9,3 – 22,7)	16,3 (9,8 – 28,8)
Zeit seit Transplantation [Tage]	790 (120 - 1327)	1472 (231 - 4692)
Serum-Kreatinin [mg/dl]	1,2	1,3
Glomeruläre Filtrationsrate [ml/min/1,73m²]	81 (54– 123)	82 (27 – 122)
Aktuelle Cyclosporindosis [mg/kg]	5,06 (2,5 – 7,5)	2,67 (1,6 – 6,1)
Aktuelle Dosis Methylprednisolon [mg/m² KOF]	3,1 (0 – 4)	3,2 (0 – 6)

Legende:
Angaben zu Patientendaten jeweils als Median sowie Minimum und Maximum

4.2 Messergebnisse

Sämtliche Absolut- und Relativwerte sowie p-Werte aus den Gruppenvergleichen sind in der Tabelle am Ende dieses Kapitels aufgeführt. Gezeigt werden im Folgenden zunächst die Ergebnisse der Gruppenvergleiche der ersten Messung, wobei signifikante Unterschiede als Boxplots dargestellt sind. (Die „Box“ umfasst die mittleren 50% der Verteilung, reicht also vom unteren bis zum oberen Quartil. Der Median wird durch einen waagrechten Strich verdeutlicht. Zwei Linien ober- und unterhalb geben die Spannweite der Verteilung an).
Es folgt jeweils ein Beispiel für jeden Messansatz aus den FACS-Analysen.
Schließlich sind die Werte für die wichtigsten T-Zellmarker noch im Vergleich zwischen erster und zweiter Messung als Säulendiagramme dargestellt.

4.3 Lymphozyten

Die Anzahl der Lymphozyten unterscheidet sich nicht signifikant im Vergleich der drei Gruppen. Sie beträgt im Mittel 2390 Zellen/µl in der PoAk-, 2327 Zellen/µl in der BI- und 2435 Zellen/µl in der Kontrollgruppe (siehe auch Tabelle 3).

4.4 T-Zellen

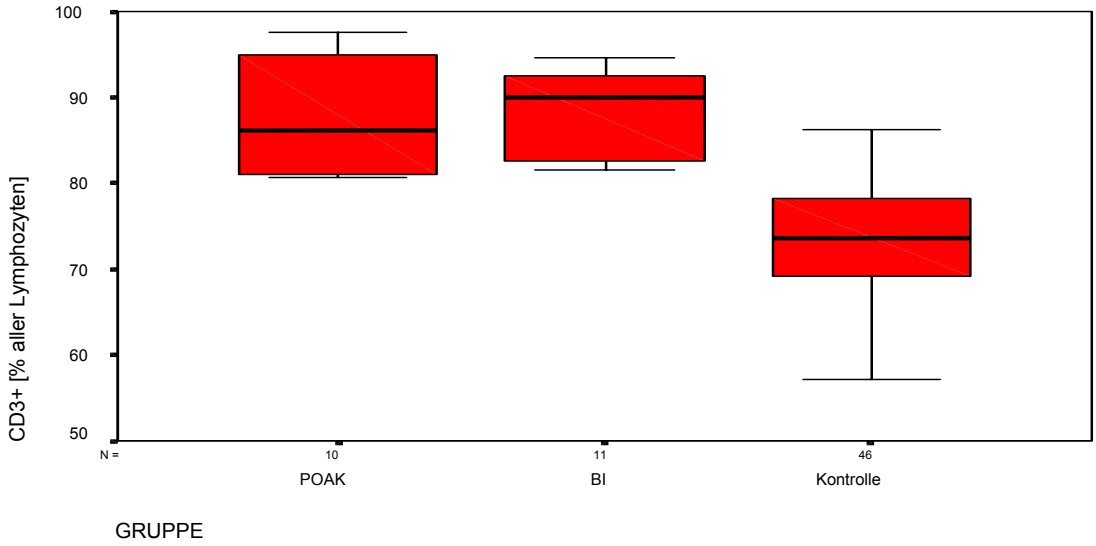


Abb. 2: CD3+Zellen

Es ergaben sich signifikant höhere Anteile von CD3 positiven Zellen am Gesamtlymphozytenpool bei den transplantierten Patienten im Vergleich mit der Kontrollgruppe. Zwischen der PoAk- und der BI-Gruppe lässt sich kein signifikanter Unterschied zeigen. Für die absoluten Zellzahlen lässt sich dieser Unterschied statistisch nicht nachweisen (die medianen Werte sind 2328, 1930 und 1712 Zellen/µl).

4.4.1 T-Helferzellen

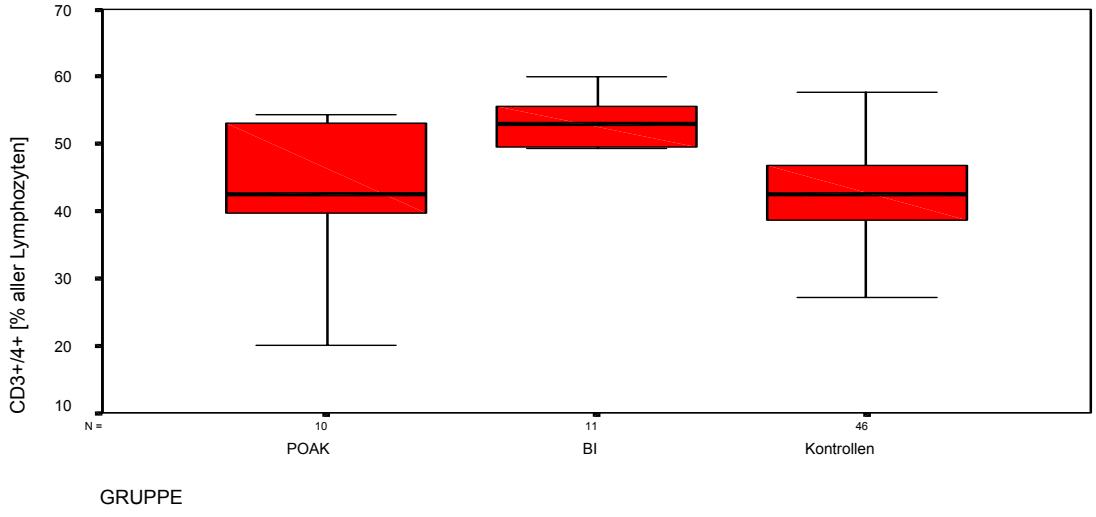


Abb. 3: CD3+/4+Zellen

Für die CD4 positiven T-Helferzellen zeigt sich ein signifikanter Unterschied zwischen der PoAk- und der BI-Gruppe, ebenso zwischen der BI- und der Kontrollgruppe. Die absoluten Zellzahlen, für die sich ein Unterschied statistisch nicht darstellen lässt, betragen im Median 1059, 1145 und 997 Zellen/µl.

4.4.2 Zytotoxische T-Zellen

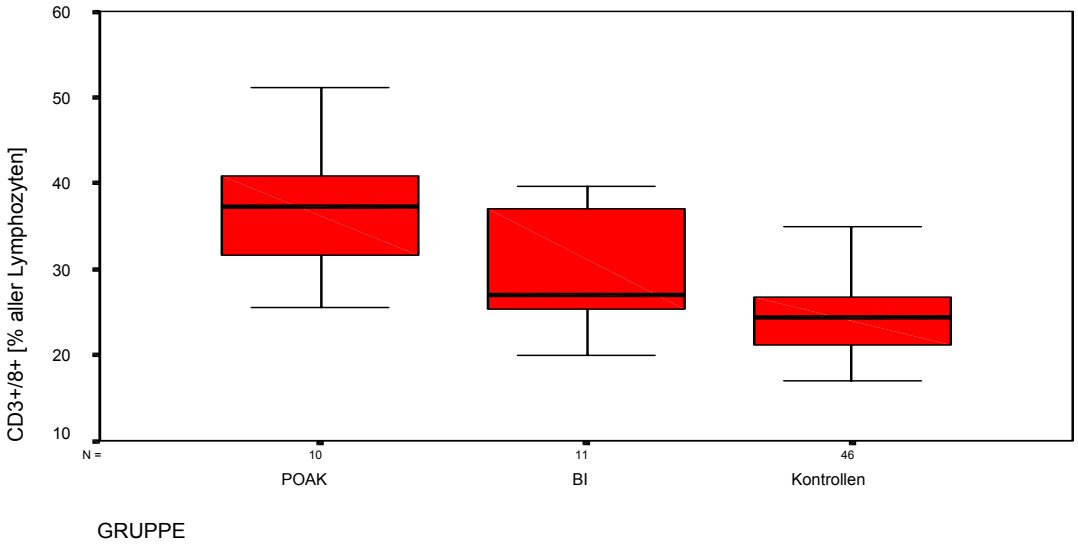


Abb. 4: CD3+/8+Zellen

Bei den CD8 positiven T-Zellen lässt sich ein signifikanter Unterschied im Vergleich aller drei Gruppen zeigen. Die Zellpopulation ist am höchsten in der PoAk-Gruppe und am niedrigsten in der Kontrollgruppe vertreten.

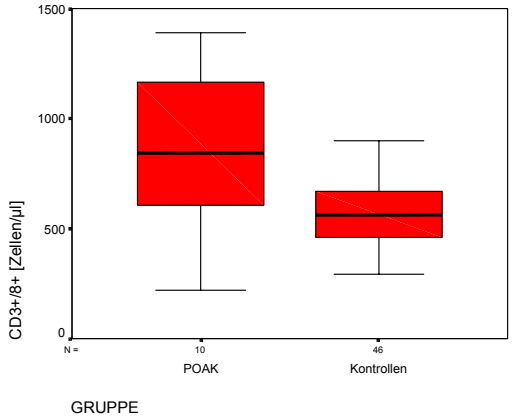


Abb. 5: CD3+/8+Zellen pro µl

Die absoluten Zellzahlen pro Mikroliter betragen im Median 852, 668 und 574. Hier lässt sich nur ein Unterschied zwischen Kontroll- und und PoAk-Gruppe statistisch nachweisen.

4.4.3 Doppelt positive T-Zellen

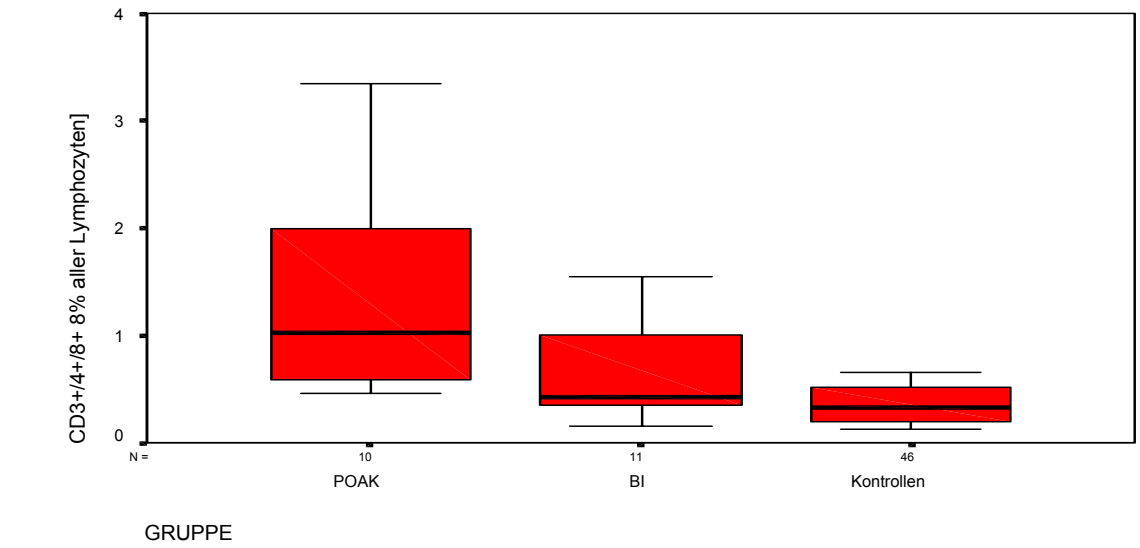


Abb. 6: CD3+/4+/8+

Für die doppelt positiven T-Lymphozyten (CD4 und CD8 positiv) lassen sich signifikante Unterschiede zwischen der PoAk- und der Kontrollgruppe sowie zwischen der PoAk- und der BI-Gruppe aufzeigen.
Für die absoluten Zellzahlen lässt sich ein signifikanter Unterschied zwischen PoAk- und Kontrollgruppe zeigen. Die Zellzahlen betragen in der Reihenfolge PoAk-, BI-, Kontrollgruppe im Median 18, 9, 7 pro Mikroliter.

4.4.4 CD4:CD8-Quotient

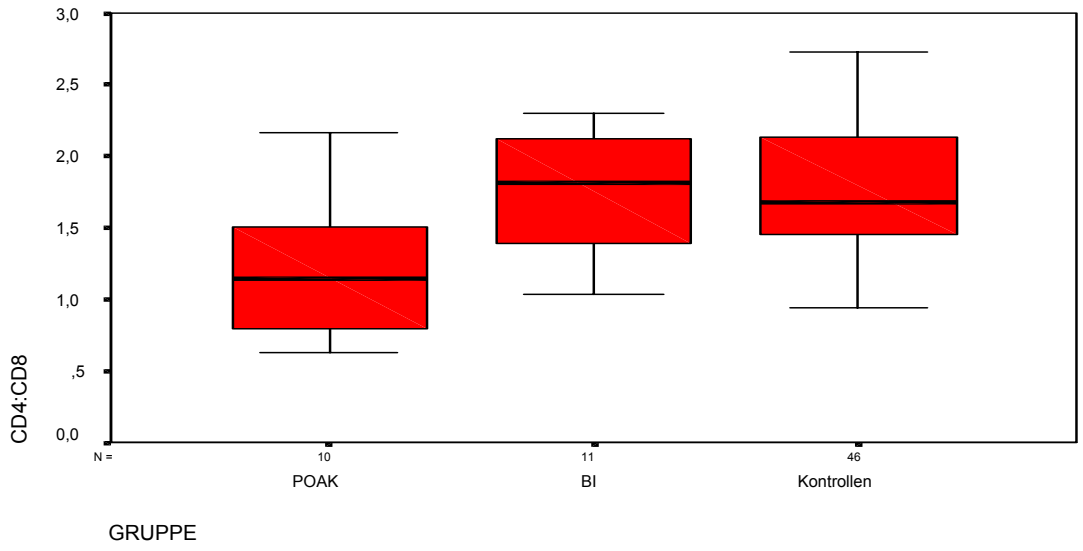


Abb. 7: CD4+:CD8+Quotient

Der Quotient aus CD4 positiven und CD8 positiven T-Zellen ist in der PoAk-Gruppe signifikant erniedrigt gegenüber BI- und Kontrollgruppe, während sich zwischen BI- und Kontrollgruppe kein Unterschied findet.

4.4.5 CD57 positive T-Zellen

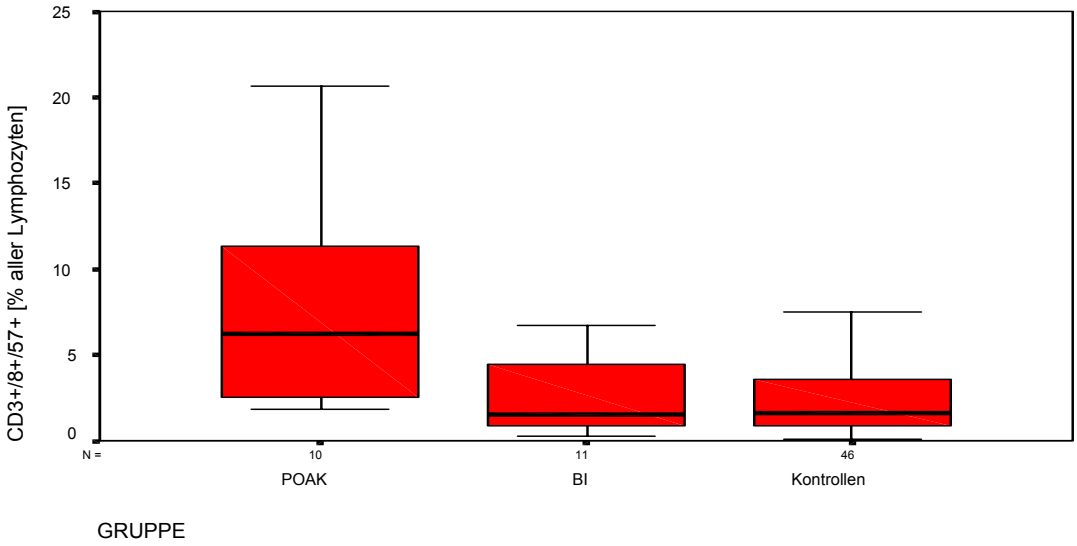


Abb. 8: CD3+/8+/57+

Die CD57 positiven zytotoxischen T-Zellen finden sich in der PoAk-Gruppe signifikant überrepräsentiert sowohl im Vergleich mit der BI- als auch der Kontrollgruppe, während sich zwischen Kontroll- und BI-Gruppe kein Unterschied zeigen lässt.

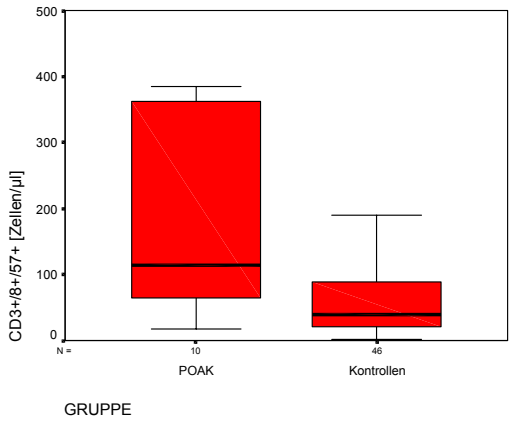


Abb. 9: CD3+/CD8+/CD57+ pro µl

Für die absoluten Zellzahlen, die im Median 115 Zellen/µl für die PoAk-, 30 Zellen/µl für die BI- und 40 Zellen/µl für die Kontrollgruppe betragen, lässt sich statistisch nur ein signifikanter Unterschied zwischen PoAk und Kontrollgruppe zeigen.

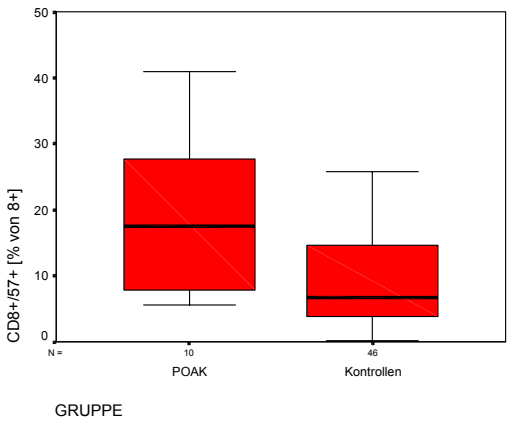


Abb. 10: Anteil aller CD8+Zellen mit CD57+

Für die CD57 positiven Zellen als Anteil der zytotoxischen T-Zellen dargestellt findet sich ein signifikanter Unterschied zwischen PoAk- und Kontrollgruppe.

4.4.6 CD45R0 und CD45RA auf T-Helferzellen

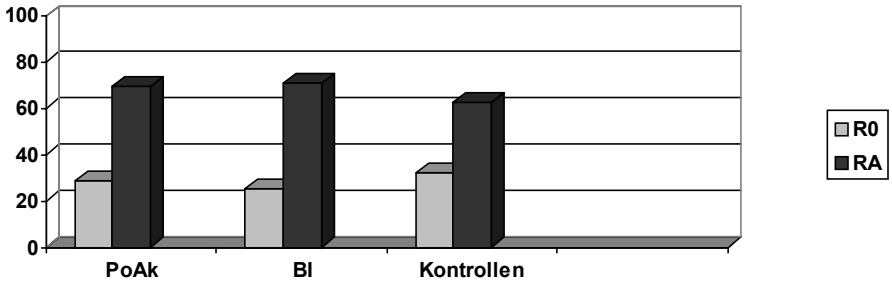


Abb. 11: R0 und RA auf CD4-positiven T-Lymphozyten

Hinsichtlich der prozentualen Verteilung von CD45R0 und CD45RA auf T-Helferzellen lässt sich kein signifikanter Unterschied zeigen. Die medianen Werte betragen 28 und 69 in der PoAk-, 25 und 71 in der BI- sowie 32 und 62 Prozent in der Kontrollgruppe.

4.4.7 CD45R0 und CD45RA auf zytotoxischen T-Zellen

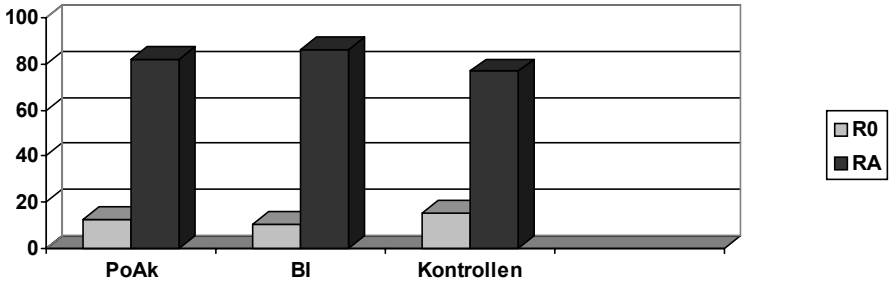


Abb. 12: R0 und RA auf CD8-positiven T-Lymphozyten

Für die prozentuale Verteilung von CD45R0 und CD45RA auf CD8+Zellen (zytotoxischen T-Zellen) ergeben

sich mediane Werte von 13 und 82 in der PoAk-, 11 und 86 in der BI- sowie 16 und 77 Prozent in der Kontrollgruppe.
Statistisch signifikant sind folgende Unterschiede:

4.4.7.1 CD45R0 auf CD8+Zellen

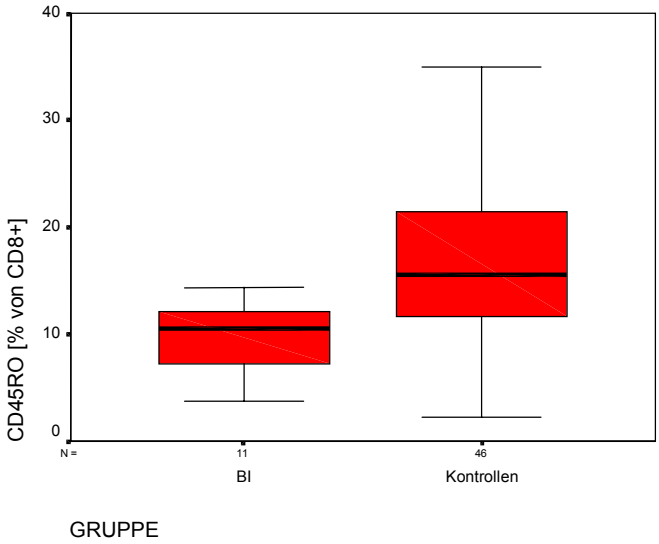


Abb. 13: CD45R0 auf CD8+Zellen

Die Expression von CD45R0 auf CD8+Zellen ist in der BI-Gruppe signifikant niedriger als in der Kontrollgruppe

4.4.7.2 CD45RA auf CD8+Zellen

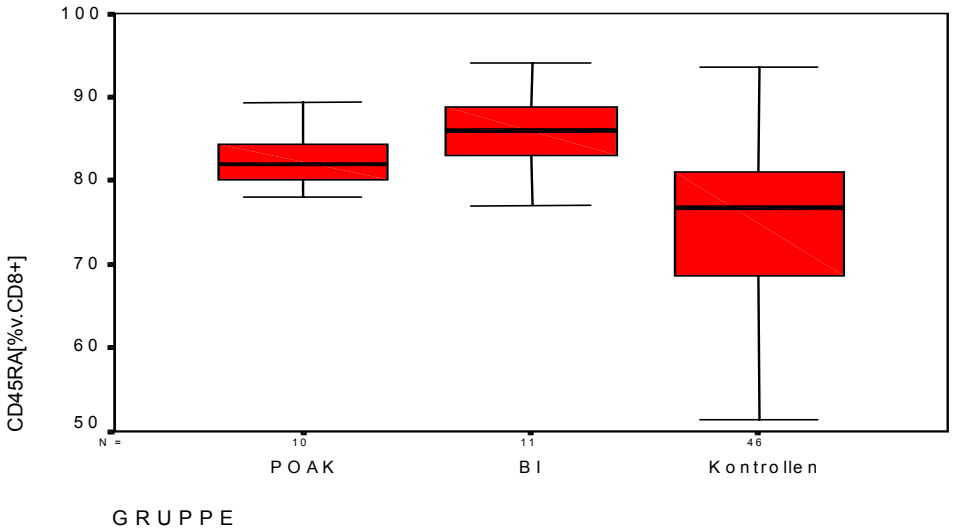


Abb. 14: CD45RA auf CD8+Zellen

Sowohl in der PoAk- als auch in der BI-Gruppe ist die Expression von CD45RA auf CD8+Zellen signifikant höher als in der Kontrollgruppe.

4.4.8 T-Zellen mit NK-Markern

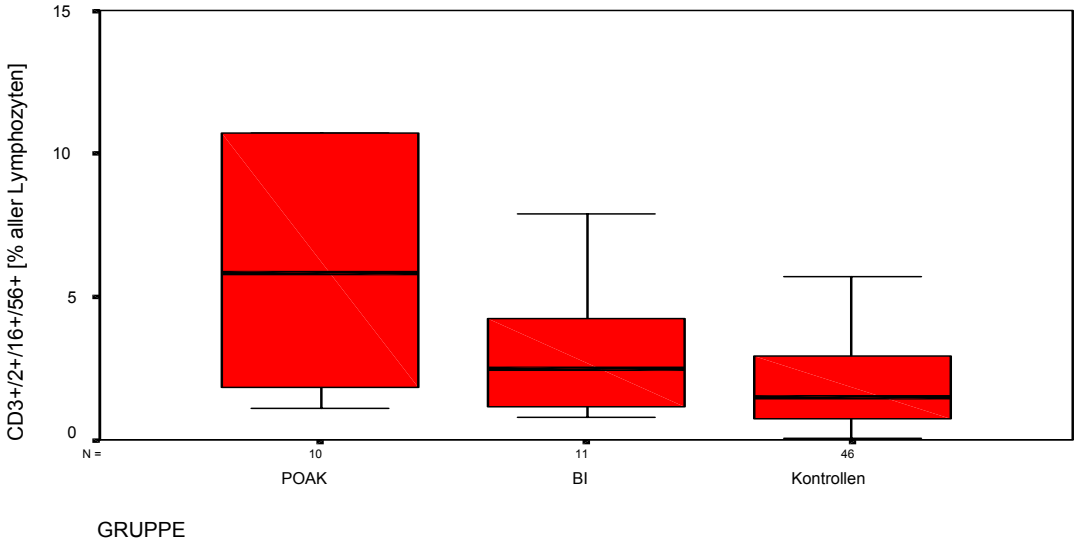


Abb. 15: CD3+/2+/16+/56+

Für die CD16 und CD56 positiven T-Zellen lässt sich ein signifikanter Unterschied zwischen PoAk und Kontrollgruppe zeigen.

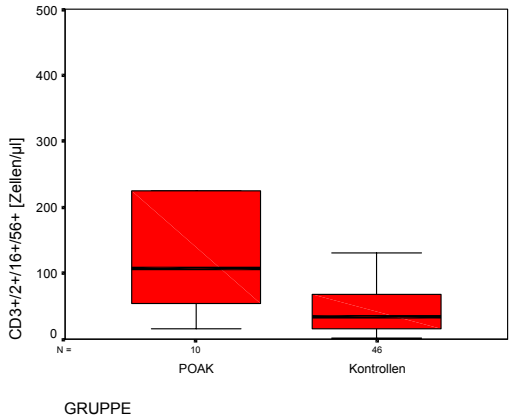


Abb. 16: CD3+/2+/16+/56+ pro µl

Dieser Unterschied stellt sich auch im Vergleich der absoluten Zellzahlen dar, bei medianen Werten von 107, 29 und 34 Zellen/µl in der Reihenfolge PoAk-, BI- und Kontrollgruppe.

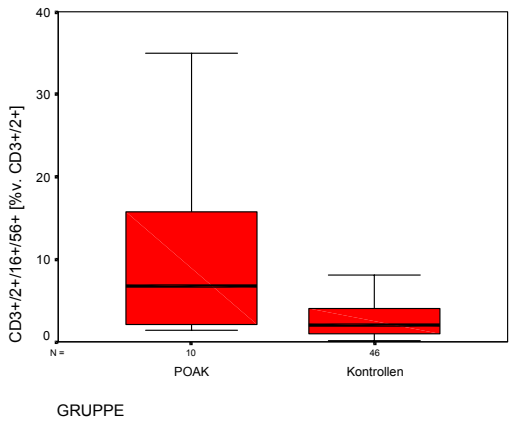


Abb. 17: Anteil CD16+/56+ an CD3+/2+

Beim Vergleich der CD16 und CD56 positiven T-Lymphozyten findet die für die PoAk- und die Kontrollgruppe ein signifikanter Unterschied.

4.5 Natürliche Killer Zellen

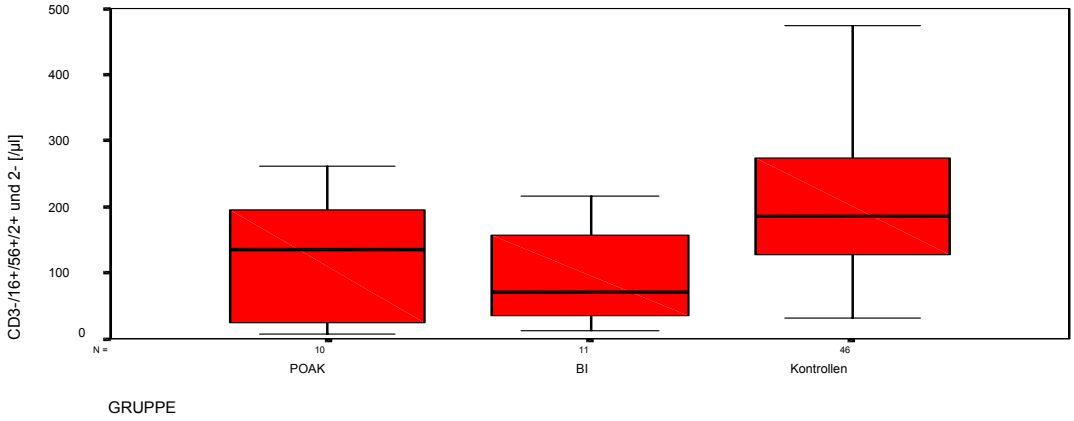


Abb. 18: NK-Zellen

Für die Natürlichen Killerzellen als Prozentanteil aller Lymphozyten lässt sich kein signifikanter Unterschied zeigen, die Werte betragen im Median 5%, 2% und 8% für die PoAk-, BI- und Kontrollgruppe.
Im Vergleich der absoluten Zellzahlen finden sich signifikante Unterschiede zwischen PoAk- und Kontrollgruppe sowie zwischen BI- und Kontrollgruppe.

4.6 B-Lymphozyten

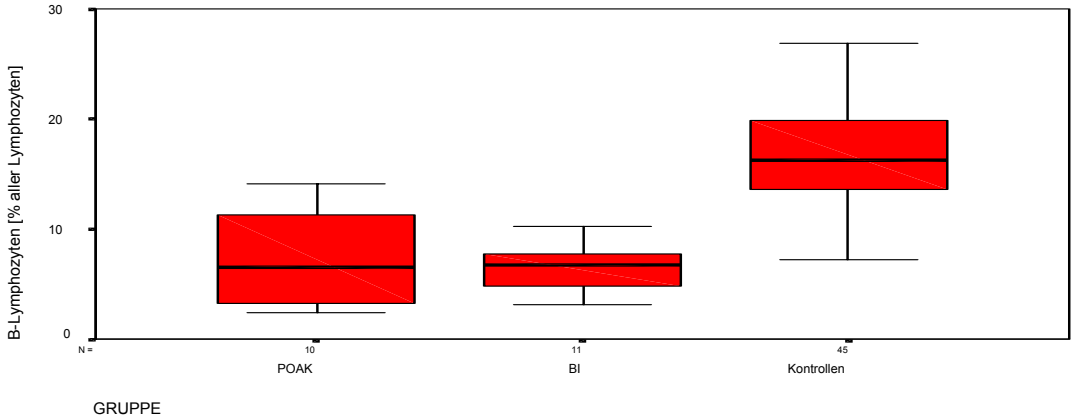


Abb. 19: B-Lymphozyten

Die beiden Transplantiertengruppen weisen sigifikant niedrigere B-Zellzahlen als die Kontrollen auf.

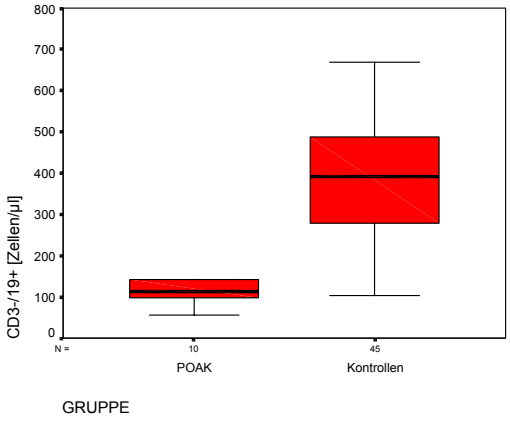


Abb. 20: B-Lymphozyten pro µl

Für die absoluten Zellzahlen, die im Median 112 Zellen/µl in der PoAk-, 140 Zellen/µl in der BI- und 392 Zellen/µl in der Kontrollgruppe betragen, ist der Unterschied zwischen PoAk- und Kontrollgruppe signifikant.

4.6.1 B-Lymphozyten mit HLA-DR-Expression

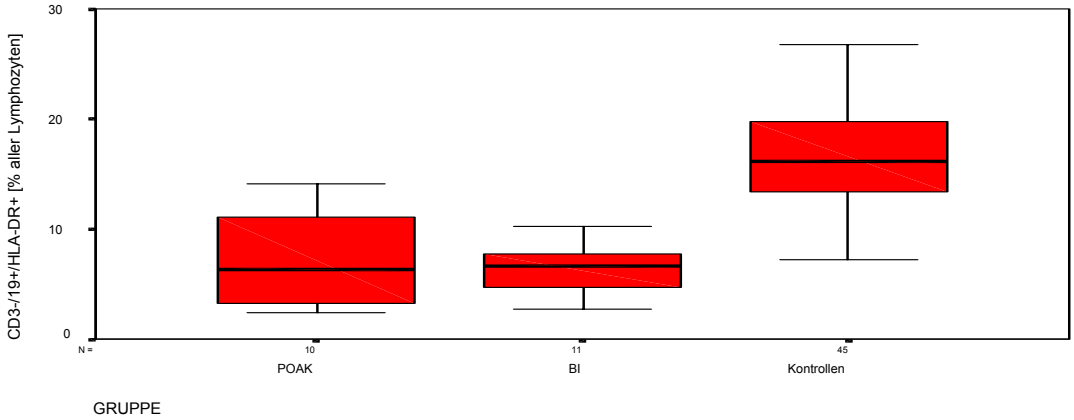


Abb. 21: B-Lymphozyten mit HLA-DR

Der Aktivierungsmarker HLA-DR fand sich auf B-Zellen der Transplantiertengruppen signifikant niedriger exprimiert als in der Kontrollgruppe.

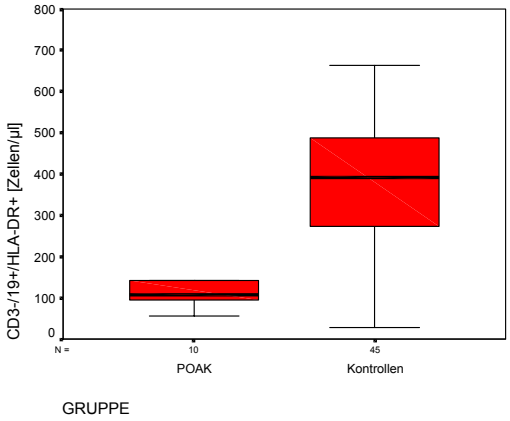


Abb. 22: B-Lymphozyten mit HLA-DR pro µl

Für die absoluten B-Zellzahlen mit HLA-DR-Expression findet sich ein signifikanter Unterschied zwischen PoAk- und Kontrollgruppe mit medianen Werten von 109, 138 und 391 Zellen/µl für die PoAk-, BI- und Kontrollgruppe.

4.6.2 B-Zellen mit CD5-Expression

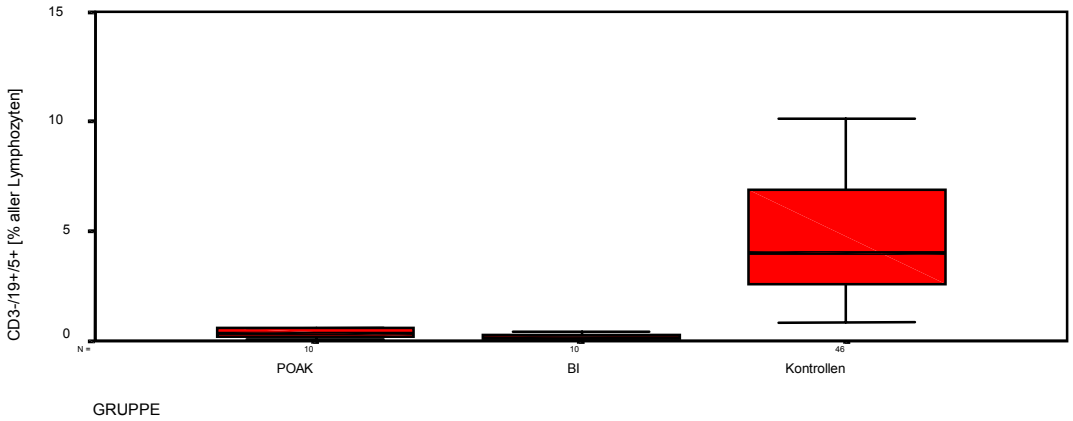


Abb. 23: B-Lymphozyten mit CD5+

CD5 positive B-Zellen finden sich unter den Lymphozyten signifikant weniger in der PoAk- gegenüber der Kontrollgruppe sowie in der BI- gegenüber der Kontrollgruppe.

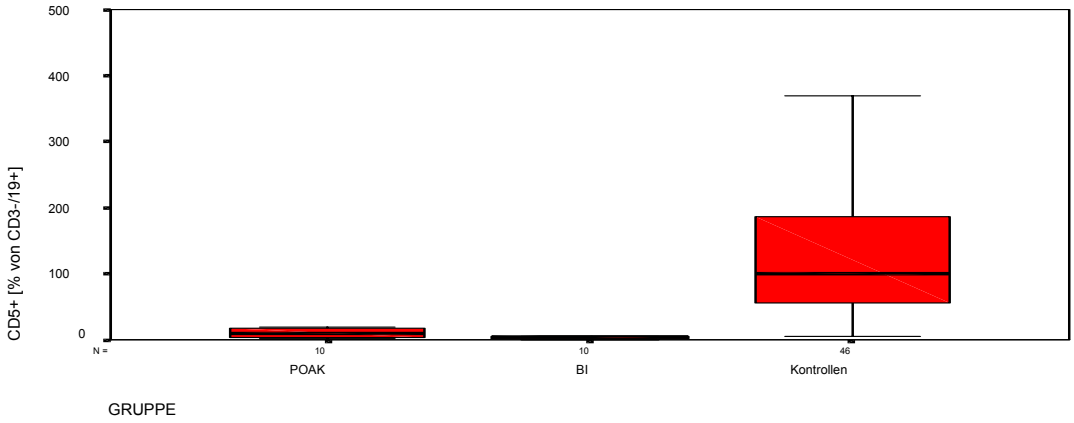


Abb. 24: Anteil der B-Lymphozyten mit CD5+

Die gleichen Verhältnisse lassen sich auch für die absoluten Zellzahlen zeigen, die im Median 10, 4 und 101 Zellen/µl betragen.

4.7 T-Zell-Rezeptorverteilung

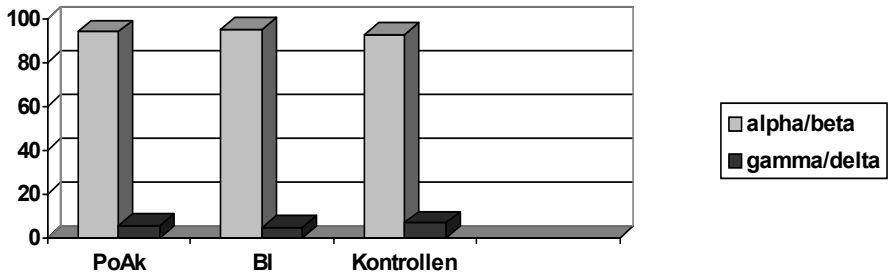


Abb. 25: alpha/beta- und gamma/delta-Rezeptoren auf T-Zellen

Hinsichtlich der medianen prozentualen Verteilungen von alpha/beta- beziehungsweise gamma/delta-Rezeptoren auf CD3-positiven Lymphozyten finden sich keine signifikanten Unterschiede im Vergleich der drei Gruppen.

4.8 Beispiele aus den FACS-Analysen der PoAk-Gruppe

4.8.1 T-Zellen

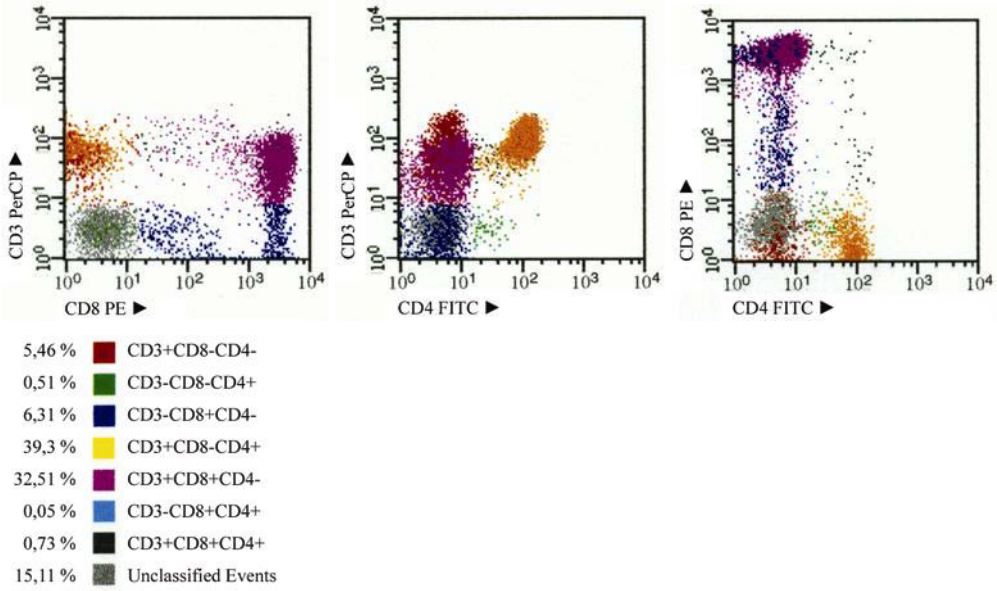


Abb. 26: Messansatz mit Antikörpern gegen CD3, CD4 und CD8.
In der Abbildung ist die Darstellung einer FACS-Analyse mit Antikörpern gegen CD3, CD4 und CD8 zu sehen. Das Verhältnis von CD4 zu CD8 ist erniedrigt.

4.8.2 CD57-Subpopulation

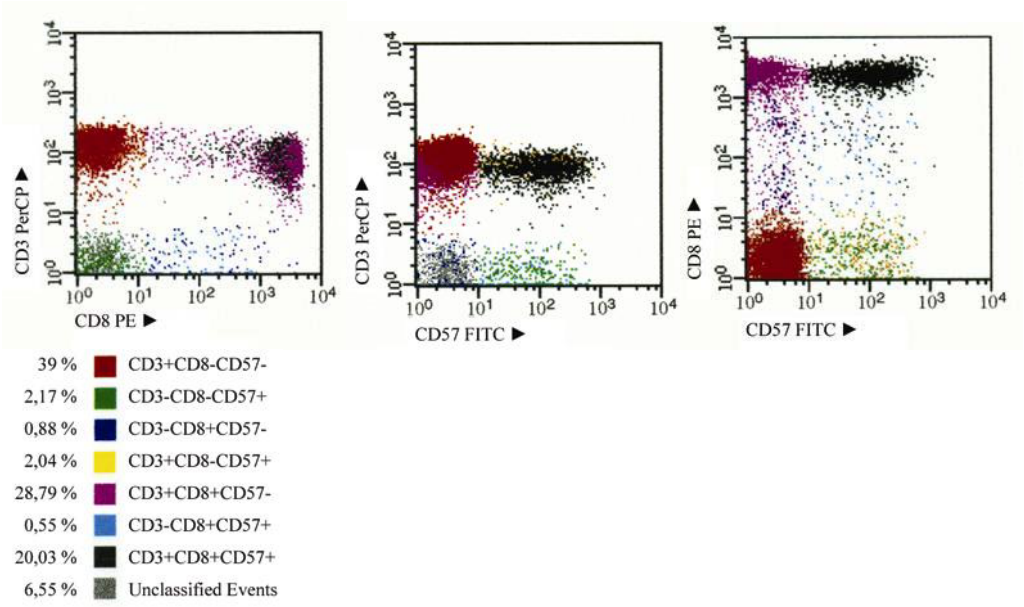


Abb. 27: Messansatz mit Antikörpern gegen CD3, CD8 und CD57.

In der Darstellung ist eine FACS-Analyse mit Antikörpern gegen CD3, CD8 und CD57 zu sehen. Es handelt sich um die Probe eines Patienten aus der PoAk-Gruppe mit einem überdurchschnittlich hohen Anteil an CD57 exprimierenden CD3+/8+Zellen.

4.8.3 NK-Zellen

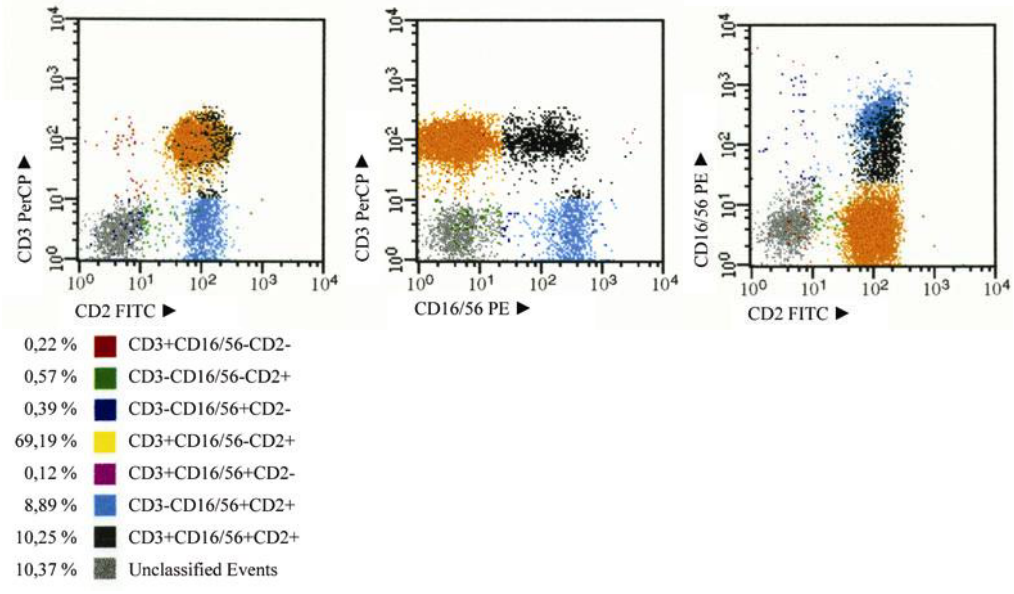


Abb. 28: Messansatz mit Antikörpern gegen CD3, CD2 und CD16/56

Beispiel eines Patienten mit einem überdurchschnittlich hohen NK-Zellanteil.

4.8.4 Memory/Naive T-Helferzellen

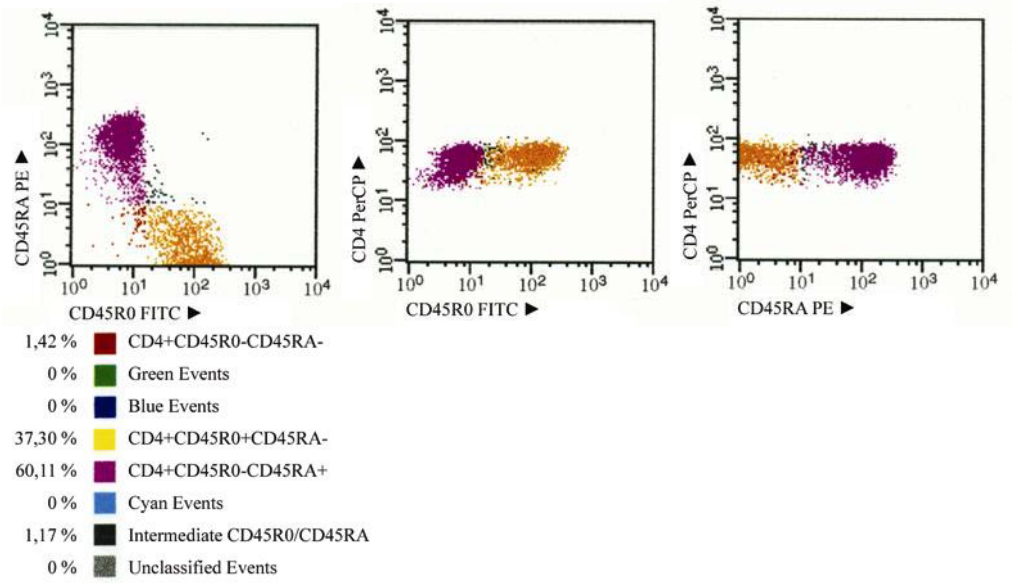


Abb. 29: Messansatz mit Antikörpern gegen CD45R0, CD45RA und CD4

Dargestellt ist die typische „keulenförmige“ Aufspaltung in naive und Memory-CD4-Zellen.

4.8.5 Memory/Naive Zytotoxische Zellen

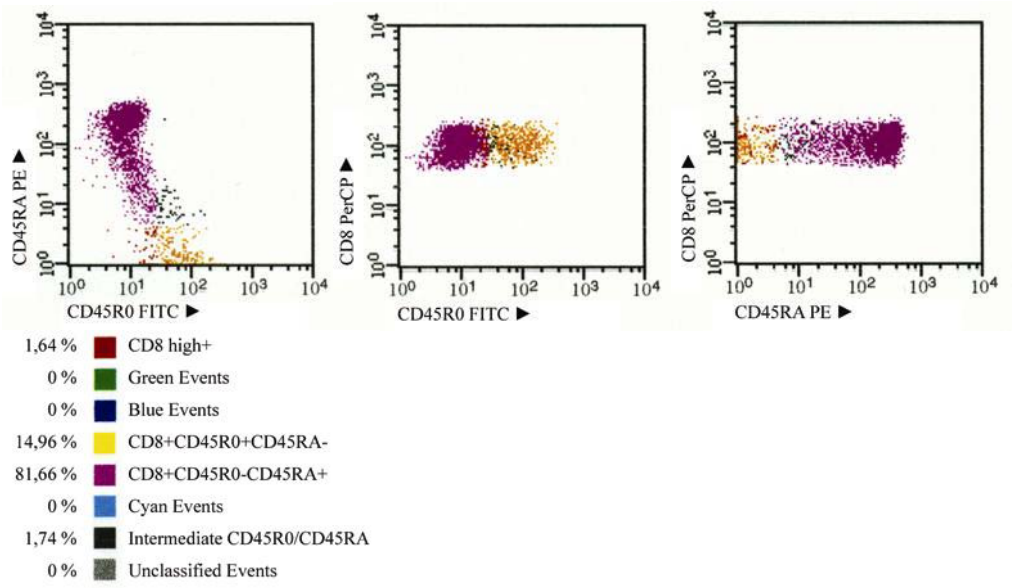


Abb. 30: Messansatz mit Antikörpern gegen CD45R0, CD45RA und CD8

Dargestellt ist das Beispiel eines Patienten mit einem typischen CD45RA- beziehungsweise CD45R0-Expression.

4.8.6 Aktivierte B- und T-Zellen

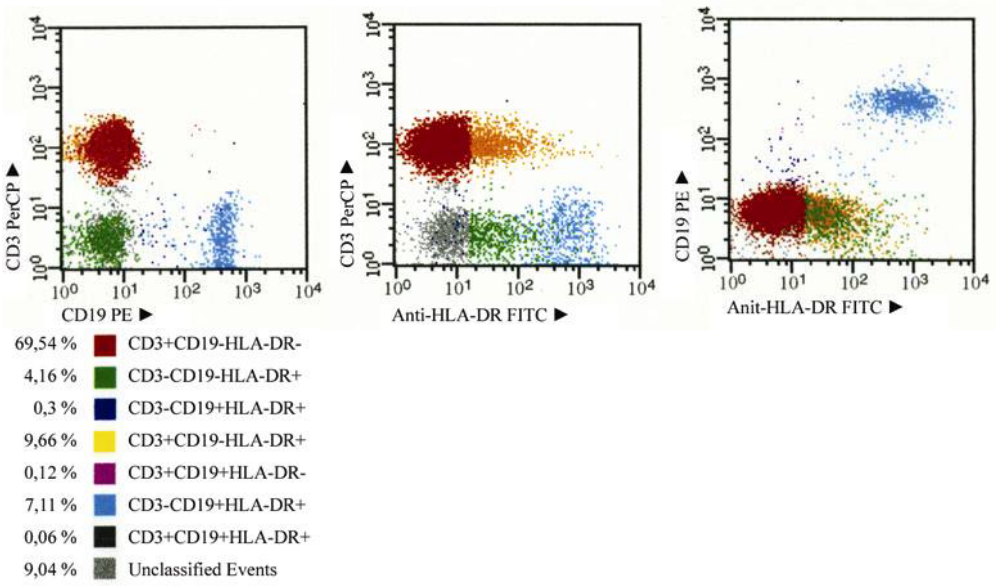


Abb. 31: Messansatz mit Antikörpern gegen CD3, CD19 und HLA-DR

Darstellung der Expression des Aktivierungsmarkers HLA-DR auf T- und B-Zellen.

4.8.7 CD5positive B-Zellen

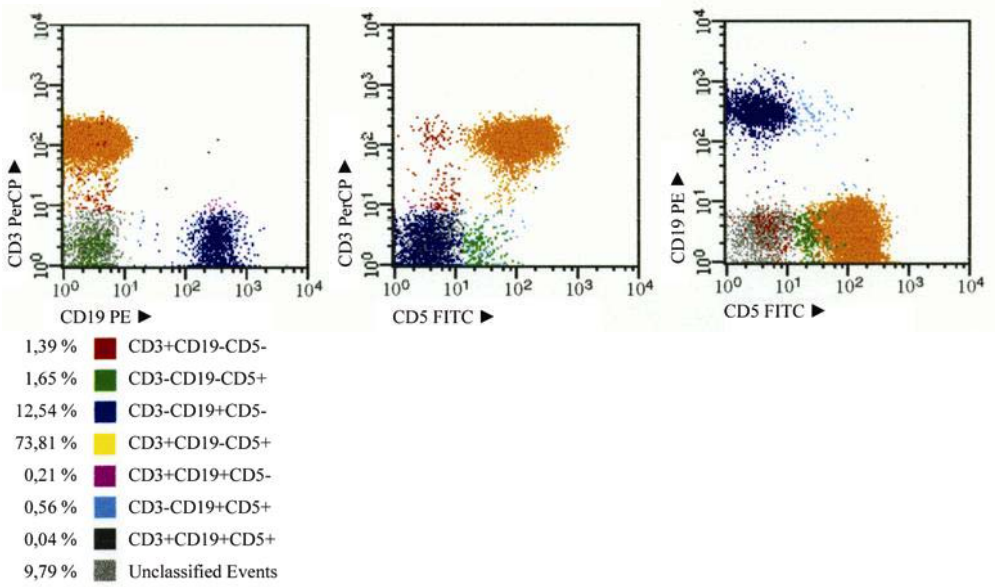


Abb. 32: Messansatz mit Antikörpern gegen CD3, CD19 und CD5

Darstellung der Expression des CD5-Markers auf T- und B-Zellen.

4.8.8 T-Zell-Rezeptoren

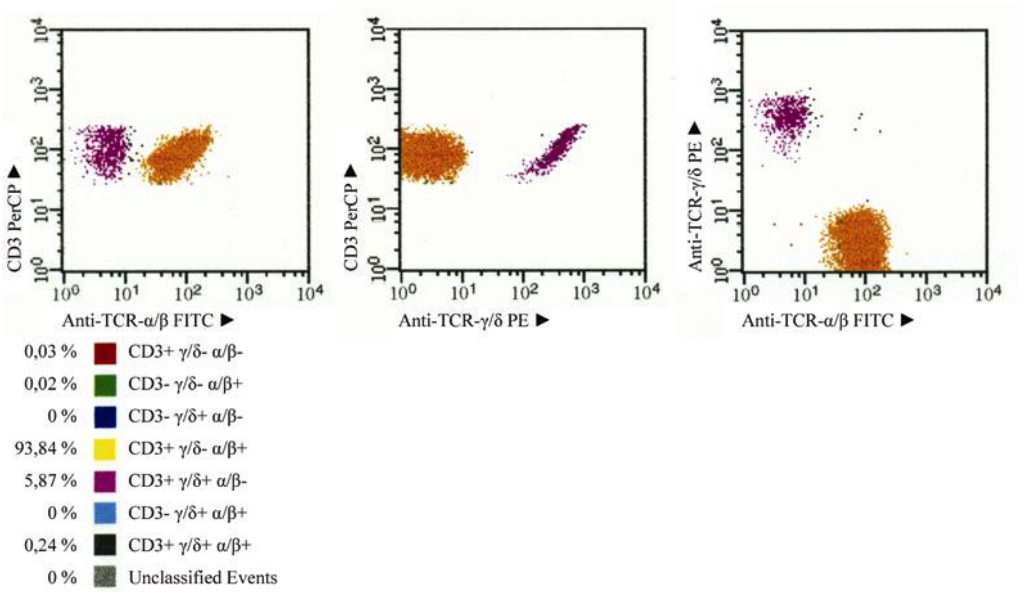


Abb. 33: Messansatz mit Antikörpern gegen CD3, gamma/delta- und alpha/beta-T-Zellrezeptoren
Zu sehen ist die typische Darstellung der T-Zellrezeptorverteilung.

4.9 T-Zell-Subpopulationen der ersten und zweiten Messung

4.9.1 T-Zellen

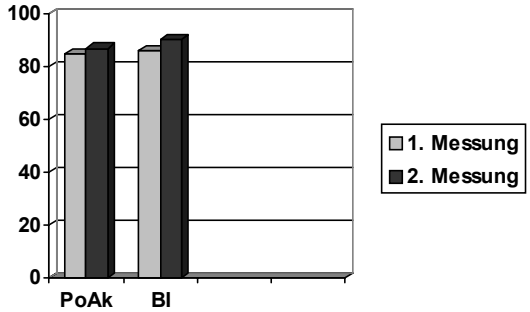


Abb. 34: CD3 positive T-Zellen im Vergleich zwischen erster und zweiter Messung

Hinsichtlich der Anteile CD3-positiver Zellen am Gesamtlymphozytenpool lässt sich kein Unterschied für die Werte innerhalb der einzelnen Gruppen im Verlauf zeigen.

4.9.2 T-Helferzellen und zytotoxische T-Zellen

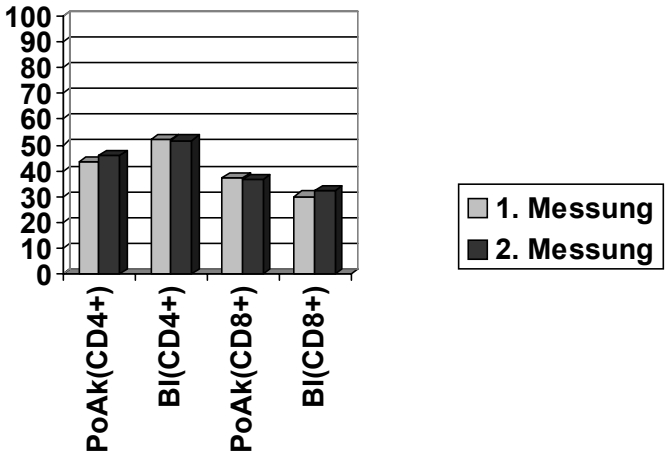


Abb. 35: CD4 und CD8 positive T-Zellen im Vergleich zwischen erster und zweiter Messung

Für die Anteile der CD4 bzw. CD8positiven Zellen am Gesamtlymphozytenpool lässt sich kein Unterschied im Vergleich zwischen erster und zweiter Messung innerhalb der einzelnen Gruppen zeigen.

4.9.3 CD4:CD8-Quotient

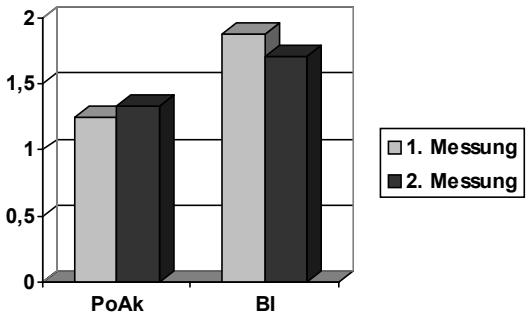
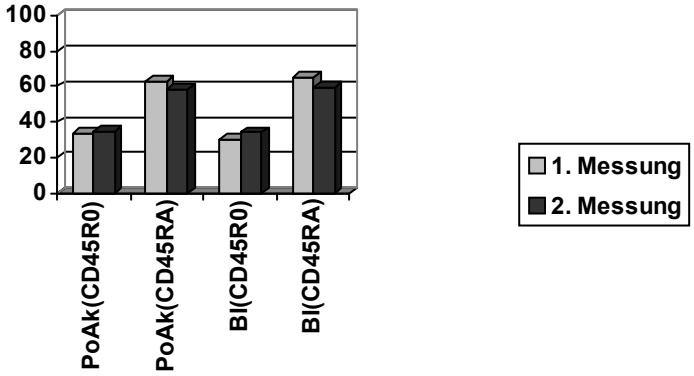


Abb. 36: CD4:CD8-Quotient im Vergleich zwischen erster und zweiter Messung

Hinsichtlich der Verhältnisse von CD4 zu CD8positiven T-Zellen in den beiden Patientengruppen erweist sich der signifikant erniedrigte Quotient in der PoAk-Gruppe als konstant, ein Unterschied zwischen erster und zweiter Messung ist nicht nachweisbar.

4.9.4 CD45R0 und RA auf T-Helferzellen



.

Abb. 37: CD45R0 und CD45RA auf CD4 positiven T-Zellen im Vergleich zwischen erster und zweiter Messung

Für die Expression von CD45R0 und CD45RA auf T-Helferzellen finden sich konstante Verhältnisse innerhalb der einzelnen Gruppen, statistisch läßt sich zwischen erster und zweiter Messung kein Unterschied nachweisen.

4.9.5 CD45R0 und RA auf zytotoxischen T-Zellen

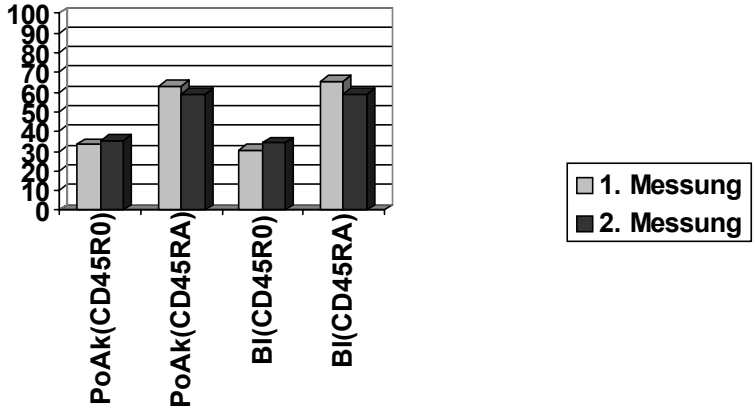


Abb. 38: CD45R0 und CD45RA auf CD8 positiven T-Zellen im Vergleich zwischen erster und zweiter Messung

Konstante Verhältnisse finden sich im Vergleich der ersten und zweiten Messung für beide Gruppen hinsichtlich CD45R0 sowie für CD45RA auf CD8 positiven T-Zellen in der BI-Gruppe, statistisch läßt sich kein Unterschied nachweisen für die einzelnen Parameter. Für CD45RA läßt sich in der PoAk-Gruppe ein signifikanter Unterschied zwischen erster und zweiter Messung darstellen.

4.9.6 CD57-positive T-Zellen

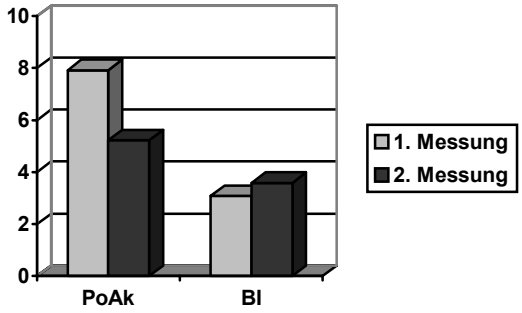


Abb. 39: CD57-positive T-Zellen im Vergleich zwischen erster und zweiter Messung

Für die prozentualen Anteile der CD57 exprimierenden Zellen an den CD3+/CD8+Zellen zeigen sich konstante Verhältnisse für die beiden Gruppen im Verlauf. Ein scheinbar höherer Anteil in der ersten gegenüber der zweiten Messung für die PoAk-Gruppe ist statistisch nicht signifikant.

4.10 Deskriptive Statistik und p-Werte

1.Messungen

Tabelle 3: Deskriptive Statistik und p-Werte 1. Messungen

	POAK					BI					Kontrollen					p-Werte		
Variable	Mittel-wert	Median	Standardabw.	Mini-mum	Maxi-mum	Mittel-wert	Median	Standardabw.	Mini-mum	Maxi-mum	Mittel-wert	Median	Standardabw.	Mini-mum	Maxi-mum	PoAk vs. BI	PoAk vs. Kontrolle	BI vs. Kontrolle
CD3+ [%]	84,98	86,13	13,40	51,33	97,57	86,27	89,96	10,04	59,68	94,57	73,18	73,56	6,53	57,10	86,23	0,806	*0,000	*0,000
CD3+ [/µl]	2114,38	2328,13	992,21	359,31	3700,40	2017,28	1930,06	833,43	1120,16	3868,14	1768,25	1711,56	493,02	866,80	3159,94	0,810	0,178	0,199
CD3+/4+ [%]	43,61	42,57	10,34	20,00	54,28	52,27	52,87	8,48	38,30	68,93	42,65	42,58	7,20	27,18	60,44	*0,049	0,727	*0,000
CD3+/4+ [/µl]	1081,14	1059,49	495,54	139,98	1733,84	1250,28	1145,34	638,21	655,93	2578,49	1032,73	997,31	327,06	5132,73	1771,20	0,509	0,702	0,442
CD3+/8+ [%]	37,45	37,27	8,60	25,56	51,10	30,18	27,05	7,34	19,87	39,61	24,61	24,37	4,81	17,05	38,31	0,050	*0,000	*0,021
CD3+/8+ [/µl]	915,72	843,29	527,38	220,84	2043,95	645,98	667,76	294,96	42,36	1130,25	590,35	562,47	201,12	294,10	1411,83	0,159	*0,029	O,457
CD3+/4-/8- [%]	4,69	4,55	2,71	0,56	8,86	7,08	3,99	10,96	0,68	39,71	6,33	5,76	2,83	2,13	14,47	0,512	0,101	*0,029
CD3+/4-/8- [/µl]	128,81	126,60	70,66	16,54	220,00	161,47	93,81	241,51	13,65	873,62	153,50	132,07	80,72	49,09	357,71	0,686	0,375	0,084
CD3+/4+/8+ [%]	1,38	1,03	1,00	0,46	3,35	0,67	0,42	0,46	0,16	1,55	0,43	0,33	0,40	0,12	2,65	*0,029	*0,000	0,069
CD3+/4+/8+ [/µl]	32,97	18,11	37,38	9,20	134,12	16,82	8,60	16,56	3,68	52,54	11,08	6,54	15,33	2,84	103,41	0,209	*0,000	0,148
CD4:CD8	1,25	1,14	0,52	0,63	2,16	1,88	1,81	0,72	1,03	3,68	1,81	1,68	0,54	0,94	3,54	*0,036	*0,004	0,716
Lymphozyten [/µl]	2390,00	2450	985,96	700,00	4000,00	2327,27	2200,00	869,59	1200,00	4300,00	2434,78		712,81	1200,00	3900,00	0,878	0,867	0,668
CD3+/8+ [%]	36,71	38,26	7,53	25,22	50,37	30,09	28,18	6,29	19,44	39,30	24,38	24,43	5,15	13,20	38,22	*0,041	*0,000	*0,003
CD3+/8+ [/µl]	916,19	851,79	517,98	226,36	2014,65	681,48	668,02	234,54	393,60	1211,74	613,52	573,74	240,95	289,35	1460,39	0,190	*0,042	0,402
CD3-u.+/8+/57+ [%]	15,13	9,74	18,22	1,90	64,21	3,84	2,55	3,06	1,20	10,90	3,67	2,47	3,54	0,08	15,43	*0,006	*0,001	0,882
CD3-u.+/8+/57+ [%v.8+]	18,13	16,23	13,09	5,42	42,25	12,08	7,27	10,71	0,04	30,10	12,79	7,86	11,02	0,45	50,44	0,258	0,215	0,656
CD3-u.+/8+/57+ [/µl]	237,80	137,16	255,02	21,43	849,20	91,42	34,25	102,19	7,03	295,84	91,41	62,01	102,79	3,19	601,81	0,057	*0,032	1,000
CD3+/8+/57+ [%]	7,91	6,23	6,28	1,83	20,66	3,08	1,56	3,25	0,25	10,55	2,74	1,58	2,99	0,05	13,59	*0,037	*0,001	0,919
CD3+/8+/57+ [%v.3+/8+]	19,76	17,56	12,28	5,60	41,02	10,59	4,42	11,20	0,01	29,78	10,75	6,74	10,35	0,23	50,46	0,089	*0,012	0,627
CD3+/8+/57+ [/µl]	227,20	114,75	246,72	17,58	826,58	82,19	30,46	103,14	5,40	286,99	64,87	39,76	83,09	1,30	530,02	0,090	*0,004	0,856
CD3-/8+/57+ [%]	1,39	0,76	2,04	0,04	6,91	0,78	0,21	1,09	0,06	3,63	0,93	0,57	1,63	0,01	10,47	0,400	0,535	0,373
CD3-/8+/57+ [/µl]	21,25	16,68	19,56	1,17	58,96	16,07	8,08	21,16	0,72	72,60	22,17	12,30	38,32	0,39	240,75	0,568	0,608	0,407
CD3+/2+/16+/56+ [%]	11,43	5,83	14,63	1,11	42,89	5,11	2,46	8,29	0,80	29,27	2,03	1,48	1,95	0,07	11,16	0,232	*0,003	0,182
CD3+/2+/16+/56+ [/µl]	264,87	107,26	357,41	15,60	986,49	166,59	29,47	365,58	16,04	1258,79	45,81	33,54	38,40	2,28	156,28	0,541	*0,005	0,210
CD3+/2+/16+/56+ [%v.CD3+/2+]	12,97	6,75	14,93	1,42	44,02	5,71	2,62	9,08	1,20	32,20	2,82	2,01	2,71	0,10	15,20	0,190	*0,005	0,317
CD3-/16+/56+/2+u.2- [%]	7,85	5,09	10,96	0,26	37,26	6,29	2,19	8,41	0,72	29,25	9,63	7,71	5,78	3,20	30,71	0,717	0,464	0,122
CD3-/16+/56+/2+u.2 [/µl]	119,77	134,59	88,81	6,74	260,80	30,60	71,10	164,64	11,53	585,12	235,41	185,3	195,50	31,91	1197,64	0,855	*0,049	*0,009
CD3-/16+/56+/2+ [%]	6,92	4,64	9,53	0,19	32,18	4,75	1,73	7,09	0,52	24,43	7,01	5,55	4,88	1,71	25,17	0,559	0,964	0,213
CD3-/16+/56+/2+ [/µl]	105,75	124,66	81,76	4,71	225,24	97,34	52,67	137,43	6,15	488,68	176,71	122,61	160,94	34,11	981,48	0,868	0,239	*0,010
CD3-/16+/56+/2- [%]	0,94	0,49	1,48	0,07	5,08	1,54	0,59	1,71	0,08	4,82	2,62	2,23	1,70	0,50	7,97	0,397	*0,005	0,064
CD3-/16+/56+/2- [/µl]	14,02	13,62	9,63	1,89	35,56	33,27	18,43	36,28	2,77	103,50	64,78	51,03	48,33	6,97	216,16	0,324	*0,000	*0,048

Fortsetzung Tabelle 3: Deskriptive Statistik und p-Werte 1. Messungen

	POAK					BI					Kontrollen					p-Werte		
Variable	Mittel-wert	Median	Standardabw.	Mini-mum	Maxi-mum	Mittel-wert	Median	Standardabw.	Mini-mum	Maxi-mum	Mittel-wert	Median	Standardabw.	Mini-mum	Maxi-mum	PoAk vs. BI	PoAk vs. Kontrolle	BI vs. Kontrolle
CD4+/45R0 [%]	33,47	28,41	18,30	13,86	79,03	30,43	25,16	10,09	22,77	52,32	34,47	32,30	12,54	14,22	72,19	0,638	0,835	0,326
CD4+/45RA [%]	63,13	69,10	19,67	13,65	84,25	65,43	70,98	11,78	37,12	73,63	59,84	62,29	13,62	19,14	82,24	0,746	0,529	0,217
Interm. [%]	1,59	1,51	0,90	0,35	3,00	1,08	0,87	0,73	0,15	2,49	4,44	3,70	3,16	0,17	12,03	0,173	*0,008	*0,000
Tot.gat.ev.	4580,90	4379,5	1355,92	1502,00	6119,00	5480,73	5639,00	1088,86	3429,00	7326,00	4343,27	4311	724,88	2946,00	5742,00	0,108	0,239	*0,000
Tot.gat.ev. [%]	38,18	36,50	11,30	12,52	51,00	45,67	47,00	9,07	28,58	61,05	36,23	35,99	6,07	24,50	47,85	0,108	0,256	*0,000
CD8+/45R0 [%]	12,69	12,73	3,35	7,26	18,30	11,02	10,53	6,66	3,72	28,47	17,42	15,58	9,76	2,27	57,99	0,483	0,139	*0,044
CD8+/45RA [%]	82,00	81,95	4,43	73,43	89,42	84,46	86,04	8,98	61,92	94,13	74,44	76,68	11,07	37,70	93,61	0,443	*0,013	*0,007
Interm. [%]	3,79	3,12	2,96	0,53	9,32	2,27	1,30	2,54	0,11	8,84	6,67	4,73	5,69	0,50	26,20	0,222	0,106	*0,002
Tot.gat.ev.	3518,10	3620	1068,99	1803,00	5207,00	2927,45	2977,00	686,84	1785,00	3871,00	2279,11	2233,50	459,76	1489,00	3456,00	0,145	*0,001	*0,000
Tot.gat.ev. [%]	29,32	30,15	8,91	15,03	43,39	24,40	24,81	5,72	14,88	32,26	19,21	18,76	3,90	12,41	28,80	0,145	*0,001	*0,000
CD3-/CD19+/HLA-DR+u.- [%]	7,32	6,58	4,47	2,36	14,12	6,44	6,73	2,02	3,10	10,27	16,89	16,25	4,96	7,22	29,80	0,888	*0,000	*0,000
CD3-/CD19+/HLA-DR+u.- [/µl]	159,74	112,22	124,31	54,39	423,54	156,09	140,17	83,32	52,81	291,42	419,90	391,97	203,00	102,15	1049,63	0,937	*0,000	*0,000
CD3-/19+/HLA-DR+ [%]	7,19	6,28	4,45	2,36	14,06	6,34	6,68	2,11	2,72	10,27	16,82	16,19	4,96	7,18	29,71	0,944	*0,000	*0,000
CD3-/19+/HLA-DR+ [/µl]	157,17	108,52	123,86	54,39	421,69	154,29	138,37	84,27	46,23	288,32	412,15	391,41	209,84	27,78	1045,24	0,951	*0,001	*0,000
CD3+/19-/HLA-DR+ [%]	7,81	7,79	4,61	0,02	17,76	5,87	3,72	5,62	1,17	19,53	6,76	6,14	3,18	1,89	15,62	0,399	0,389	0,071
CD3+/19-/HLA-DR+ [/µl]	203,00	171,70	201,19	0,54	710,20	154,47	67,72	173,56	14,10	537,07	165,63	136,84	106,28	53,57	502,84	0,560	0,760	0,119
CD3+/19-/HLA-DR+ [%v3+/19-]	13,42	10,31	10,13	4,46	40,00	6,67	3,93	6,29	1,26	22,39	9,28	7,93	4,39	2,81	21,28	0,079	0,166	0,112
CD3-/19+/5+ [%]	0,57	0,32	0,63	0,05	2,05	0,32	0,15	0,56	0,01	1,88	5,52	3,98	4,16	0,86	17,64	0,358	*0,000	*0,000
CD3-/19+/5+ [/µl]	12,56	9,81	13,52	1,52	47,09	7,56	3,61	13,98	0,22	46,93	145,42	100,56	143,84	4,94	634,97	0,096	*0,000	*0,000
CD3-/19+/5+ [%v.19+]	14,76	4,77	29,67	1,59	98,56	3,96	2,56	4,89	0,27	16,83	29,92	26,47	17,25	0,22	72,76	0,131	*0,000	*0,000
CD3+/19-/5- [%]	1,98	1,60	2,12	0,16	7,27	1,96	0,69	2,42	0,14	7,01	0,74	0,50	0,69	0,16	3,23	0,985	0,066	0,325
CD3+/19-/5- [/µl]	49,83	39,70	52,38	1,68	167,16	58,79	11,81	93,26	3,19	301,61	17,00	12,24	15,59	3,51	83,94	0,794	0,091	0,578
Alpha/beta [%]	93,51	93,86	2,89	87,05	97,54	94,32	94,89	3,98	84,54	99,38	92,16	92,76	4,19	80,81	97,61	0,602	0,339	0,127
Alpha/beta [/µl]	2007,80	1994,59	852,90	657,09	3472,46	2013,48	1920,57	706,16	1058,93	3551,34	2246,50	2257,60	659,67	1122,72	3669,51	0,987	0,331	0,305
Gamma/delta [%]	6,18	5,88	2,91	2,24	12,94	5,47	5,11	4,02	0,30	15,35	7,65	6,94	4,17	2,73	19,10	0,651	0,294	0,122
Gamma/delta [/µl]	130,72	119,04	73,44	31,36	263,22	123,25	103,46	106,48	6,00	335,50	188,45	141,70	122,78	45,22	559,80	0,855	0,160	0,112

Legende:
Die Tabelle enthält Mittelwert, Median, Standardabweichung sowie Minimum und Maximum aller gemessenen Parameter spaltenweise für die einzelnen Gruppen aufgeführt und zwar zum Zeitpunkt der ersten Messung.
Weiterhin sind die p-Werte der Gruppenvergleiche untereinander aufgeführt.
Die Kennzeichnung * bedeutet signifikanter Unterschied.

2. Messungen

Tabelle 4: Deskriptive Statistik und p-Werte 2. Messungen

	POAK					BI					p-Werte (1.vs.2.)	
Variable	Mittelwert	Median	Standardabw.	Minimum	Maximum	Mittelwert	Median	Standardabw.	Minimum	Maximum	PoAk	BI
CD3+ [%]	87,00	87,99	9,35	67,04	99,93	90,48	91,74	6,32	81,48	100,00	0,299	0,179
CD3+ [/µl]	1619,96	1625,73	823,12	436,30	3253,67	1925,24	2031,35	545,27	1150,23	3017,69	0,587	0,217
CD3+/4+ [%]	45,93	46,45	6,91	33,08	55,44	51,84	51,46	7,88	37,89	68,85	0,246	0,835
CD3+/4+ [/µl]	840,37	798,86	432,08	269,26	1797,92	1095,01	1044,69	322,32	723,61	1790,15	0,690	0,052
CD3+/8+ [%]	36,75	35,87	7,77	23,85	50,89	32,50	33,74	7,52	19,16	43,73	0,769	0,931
CD3+/8+ [/µl]	691,32	690,66	352,45	143,97	1170,80	696,18	654,39	298,11	373,61	1443,35	0,246	0,965
CD3+/4-/8- [%]	5,19	4,60	2,29	2,36	9,01	6,84	5,23	4,38	0,76	14,90	0,624	*0,011
CD3+/4-/8- [/µl]	124,384	104,66	86,85	30,71	293,70	147,00	116,33	102,88	13,97	338,16	0,549	*0,017
CD3+/4+/8+ [%]	0,91	0,15	1,49	0,02	4,13	0,47	0,50	0,26	0,09	0,85	0,252	0,098
CD3+/4+/8+ [/µl]	15,71	3,04	25,58	0,26	72,11	9,80	8,38	6,25	1,93	22,10	0,274	*0,007
CD4:CD8	1,33	1,19	0,47	0,89	2,32	1,71	1,41	0,77	0,87	3,59	0,737	0,867
Lymphozyten [/µl]	1820	1800	812,13	500,00	3500,00	2125,00	2150	579,87	1400,00	3300,00	0,573	0,238
CD3+/8+ [%]	37,00	35,48	7,77	24,17	49,86	32,55	34,37	7,12	20,54	43,56	0,928	0,702
CD3+/8+ [/µl]	692,15	697,41	344,38	145,53	1158,77	697,57	630,79	293,40	381,63	1437,45	0,240	0,495
CD3-u.+/8+/57+ [%]	5,29	4,92	3,72	0,77	12,43	3,77	1,48	5,16	0,04	13,73	*0,000	0,118
CD3-u.+/8+/57+ [%v.8+]	13,39	13,47	7,72	1,34	27,7	11,31	5,07	13,38	0,14	34,96	0,131	0,497
CD3-u.+/8+/57+ [/µl]	97,03	72,45	85,68	10,0	261,07	66,10	27,34	79,19	0,79	205,95	*0,003	0,456
CD3+/8+/57+ [%]	5,22	4,78	3,72	0,07	12,39	3,58	1,29	5,12	0,03	13,29	0,134	0,172
CD3+/8+/57+ [%v.3+/8+]	13,37	12,93	7,51	0,20	26,99	10,98	4,29	13,74	0,12	35,19	0,159	0,532
CD3+/8+/57+ [/µl]	97,95	70,35	85,75	0,86	260,19	62,25	22,03	79,29	0,59	204,16	*0,004	0,442
CD3-/8+/57+ [%]	0,18	0,08	0,22	0,00	0,70	0,19	0,08	0,27	0,01	0,85	*0,000	*0,000
CD3-/8+/57+ [/µl]	2,91	1,63	3,14	0,00	9,14	3,83	1,47	6,46	0,20	21,37	*0,000	*0,002
CD3+/2+/16+/56+ [%]	3,59	1,92	3,66	0,18	11,32	9,94	3,98	11,84	0,32	34,63	*0,000	0,287
CD3+/2+/16+/56+ [/µl]	68,36	43,22	80,79	3,51	237,81	187,96	101,23	204,86	5,90	519,43	*0,000	0,114
CD3+/2+/16+/56+ [%v.CD3+/2+]	4,21	2,17	4,11	0,19	12,37	10,76	4,81	12,86	0,39	38,01	*0,001	0,300
CD3-/16+/56+/2+u.2- [%]	5,79	3,52	7,73	0,11	26,03	3,99	3,34	3,61	0,21	9,80	0,313	*0,025
CD3-/16+/56+/2+u.2 [/µl]	90,83	76,23	101,98	1,88	118,39	73,65	65,37	58,98	4,51	173,96	0,687	*0,008
CD3-/16+/56+/2+ [%]	5,22	2,90	6,89	0,08	22,99	3,29	2,93	3,18	0,15	8,40	0,348	*0,033
CD3-/16+/56+/2+ [/µl]	81,99	61,87	91,73	0,89	298,82	60,81	50,11	53,07	3,39	152,12	0,736	*0,013
CD3-/16+/56+/2- [%]	0,59	0,22	0,91	0,03	3,04	0,70	0,58	0,48	0,05	1,40	0,169	*0,001
CD3-/16+/56+/2- [/µl]	9,08	3,44	12,47	0,58	39,57	12,84	14,36	6,97	1,13	21,84	0,454	*0,000

Fortsetzung Tabelle 4: Deskriptive Statistik und p-Werte 2. Messungen

	POAK					BI					p-Werte (1.vs.2.)	
Variable	Mittelwert	Median	Standardabw.	Minimum	Maximum	Mittelwert	Median	Standardabw.	Minimum	Maximum	PoAk	BI
CD4+/45R0 [%]	35,13	32,07	16,16	16,64	74,59	34,23	28,89	12,54	23,07	55,04	0,718	0,506
CD4+/45RA [%]	58,73	63,93	19,09	10,79	76,22	59,14	64,51	16,44	26,62	73,54	0,931	0,313
Interm. [%]	5,60	4,85	4,24	1,28	14,49	5,89	4,44	5,52	0,39	19,21	*0,000	*0,000
Tot.gat.ev.	4464,50	4674	1059,23	2271,00	5963,00	5153,90	4993,50	1022,39	3719,00	7272,00	0,473	0,866
Tot.gat.ev. [%]	37,21	38,96	8,83	18,93	49,69	42,95	41,62	8,52	30,99	60,60	0,473	0,866
CD8+/45R0 [%]	11,85	12,71	6,10	2,96	19,47	8,97	9,14	3,68	2,76	14,18	0,089	0,089
CD8+/45RA [%]	75,30	74,81	9,99	54,12	90,54	76,74	74,66	14,17	47,06	92,86	*0,025	0,172
Interm. [%]	12,58	11,11	8,27	0,59	27,71	14,03	14,56	11,92	1,55	41,63	*0,005	*0,000
Tot.gat.ev.	3502,00	3611	893,55	2389,00	4999,00	2806,90	2987,50	626,18	1647,00	3727,00	0,602	0,791
Tot.gat.ev. [%]	29,19	30,09	7,45	19,91	41,66	23,39	24,90	5,22	13,73	31,06	0,604	0,791
CD3-/CD19+/HLA-DR+u.- [%]	5,63	4,80	5,37	0,04	15,73	5,91	4,75	2,95	2,50	12,79	0,594	0,253
CD3-/CD19+/HLA-DR+u.- [/µl]	85,01	80,21	79,60	0,69	229,93	136,15	110,34	78,70	52,50	319,84	0,200	0,873
CD3-/19+/HLA-DR+ [%]	5,61	4,79	5,37	0,03	15,70	5,85	4,73	2,89	2,48	12,54	0,582	0,345
CD3-/19+/HLA-DR+ [/µl]	84,63	80,21	79,41	0,52	228,47	134,61	109,67	77,01	52,07	313,30	0,202	0,797
CD3+/19-/HLA-DR+ [%]	9,06	8,19	3,85	3,66	17,71	9,11	4,17	11,34	1,03	36,73	0,599	*0,039
CD3+/19-/HLA-DR+ [/µl]	167,61	143,31	108,43	46,29	372,01	259,61	84,21	401,36	19,09	1248,81	0,080	*0,015
CD3+/19-/HLA-DR+ [%v3+/19-]	10,64	9,62	4,74	3,78	20,18	9,88	5,05	11,59	1,21	37,27	*0,034	0,071
CD3-/19+/5+ [%]	0,94	0,29	1,82	0,06	5,99	0,98	0,21	2,06	0,05	6,77	*0,004	*0,001
CD3-/19+/5+ [/µl]	13,96	4,56	23,86	1,28	77,85	24,93	4,06	53,90	1,60	176,03	0,106	*0,000
CD3-/19+/5+ [%v.19+]	20,58	3,71	36,27	1,69	100,00	17,51	5,93	29,73	1,10	97,41	0,559	*0,000
CD3+/19-/5- [%]	1,05	0,63	1,18	0,07	3,86	3,20	0,62	5,77	0,08	18,57	0,097	*0,016
CD3+/19-/5- [/µl]	21,36	11,75	25,61	0,33	80,99	94,16	11,45	195,71	1,77	631,40	*0,045	*0,038
Alpha/beta [%]	94,68	95,12	2,44	90,30	98,22	91,84	93,71	6,18	82,05	99,46	0,622	0,187
Alpha/beta [/µl]	1504,79	1491,85	764,12	421,20	2976,78	1757,54	1810,32	458,77	1096,40	2478,73	0,749	0,210
Gamma/delta [%]	4,19	4,05	2,24	0,65	7,97	7,91	6,14	6,15	0,30	17,82	0,444	0,202
Gamma/delta [/µl]	77,51	60,88	76,35	11,58	259,32	162,78	97,81	156,83	4,50	529,60	0,910	0,244

Legende:
Die Tabelle enthält Mittelwert, Median, Standardabweichung sowie Minimum und Maximum aller gemessenen Parameter spaltenweise für die einzelnen Gruppen aufgeführt und zwar zum Zeitpunkt der zweiten Messung.
Weiterhin sind die p-Werte der Vergleiche zwischen erster und zweiter Messung der PoAk- und der BI-Gruppe aufgeführt.
Die Kennzeichnung * bedeutet signifikanter Unterschied.

5. Diskussion

5.1 Zielsetzung der Untersuchung

Die vorliegende Studie untersucht die Frage, ob eine kurzfristige Behandlung mit polyklonalen Antikörpern bei Kindern zu langfristigen Veränderungen der Lymphozytensubpopulationen führt.

5.1.1 Studiendesign

In einem retrospektiven Ansatz wurden drei Patientengruppen verglichen. Da therapieinduzierte Veränderungen untersucht werden sollten, musste die Vergleichbarkeit der Gruppen insbesondere im Hinblick auf andere mögliche Einflussfaktoren auf die untersuchten Parameter gewährleistet sein. Hier sind zu nennen: Alter, Geschlecht, HLA-Übereinstimmung, Dialysedauer, Virusinfekte, andere Medikamente. Hinsichtlich Alter zum Zeitpunkt der Transplantation, Geschlecht, HLA-Übereinstimmung und verabreichter Steroiddosis waren die Gruppen vergleichbar. Zum Zeitpunkt der Untersuchung war die mittlere verabreichte Cyclosporindosis in der mit polyklonalen Antilympozytenantikörpern behandelten Gruppen höher als in der Basisimmunsuppressionsgruppe. Ein Einfluss von Cyclosporin auf die gefundenen Veränderungen wie den erniedrigten CD4/CD8-Quotienten wird von verschiedenen Autoren allerdings für unwahrscheinlich erachtet (Grebe 2000).
Die Zeit seit Transplantation betreffend, war die Vergleichbarkeit der Gruppen nur eingeschränkt zu gewährleisten. Dies hat seine Ursache bei den im Laufe der Zeit wechselnden Therapieempfehlungen und macht deutlich, dass die erhobenen Beobachtungen der Überprüfung durch prospektive Studien im pädiatrischen Patientengut bedürfen.
Virusinfekte können Lymphozytensubpopulationen beeinflussen. Hier spielen bei immunsupprimierten transplantierten Patienten insbesondere Infektionen mit CMV und EBV eine Rolle. Diesbezüglich sowie hinsichtlich der Risikokonstellation aus CMV-IgG positivem Spender und negativem Empfänger waren die Gruppen vergleichbar.
Darüber hinaus wurden funktionelle Parameter erhoben (Serum-Kreatinin, GFR), hinsichtlich derer die Gruppen vergleichbar waren. Angemerkt sei an dieser Stelle, dass ein Zusammenhang zwischen initialer Therapie und Funktion aufgrund des Studiendesigns natürlich nicht beweisbar ist.

5.1.2 Statistik

Zur Feststellung von Unterschieden der gemessenen Werte zwischen den Patientengruppen wurden Mittelwerte beziehungsweise Mediane verglichen. Dieser Querschnittsvergleich liefert jedoch keinen Hinweis auf die Konstanz der erhobenen Parameter. Es wurde daher eine weitere Messung bei allen Patienten der Transplantierten-Gruppen nach einem Jahr durchgeführt und mit der ersten verglichen.

5.1.3 Messmethode

Die zur Messung der Lymphozyten verwandte FACS-Methode erfasst durch die Kombination von charakteristischer Immunfluoreszenz und Lichtstreuung reproduzierbar mehr als 98% aller Lymphozyten (Loken 1990). Für die Messung relativer Anteile und absoluter Werte spezifischer Subpopulationen bietet die Methode besondere Vorteile gegenüber anderen Techniken wie etwa der Mikroskopie, da sie große Zahlen an Lymphozyten des peripheren Bluts schnell, valide und quantitativ reproduzierbar analysieren kann (Bach 1991). Zellen mit modulierten Oberflächenantigenen werden jedoch nicht erfasst.
Das Blut bietet allerdings nur einen sehr eingeschränkten Blick auf das Immunsystem insgesamt -nur 2% aller Lymphozyten befinden sich dort (Westermann 1990). Es besteht keine klare Korrelation zwischen Lymphozytenzahlen im Blut und in peripheren Geweben. Gerade in klinischen Situationen, die das lymphatische System alterieren, kann es zu unterschiedlichen Verteilungen in verschiedenen Kompartimenten kommen. So etwa bei HIV-Patienten unter einer HAART (Roederer 1998) oder Patienten mit M. Hodgkin, wobei letztere nicht notwendigerweise veränderte Lymphozytensubpopulationen im peripheren Blut aufweisen müssen. Auch im Rahmen der Diagnostik von Abstoßungsreaktionen nach Nierentransplantation ist die Wertigkeit des peripheren FACS mit einigen Einschränkungen zu sehen (Müller 1998). So sind funktionelle Aussagen anhand der Ergebnisse der FACS-Messungen nur bedingt möglich beziehungsweise nur dann, wenn sie sich in ein dynamisches Verständnis der Lymphozytensubpopulationen integrieren.
Die Methode bietet jedoch den Vorteil, dass eine große Anzahl an Lymphozytenmarkern gleichzeitig absolut und relativ erfasst werden kann. Eventuelle untersucherabhängige Unterschiede wurden insofern minimiert, als alle Messungen am Tag der Blutabnahme immer vom selben Untersucher durchgeführt wurden. Weiterhin wurden von allen Patienten am Tag der Blutentnahme klinische und laborchemische Parameter erfasst.

5.2 Homöostase

Rund zwei Jahre nach Anwendung einer Lymphozyten-depletierenden Therapie unterschieden sich die Gesamtlymphozytenzahlen der untersuchten Patienten nicht von denen der Kontrollgruppen. Dies stellt einen deutlichen Unterschied zu den Ergebnissen bei erwachsenen nierentransplantierten Patienten dar. Für letztere wurden persistierend niedrige Lymphozytenzahlen 24 Monate und länger nach initialer depletierender Therapie beschrieben, die sich vor allem auf persistierend niedrigen CD4+ Zellen bei gleichzeitiger Überrepräsentation CD57-positiver CD8+Zellen gründeten (Müller 1997, Müller 1999). Ähnlich wie bei Erwachsenen fanden sich bei den pädiatrischen Patienten charakteristische Veränderungen die T-Zellpopulation betreffend, während andere untersuchte lymphatische Zellinien (B-Lymphozyten und Natürliche Killerzellen) sich in der PoAk-Gruppe nicht von der BI-Gruppe unterschieden.
Bei den in dieser Arbeit untersuchten pädiatrischen Patienten fanden sich jedoch im Unterschied zu den Veränderungen, wie sie für erwachsene nierentransplantierte Patienten beschrieben sind, keine persistierend niedrigen CD4+Zellzahlen, dennoch war der Quotient aus CD4:CD8 erniedrigt. Dies leitete sich vor allem aus erhöhten CD8-Zellzahlen her. Dies legt die Vorstellung nahe, dass kindliche Lymphozyten nach depletierender Antikörpertherapie andere Regenerationswege als die Erwachsener beschreiten können, beziehungsweise in unterschiedlichem Maße. Ähnliche Veränderungen, wie oben beschrieben, finden sich auch in anderen klinischen Situationen, die mit T-Zelldepletion einhergehen, wie etwa Knochenmarkstransplantation,

Hochdosischemotherapie, HIV und Therapie mit monoklonalen Antikörpern bei Autoimmunkrankheiten (Ettenger 1992).
Zur Annäherung an die Frage, wie nach initialer Lymphopenie ein charakteristisch verändertes Muster an Lymphozytensubpopulationen zu erklären sein könnte, zunächst einige Gedanken zur Populationsbiologie von Lymphozyten unter physiologischen Bedingungen: Unter physiologischen Bedingungen unterliegt die Anzahl der Zellen des Immunsystems im erwachsenen Organismus einer homöostatischen Kontrolle. Obwohl im Knochenmark und Thymus lebenslang neue B- und T-Zellen produziert werden, und Antigenstimulation im peripheren Zellpool Zellteilung induziert, bleiben Gesamtzellzahlen jeweils konstant, ohne dass Gefäße und Kompartimente kontinuierlich mit zirkulierenden Zellen angefüllt werden. Es handelt sich also um einen Zustand kinetischen Gleichgewichts zwischen Zellproduktion und Zellverlust, in dem jeder Lymphozyt mit anderen oder bereits ansässigen um das Überleben konkurriert (Freitas 1999). Dies scheint für B- und T-Zellen unabhängig voneinander zu gelten. Experimente an Mäusen zeigten, dass etwa CD8-Zellen einen CD4-Zellmangel ausgleichen können, es jedoch unter Bedingungen der B-Zelldefizienz nicht zu einer Expansion von T-Zellen kommt (Paul 1999). Welche Faktoren nehmen nun Einfluss auf die Überlebenswahrscheinlichkeit eines T-Lymphozyten?
Der menschliche T-Zellpool wird bereits in der frühen Fetalentwicklung etabliert, nach der Passage von sich entwickelnden Thymozyten durch den Thymus und der Auswanderung von reifen T-Zellen an Orte der Peripherie wie Lymphknoten und Milz (Haynes 1990). Trotz der Tatsache, dass der Thymus essentiell für die Etablierung des T-Zellpools im frühen Leben ist, und Thymopoese unterschiedlichen Ausmaßes auch später existiert, zeigen verschiedene Untersuchungen, dass es eine altersabhängige Abnahme der Thymusfunktion gibt (Mackall 1995). Neben der sicherlich unumstrittenen Rolle des Thymus in der primären T-Zellentwicklung, gibt es auch extrathymale Regenerationswege, über die die Prägung von Knochenmarksvorläuferzellen erfolgen kann, etwa im Dünndarm und der Leber sowie die ebenfalls thymusunabhängige Teilung reifer T-Zellen in der Peripherie (Rocha 1994, Makino 1977). Periphere T-Zellen brauchen zum Überleben weiterhin Signale von Cytokinen sowie MHC-Kontakte (Paul 1999, Sprent 2003).
So ist die Überlebenswahrscheinlichkeit eines Lymphozyten nicht nur als eine der Zelle innewohnende Eigenschaft zu sehen, sondern vielmehr ein Resultat von Interaktionen mit seiner Umwelt (Freitas 1993). Unter T-Zelldepletion beziehungsweise unter lymphopenischen Bedingungen kommt es nun zu einer „homöostatischen Proliferation“ (Murali-Krishna 2000), einer Situation für die ganz bestimmte Merkmale charakteristisch zu sein scheinen.

5.3 Subset- und altersspezifische Regenerationsmuster von T-Zellen

5.3.1 CD4+Zellen

In der Literatur finden sich Daten zur Induktionstherapie mit polyklonalen Antilymphozytenantikörpern nach Nierentransplantation bei Kindern, die eine initiale CD4+Zell-Depletion mit langsamem Regenerationsbeginn 12 Tage später beschreiben (Troppmann 1994, Buchmann 1993). Zu Langzeitergebnissen im Hinblick auf die Regeneration dieser und anderer Lymphozytensubpopulationen bei Kindern lagen bislang keine Daten vor. In der vorliegenden Studie wiesen die Kinder der mit polyklonalen Antilymphozytenantikörpern behandelten Patientengruppe zum Zeitpunkt der Untersuchung, also länger als zwei Jahre nach Nierentransplantation,

CD4+Zellzahlen auf, die sich nicht von denen der gesunden Kontrollgruppe unterschieden. Dies steht im Gegensatz zu Ergebnissen bei erwachsenen Nierentransplantierten, für welche eine langdauernde Depletion von CD4+Zellen nach initialer depletierender Therapie mit Antilymphozytenantikörpern beschrieben wurde (Müller 1997). Diese CD4+Lymphopenie wurde auch für die in den ersten 24 Monaten nach Transplantation beobachtete Erniedrigung des CD4:CD8-Quotienten verantwortlich gemacht.
Hier scheinen sich für das pädiatrische Patientengut typische und von erwachsenen differente Vorgänge widerzuspiegeln.
Mackall et al. haben Wege der T-Zellregeneration nach intensiver Chemotherapie ausführlich untersucht: Sie fanden, dass die CD4+Regeneration zu normalen Zellzahlen bei pädiatrischen Patienten nach intensiver Chemotherapie, die zu CD4+Zelldepletion führt, sechs Monate benötigte, während junge Erwachsene bereits noch nach einem Jahr und länger eine persistierende CD4+Zytopenie aufwiesen (Mackall 1997). Die Altersabhängigkeit der CD4+Regeneration nach Chemotherapie korrelierte mit der radiologisch bestimmten Thymusgröße (Mackall 1995). Dies unterstützt die These, dass CD4+Zellregeneration in hohem Maße thymusabhängig ist. Auch in Untersuchungen an Kindern nach Knochenmarkstransplantation fand man eine inverse Korrelation zwischen Alter und der Fähigkeit CD4+Zellen zu regenerieren (Storek 1995, Weinberg 1995).
In Versuchen an Mäusen, die mit Anti-CD4-Antikörpern behandelt wurden, konnte Fleming zeigen, dass der gealterte Thymus in geringerem Maße depletierte CD4+Zellen regenerieren kann als der jüngere (Fleming 1993).
Beim Menschen erreicht der Thymus seine maximale Größe im Alter von 12 Monaten. Danach setzt die sogenannte Thymusinvolution ein, die dazu führt, dass im Alter von 25 Jahren fast zwei Drittel des Organs verschwunden sind (George 1996).
Das bei Kindern noch relativ große Thymusrestgewebe scheint so eine schlüssige Erklärung für die in der vorliegenden Untersuchung gefundenen normalen CD4+Zellzahlen zu liefern. Pädiatrische Patienten sind offensichtlich im Unterschied zu erwachsenen insbesondere älteren Personen in der Lage, in einem sehr viel größeren Ausmaß Thymopoese zur Bereitstellung von CD4+Zellen auch nach T-Zelldepletion zu betreiben. Dies bestätigt auch die in der vorliegenden Arbeit gefundene Verteilung von R0- und RA- auf CD4+Zellen. Es fanden sich keine Unterschiede zwischen mit polyklonalen Antilymphozytenantikörpern behandelten Patienten und denen der Vergleichsgruppen.
Insgesamt scheinen transplantierte Kinder trotz Lymphozytendepletion und fortlaufender Immunsuppression eine phänotypische Normalisierung ihres peripheren CD4+Lymphozytenkompartments im Langzeitverlauf zu erreichen. Die Abklärung der genauen Kinetiken und altersabhängiger Schwellenwerte muss in weiteren Studien untersucht werden.

5.3.2 CD8+Zellen

Die in der vorliegenden Studie untersuchten PoAk-Patienten wiesen zum Zeitpunkt der Untersuchung erhöhte Werte für CD8+Zellen im Gegensatz zu den Patienten mit Basisimmunsuppression auf. Unterschiede in den Regenerationsraten von CD4+ und CD8+Zellen sind auch in verschieden Studien an knochenmarkstransplantierten Patienten beschrieben worden (Forman 1982, Aktinson 1982, Favrot 1983).

Bei erwachsenen nierentransplantierten Patienten nach initialer Lymphozytendepletion haben Müller et al. für die CD8+Zellen einen schnellen Wiederanstieg auf hochnormale Werte im Unterschied zu den anhaltend niedrigen Werten für CD4+ gefunden (Müller 1999). Bas et al. beschrieben ebenfalls einen schnellen Wiederanstieg von CD8+Zellen bei nierentransplantierten Patienten auf höhere Werte als vor der Transplantation, die dort zusammen mit persistierend niedrigen CD4+Zellzahlen mit einer guten Langzeittransplantatfunktion einhergingen (Bas 1998).
Die Regeneration von CD8+Zellen ist offensichtlich nicht altersabhängig eingeschränkt (Mackall1997, Lynch 1995, Hakayawa 1994). Diesen Zellen scheinen in hohem Maße extrathymale Regenerationswege offenzustehen, die einerseits die periphere Expansion verbliebener reifer CD8+Zellen umfassen aber auch möglicherweise die extrathymale Prägung hämatopoetischer Vorläuferzellen an anderen Orten als dem Thymus. Studien an Mäusen belegen die thymusunabhängige Reifung von T-Zellen in Dünndarm (Rocha 1994) und Leber (Makino 1993). Beim Menschen konnte extrathymale Reifung von T-Zellen an Erwachsenen im Dünndarm und Endometrium nachgewiesen werden (Hayakawa 1994, Lynch 1995).
Mit zunehmendem Alter und abnehmender Thymusfunktion könnten diese T-Zell-Differenzierungswege einen zunehmend größeren Einfluss erlangen (Cunnane 1995).

5.4 Die Rolle des antigenen Stimulus

Die beschriebene signifikante Erhöhung der CD8+Zellpopulation muss neben den eventuell altersabhängig sich verändernden Proliferationswegen der beiden T-Zellpopulationen (in erster Linie durch die altersabhängige Abnahme der Thymusfunktion) angesichts normaler CD4+Zellzahlen den Blick allerdings auch auf andere Mechanismen lenken, die hier eine Rolle spielen könnten, um die veränderte Zusammensetzung der Lymphozytensubpopulationen erklären zu können. Die Situation der mit antilymphozytären Antikörpern behandelten Transplantierten ist durch mehrere Merkmale mit charakterisiert: 1.) Lymphopenie, 2.) Fremdantigen (Transplantat), 3.) Persistierende (virale) Infektionen begünstigt durch die Immunsuppression.
Unter lymphopenischen Bedingungen kann ein Mechanismus die „Wiederauffüllung“ des T-Zellpools herbeiführen, der als „homöostatische Proliferation“ bezeichnet wird. Die Proliferation von T-Zellen findet hier klassischerweise in Abwesenheit eines exogenen antigenen Stimulus statt. Dazu sind niedrig-affine Kontakte zwischen T-Zellrezeptoren und MHC-Klasse-I - und II-Molekülen notwendig (Ge 2002, Surh 2000). Darüber hinaus spielen Cytokine wie IL-7 eine Rolle (Dai 2001).
Dieser Vorgang unterscheidet sich deutlich von der antigen-abhängigen Proliferation von T-Zellen, welche zu einer viel rascheren Zellzahlzunahme und Expression typischer zum Teil antigenabhängiger Aktivierungsmarker führt (Murali-Krishna 2000).
Persistierende virale Infektionen schließlich können die Expression von MHC-Molekülen der Klasse I erhöhen und auf diesem Wege eine erhöhte Proliferation von CD8+Zellen bewirken (Müller 2002, Freitas 2000, Tuma 2002).
So könnten sich die in der vorliegenden Untersuchung gefundenen Unterschiede in der Zusammensetzung der T-Lymphozytensubpopulationen nach T-Zell-depletierender Therapie als Folge der Konkurrenz und Überlappung verschiedener Proliferationswege erklären.

5.5 Spezifische Oberflächenmarker

5.5.1 CD57 auf CD8+Zellen

Die überrepräsentierten CD8+Zellen der PoAk-Grupppe trugen im Unterschied zu denen der Vergleichsgruppen sehr viel häufiger das Oberflächenantigen CD57. Letzteres findet sich physiologischerweise in höherer Expression bei älteren als bei jüngeren Menschen, wie verschiedene Studien zeigen (Bandres 2000, Olsson 2000). Auch innerhalb der untersuchten Kontrollgruppe zeigte sich in den hier erhobenen Daten eine Tendenz zu altersabhängig höherer Expression. Weiterhin wird CD57 von verschiedenen Autoren in Zusammenhang mit CMV-Infektionen gebracht (Labalette 1994, Hazzan1997, Wang 1995). Dieses konnte im vorliegenden Patientengut nicht gezeigt werden. Auch in anderen klinischen Situationen, die mit einer Aktivierung des Immunsystems einhergehen, findet man eine Vermehrung dieser Subpopulation, wie etwa bei rheumatoider Arthritis (D'Angeac1993), Autoimmunerkrankungen, Tumoren und HIV-Infektion (Wang 1995).
Ebenso nach intensiver lymphozytendepletierender Chemotherapie fanden Mackall und Mitarbeiter einen überproportional hohen und zudem raschen Anstieg dieser Subpopulation im Vergleich zu CD4+Zellen begleitet von einem Anstieg der CD8+CD28-Zellen (Mackall 1997). Die Oberflächenantigene CD28 und CD57 scheinen invers exprimiert zu werden (Merino 1998). Wahrscheinlich handelt es sich bei den von Mackall beschriebenen Zellen um die gleiche Zellpopulation (also CD8+CD28-CD57+).

5.5.2 CD16, CD56 und CD2 auf T-Zellen

Weiterhin fand sich ein erhöhter Anteil von Lymphozyten, die Rezeptoren von Natürlichen Killerzellen exprimierten, in der mit polyklonalen antilymphozytären Antikörpern behandelten Patientengruppe. Diese Zellpopulation, vielfach als NK-T-Zellen bezeichnet, stellen eine eigenständige T-Zellinie dar, abstammend von doppelt positiven Thymozyten nach positiver Selektion durch das MHC-Molekül CD1d (Gapin 2001, Godfrey 2000). Zur Expansion dieser Zellpopulation fehlen noch weitestgehend funktionelle Untersuchungen. Erste klinische Hinweise scheinen diese Zellen in Zusammenhang mit Toleranzentwicklung zu bringen (Strober 1996).

5.6 B-Zellen, Natürliche Killerzellen

Hinweise für einen Einfluss auf das B-Zellkompartment durch Behandlung mit polyklonalen Antikörpern fanden sich in der vorliegenden Untersuchung nicht. In beiden Transplantiertengruppen konnten gegenüber der Kontrollgruppe signifikant erniedrigte B-Zellzahlen dargestellt werden. Ebenso war in beiden Gruppen die Expression des Aktivierungsmarkers HLA-DR auf diesen Zellen signifikant erniedrigt. Auch die Expression des fetalen Oberflächenmarkers CD5 war in beiden Transplantiertengruppen signifikant erniedrigt.
Aus der Literatur ist bekannt, dass Antilymphozytäre Antikörper keine wesentliche B-Zelldepletion bedingen (Bonnefoy-Bérard 1996), die Verhältnisse in den Transplantiertengruppen sind daher am ehesten der Basisimmunsuppression zuzurechnen.

Auch für die natürlichen Killerzellen ließen sich keine charakteristischen Unterschiede in der PoAk-Gruppe zeigen, in beiden Transplantiertengruppen war diese Zellpopulation gegenüber den Kontrollen signifikant erniedrigt.

5.7 Vorzeitige Alterung des Immunsystems

CD8+CD57+Zellen tragen charakteristische Merkmale terminaler Effektorzellen, wie kurze Telomerlängen und eine defekte Interleukin-2-Produktion, weshalb sie einen Zustand der „replicative senescence“ unter T-Lymphozyten definieren (Tarazona 2000, Batliwalla 2000, Brenchley 2002). Sie sind außerdem oft oligoklonaler Herkunft, stammen also aus der Teilung nur weniger Zellen (Gorochov 1994, Morley 1995, Batliwalla 1996). Auch ein Anstieg von NK-Zellrezeptoren auf T-Zellen wird in Zusammenhang mit Zelldifferenzierung und Alterung gebracht (Aspinall 2001, Pawelec 2002, Tarazona 2000).
Vorzeitige Alterung des Immunsystems wurde für Patienten mit Rheumatoider Arthritis beschrieben (Weyand 2002). Möglicherweise spielen bei transplantierten Patienten ähnliche Vorgänge eine Rolle.

5.8 Funktionelle Aspekte

Die vorliegende Studie beschreibt Lymphozytensubpopulationen rein phänotypisch. Für den Kliniker ergibt sich natürlich die Frage, welche funktionellen Folgen mit den beschriebenen Veränderungen assoziiert sein könnten. Handelt es sich um einen Zustand verbesserter Toleranz gegenüber dem Transplantat, der ein verbessertes Langzeitüberleben von Patient und Transplantat mit sich bringt und falls ja, ist der „Preis“ an möglichen langfristigen Nebenwirkungen im Sinne der Inzidenz von Malignomen und Autoimmunerkrankungen akzeptabel? Mangels prospektiver Daten gibt es hierauf nur wenige Antworten. Aufgrund des retrospektiven Ansatzes der vorliegenden Untersuchungen sind die verglichenen Patientengruppen möglicherweise in gewisser Weise vorselektioniert, funktionelle Aussagen lassen sich also nicht tätigen, wenngleich sich die untersuchten Patientengruppen nicht hinsichtlich ihrer Transplantatfunktion unterschieden.
Zu den unter den mit polyklonalen antilymphozytären Antikörpern behandelten Patienten vermehrt gefundenen CD8+CD57+Zellen liefert die Literatur unterschiedliche Angaben. Sie sind fast immer CD28-negativ und können so mangels dieses wichtigen „second signal receptors“ in der Zellkultur nicht proliferieren, befinden sich also in einem anergen Zustand (Kern 1996). Blockade der CD28-abhängigen Kostimulation von T-Zellen führt im Tierversuch zu verlängertem Transplantatüberleben und kann in vielen Fällen eine spenderspezifische Toleranz herbeiführen (Sayegh 1998). Verschiedene Autoren schreiben der Zellpopulation immunsuppressive und regulatorische Funktionen zu (Autran 1991, Gorochov 1994), und sie wird bei erwachsenen Langzeit-Nierentransplantierten gefunden (Halwani 1992). Demgegenüber wird auch eine Korrelation aus Expansion dieser Zellpopulation mit späten akuten Abstoßungsreaktionen sowie vermehrter Inzidenz von CMV-Infektionen beschrieben (Müller 1999). Hohe Zahlen an CD8+CD57+Zellen korrelieren in einem in vitro Modell mit vermindertem Untergang von CMV-infizierten Zielzellen und weisen außerdem eine fehlende TNF-alpha- sowie IFN-gamma-Produktion auf (Rowbottom 2000). Möglicherweise handelt es sich also um eine terminal differenzierte Effektorzelle mit herunterregulierter cytolytischer Funktion etwa im Sinne einer negativen Kontrolle bei persistierender Virusinfektion oder dauerhafter Antigenstimulation durch ein Transplantat (Mollet 1998).

Auch den sogenannten NK-T-Zellen werden regulatorische Eigenschaften zugeschrieben, angesichts verschiedener Cytokine, welche durch diese Zellen produziert werden können (Gapin 2001, Godfrey 2000, Strober 1996).
Der Mechanismus der „Homöostatischen Proliferation“ schließlich kann aufgrund der verstärkten Interaktion aus körpereigenen Peptiden und MHC mit immunkompetenten Zellen autoimmune Phänomene triggern, ein Vorgang, der sich auch durch die vermehrte Inzidenz von Autoimmunerkrankungen unter lymphopenischen Bedingungen sowie mit fortgeschrittenem Alter darstellt (Murali-Krishna 2000, Gleeson 1996, Mishra 1998). Welche Rolle diese Vorgänge im pädiatrischen nierentransplantierten Patienten spielen, ist nicht hinreichend bekannt.

5.9 Ausblick

Die vorliegende Untersuchung liefert Hinweise darauf, dass eine im Rahmen einer Nierentransplantation bei Kindern kurzfristig durchgeführte T-Zelldepletierende Therapie Veränderungen in der Zusammensetzung der Lymphozytensubpopulationen bedingt, die Jahre nach Transplantation nachweisbar sind und möglicherweise lebenslang bestehen bleiben. Angesichts der Komplexität der hierfür verantwortlichen immunologischen Vorgänge, lassen sich langfristige Folgen nicht vorhersagen.
Offensichtlich scheinen sich hier für das pädiatrische Patientengut charakteristische immunologische Besonderheiten der Lymphozytenregeneration und Homöostase widerzuspiegeln. Immunmodulierende Behandlungen bei Kindern sollten daher im Rahmen prospektiver Studien erfolgen, um ein besseres Verständnis des kindlichen Immunsystems -und insbesondere der ihm innewohnenden dynamischen Vorgänge- zu erlangen und darüber hinaus möglicherweise begünstigte langfristige Nebenwirkungen einschätzen zu können. Dies könnte der weiteren Optimierung von Therapieschemata dienen, denn gerade im pädiatrischen Bereich ist eine Therapieplanung, die die Langfristigkeit ihrer Folgen einbezieht, von immenser Wichtigkeit, denn der Patient hat ein ganzes Leben vor sich.

6. Zusammenfassung

Die Anwendung lymphozytendepletierender Antikörper führt bei erwachsenen nierentransplantierten Patienten zu charakteristischen langfristigen Veränderungen in der Zusammensetzung der Lymphozytensubpopulationen im Sinne einer neuen Homöostase.
Wenngleich wenig über langfristige Effekte bei pädiatrischen Patienten bekannt ist, werden antilymphozytäre Antikörper auch bei Kindern routinemäßig zur Induktionstherapie nach Transplantation eingesetzt. Das kindliche sich entwickelnde Immunsystem unterscheidet sich jedoch in vielerlei Hinsicht von dem eines erwachsenen Patienten, so dass sich die Frage stellte, ob eine solche Therapie zu Veränderungen in der Zusammensetzung der Lymphozytensubpopulationen auch bei Kindern führt, und welche Besonderheiten diese aufweisen.
In der vorliegenden Arbeit wurden 21 pädiatrische nierentransplantierte Patienten entsprechend ihrem initialen postoperativen Therapieregime ausgewählt und untersucht. In der Basisimmunsuppressionsgruppe (BI; n=11) wurden Patienten mit einer Basisimmunsuppression bestehend aus Cyclosporin, Azathioprin und Steroiden untersucht. Die zweite Gruppe umfasste solche Patienten, die zusätzlich zu der Basisimmunsuppression polyklonale Antilymphozytenantikörper (PoAk; n=10) zur Induktionstherapie erhalten hatten. Zum Zeitpunkt der Untersuchung lag die Transplantation durchschnittlich 3,7 Jahre zurück.
Eine dritte Gruppe nicht-transplantierter Kinder diente als Kontrollgruppe (n=46).
In allen drei Gruppen wurden Lymphozytenoberflächenmarker durchflusszytometrisch bestimmt und statistisch verglichen. In den Transplantiertengruppen wurde zudem eine weitere Messung nach einem Jahr durchgeführt. Hinsichtlich Alter, Geschlecht, Nierenfunktion und vorangegangenen Infektionen waren die Gruppen vergleichbar.
Die Gesamtlymphozytenzahlen, CD4+Zellen sowie das Verhältnis von Naiven- zu Memory- CD4+Zellen unterschieden sich nicht in den untersuchten Gruppen. Auffällig war jedoch der signifikant erniedrigte CD4:CD8Quotient in der PoAk-Gruppe sowie die signifikant erhöhten CD8+Zellzahlen und die höhere Expression von CD57+ auf den CD8+Zellen dieser Gruppe. Weiterhin zeichneten sich die Lymphozyten der PoAk-Gruppe durch eine erhöhte Anzahl doppelt positiver T-Zellen sowie einer erhöhten Koexpression von T-Zell- und NK-Zellmarkern aus. Beide Transplantiertengruppen wiesen gegenüber der Kontrollgruppe niedrigere NK-Zellen und B-Zellen auf.
Die für die PoAk-Gruppe gefundenen Veränderungen waren auch bei einer zweiten Messung nach einem Jahr nachzuweisen.
Die vorliegende Arbeit zeigt erstmals auch für pädiatrische Patienten, dass eine kurzfristig durchgeführte lymphozytendepletierende Therapie zu charakteristischen und konstanten Langzeitveränderungen führt. Diese unterscheiden sich von den für Erwachsene beschriebenen Veränderungen, vor allem durch eine geringere Einflussnahme auf die CD4+Lymphozytenpopulation im Gegensatz zu den CD8+Zellen. Möglicherweise ist dies Folge altersabhängig unterschiedlicher Regenerationswege dieser beiden Zellpopulationen.
Insbesondere zur Beurteilung möglicherweise mit den beschriebenen Veränderungen einhergehender funktioneller Besonderheiten im Sinne eines Einflusses auf das Transplantatüberleben können die vorliegenden Untersuchungsbefunde als Grundlage zukünftiger prospektiver Studien spezifischer Lymphozytenpopulationen dienen.

7. Literaturverzeichnis

Arbus GS, Rochon J, Thomson D
Survival of cadaveric renal transplant grafts from young donors and in young recipients
Pediatr Nephrol 1991, 5: 152-157

Aspinall R
Longevity and the immune response
Biogerontology 2000, 1(3): 273-278

Atkinson K, Hansen JA, Storb R, Goehle S, Goldstein G, Thomas ED
T cell subpopulations identified by monoclonal antibodies after human marrow transplantation. I. Helper-inducer and cytotoxic-supressor subsets
Blood 1982, 59(6): 1292-1298

Autran B, Leblond V, Sadat-Sowti B, Lefranc E, Got P, Sutton L, Binet JL, Debre P
A soluble factor released by CD8+CD57+ lymphocytes from bone marrow transplanted patients inhibits cell-mediated cytolysis
Blood 1991, 77(10): 2237-2241

Bach BA
Normal values: Definition of a reference range for lymphocyte subsets of healthy adults
Clinical monograph No.1; Becton Dickinson Immunocytometry Systems 1991

Bandres E, Merino J, Vazquez B, Inoges S, Morenoc C, Subira ML, Sanchez-Ibarrola A
The increase of IFN-gamma production through aging correlates with the expanded CD8(+high)CD28(-)CD57(+) subpopulation
Clin Immunol 2000, 96(3): 230-235

Bas J, Mestre M, Grinyó JM, Massip E, Alsina J, Castelao AM, Corominas M, Buendia E
Peripheral Blood Lymphoid Subsets and Long-Term Clinical Course of Kidney Recipients : A Longitudinal Study
Cytometry 1998, 34: 103-112

Batliwalla F, Monteiro J, Serrano D, Gregerson PK
Oligoclonality of CD8+ T cells in health and disease: aging, infection, or immune regulation?
Hum Immunol. 1996, 48(1-2): 68-76

Batliwalla F, Rufer N, Lansdorp P, Gregerson PK
Oligoclonal expansions in the CD8(+)CD28(-)T cells largely explain the shorter telomeres detected in this subset: analysis by flow FISH
Hum Immunol 2000, 61(10): 951-958

Bell L, Girardin C, Sharma A, Goodyer P, Mazer B
Lymphocyte subsets during and after anti-thymocyte globulin induction in pediatric renal transplantation: sustained T cell depletion
Transplant Proc 1997, 29(Suppl 7A): 6-9

Benoist C, Mathis D
T-Lymphocyte Differentiation and Biology
In: Paul. Fundamental Immunology. Fourth edition . Lippincott-Raven Publishers. Philadelphia 1999

Bernard A, Boumsell L, Dausset J, Milstein C, Schlossmann S
Proceedings of the First International Workshop and Conference on Human Leukocyte Differentiation Antigens
Springer-Verlag 1984

Bonnefoy-Bérard N, Revillard JP
Mechanisms of Immunosuppression induced by Antithymocyte Globulins and OKT3
The Journal of Heart and Lung Transplantation 1996, 15(5): 435-442

Bonnefoy-Bérard N, Vincent C, Revillard JP
Antibodies against functional leukozyte surface molecules in polyclonal antilymphocyte and antithymocyte globulins
Transplantation 1991, 51(3): 669-673

Brenchley JM, Karadikar NJ, Betts MR, Ambrozak DR, Hill BJ, Crotty LE, Casazza JP, Kuruppu J, Migueles SA, Connors M, Roederer M, Douek DC, Koup RA
Expression of CD57 defines replicative senescence and antigen-induced apoptotic death of CD8+ T cells
Blood 2003, 101(7): 2711-2720

Brent L
Immunoregulation: The search for the holy grail (chapter 6)
In: A history of transplantation. Immunology, Academic Press, 1997

Brion LP, Fleischmann AR, Mc Carton C, Schwartz GJ
A simple estimate of glomerular filtration rate in low birth weigh infants during the first year of life: noninvasive assessment of body composition and growth
J Pediatr 1986, 109: 698-707

Buchmann TE, Kershaw DB, Merion RM, Ham JM, Sedman AB, Walter MB, Kelsch RC
T cell subset analysis by flow cytometry during MALG induction for pediatric renal transplantation
Transplantation 1993, 55:1190-1193

Buysmann S, Bemelman FJ, Schellekens PT, van Kooyk Y, Figdor CG, ten Berge IJ
Activation and increased expression of adhesion molecules in peripheral blood lymphocytes is a mechanism for the immediate lymphocytopenia after administration of OKT3
Blood 1996, 87(1): 404-411

Canadian Multicenter Transplant Study Group
A randomized clinical trial of cyclosporine in cadaveric renal transplantation
N Engl J Med 1983, 309: 809-815

Carpenter C
Improving the Success of Organ Transplantation
N Engl J Med 2000, 342(9): 647-648

Chatenoud L, Baudrihaye MF, Chkoff N, Kreis H, Bach JF
Immunologic follow-up of renal allograft recipient treated prophylactically by OKT3 alone
Transplant Proc 1983, 15: 643-645

Cosimi AB, Burton RC, Kung PC, Colvin R, Goldstein G, Lifter J
Evaluation in primate renal allograft recipients of monoclonal antibody to human T-cell subclasses
Transpl Proc 1981, 13: 499-503

Cunnane G, O'Parrelly C
Regeneration of T cells after chemotherapy
N Engl J Med 1995, 332(24): 1650-1651

Dupuy d'Angeac A, Monier S, Jorgensen C, Gao Q, Travaglio-Encinoza A, Bologna C, Combe B, Sany J, Reme T
Increased percentage of CD3+, CD57+ lymphocytes in patients with rheumatoid arthritis
Arthritis and rheumatism 1993, 36(5): 608-612

Dai Z, Lakkis F
Cutting edge: Secondary lymphoid organs are essential for maintainig the CD4, but not CD8, naive T cell pool
J Immunol 2001, 167(12): 6711-6715

Delves PJ, Roitt IM
The immune system, first of two parts
N Engl J Med 2000, 343(1): 37-49

Denton MD, Magee CC, Sayegh MH
Immunosuppressive strategies in transplantation
Lancet 1999, 353 (9158): 1083-1091

Erkeller-Yuksel FM, Deneys V, Yuksel B, Hannet I, Hulstaert F, Hamilton C, Mackinnon H, Stokes LT, Munnyeshuli V, Vanlangendonck F et al.
Age-related changes in human blood lymphocyte subpopulations
The Journal of Pediatrics 1992, 120(2): 216-222

Ettenger R, Rosenthal J, Marik J
Improved cadaveric renal transplant outcome in children
Pediatr Nephrol 1991, 5: 137-142

Ettenger RB, Blifeld C, Prince H, Gradus DB, Cho S, Sekiya N, Salusky IB, Fine RN
The pediatric nephrologists‘ dilemma: growth after renal transplantation and its interaction with age as a possible immunologic variable
J Pediatr 1987, 111: 1022-1025

Ettenger RB, Rosenthal JT, Marik J, Forsythe SB, Malekzadeh MH, Kamil ES, Salusky B, Fine RN
Factors influencing the improvement in cadaveric renal transplant survival in pediatric recpients
Transplant Proc 1989, 21: 1693-1695

Ettenger RB, Rosenthal JT, Marik J, Malekzadeh M, Forsythe SB, Kamil ES, Salusky IB, Fine RN
Improved cadaveric renal transplantation outcome in children
Pediatr Nephrol 1991, 5: 137-142

Ettenger RB
Age and the immune response in pediatric renal transplantation
European Journal of Pediatrics 1992, 151: 7-8

Ettenger RB
New Immunosuppressive Agents in Pediatric Renal Transplantation
Transplant Proc 1998, 30: 1956-1958

Favrot M, Janossy G, Tidman N, Blacklock H, Lopez E, Bofill M, Lampert I, Morgenstein G, Powles R, Prentice HG, Hoffbrand AV
T cell regeneration after allogeneic bone marrow transplantation
Clin Exp Immunol 1983, 54(1): 59-72

Fleming AL, Field EH, Tolaymat N, Cowdery JS
Age influences recoveryof systemic and mucosal immune responses followind acute depletion of CD4 T cells
Clin Immunol Immunpathol 1993, 69:285-291

Forman SJ, Nocker P, Gallagher M, Zaia J, Wright C, Bolen J, Mills B, Hecht T
Pattern of T cell reconstitution followingg allogenic bone marrow transplantation for acute hematological malignancy
Transplantation 1982, 34(2): 96-98

Freitas AA, Rocha B
Population biology of lymphocytes: the flight for survival
Annu Rev Immunol 2000, 18: 83-111

Freitas AA, Rocha BB
Lymphocyte lifespans: homeostasis, selection and competition
Immunology today 1993, 14(1): 25-29

Freitas AA
Populationsbiologie der B-Lymphozyten
Aspekte 1999, 11: 20-28

Gapin L, Matsuda JL, Surh CD, Kronenberg M
NKT cells derive from double-positive thymocytes that are positively selected by CD1d
Nat Immunol 2001, 2(10): 971-978

Ge Q, Hu H, Eisen H, Chen J
Different contributions of thymopoiesis and homeostasis-driven proliferation to the reconstitution of naive and memory T cell compartments
Proc Natl Acad Sci USA 2002, 99(5): 2989-2994

Genestier L, Fournel S, Flacher M, Assossou O, Revillard JP, Bonnefoy-Bérard N
Induction of Fas (Apo-1, CD95)-mediated apoptosis of activated lymphocytes by polyclonal antithymocyte globulins
Blood 1998, 91(7): 2360-2368

George AJ, Ritter MA
Thymic involution with ageing: obsolescence or good house keeping?
Immunology Today 1996, 17(6): 267-272

Gleeson P , Toh BH, Driel IR van
Organ specific autoimmunity induced by lymphopenia
Immunol Rev 1996, 149: 97-125

Godfrey DI, Hammond KJ, Poulton LD, Smyth MJ, Baxter AG
NKT cells: facts, functions and fallacies
Immunol Today 2000, 21(11): 573-583

Gorochov G, Debré P, Leblond V, Sadat-Sowti B, Sigaux F, Autran B
Oligoclonal expansion of CD8+CD57+ T cells with restricted T-cell receptor beta chain variability after bone marrow transplantation
Blood 1994, 83 (2): 587-595

Grebe SO
Langzeitveränderungen in den Lymphozytensubpopulationen nach Nierentransplantation
Görich &Weiershäuser 2000

Guttman RD, Caudrelier P, Alberici G, Touraine JL
Pharmacokinetics, foreign protein immune response, cytokine release, and lymphocyte subsets in patients receiving Thymoglobulin and immunosuppression.
Transplant Proc 1997, 29(suppl 7A): 24-26

Hayakawa S, Saito S, Nemoto N, Chishima F, Akiyama K, Shiraishi H, Hayakawa J, Karasaki-Suzuki M, Fujii KT, Ichijo M et al.
Expression of recombinase-activating genes (RAG-1 and 2) in human decidual mononuclear cells
J Immunol 1994, 153(11): 4934-4939

Halwani F, Guttmann RD, Ste-Croix H, Prud'homme GJ
Identification of natural suppressor cells in long-term renal allograft recipients
Transplantation 1992, 54(6): 973-977

Harmon WE, Stablein D, Alexander SR, Tejani A
Graft thrombosis in pediatric renal transplant recipients; a report of the North American Pediatric Renal Transplant Cooperative Study
Transplantation 1991, 51: 406-412

Haynes BF, Denning SM, Singer KH
Human intrathymic T cell differentiation
Sem. Immunology 1990, 2(1): 67-77

Haynes BF, Denning SM. Lymphopoiesis
In: Stamatoyannopoulos: The molecular basis of blood diseases
Saunders 1994

Hazzan M, Labalette M, Noel C, Lelievre G, Dessaint JP
Recall response to cytomegalovirus in allograft recipients: mobilazation of CD57+, CD28+ before expansion of CD57+, CD28- cells within the lymphocyte compartment
Transplantation 1997, 63(5): 693-698

Holländer G, Fruman D, Bierer B, Burakoff SJ
Disruption of T cell development and repertoire selection by calcineurin inhibition in vivo
Transplantation 1994, 58(9): 1037-1043

Hoyer PF, Offner G, Brodehl J
Renal function and donor age: five years experience with cyclosporine A
Transplant Proc 1989, 21: 1930-1931

Imakita M, Tazelaar HD, Billingham ME
Heart allograft rejection under varying immunosuppressive protocols as evaluated by endomyocardial biopsy
J Heart Transplant 1986, 5(4): 279-285

Janeway C, Travers P
Gezielte Beeinflussung der Immunantwort
In: Immunolgie. Spektrum 1997: 503-537

Kerman RH
Immune monitoring considerations in transplantation
In: Flye MW: Principles of organ transplantation
Philadelphia: WB Saunders, 1989: 135-154

Kern F, Ode-Hakim S, Vogt K, Höflich C, Reinke P, Volk HD
The enigma of CD57+CD28-T cell expansion-anergy or activation?
Clin Exp Immunol 1996, 104(1): 180-184

Köhler G, Milstein C
Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specifity
Nature 1975, 256: 495-497

Labalette M, Salez F, Pruvot FR, noel C, Dessaint JP
Successive emergence of two CD8 subsets in primary CMV infection of allograft recipients
Transpl Int 1994, 7 Suppl 1: 611-617

Laine J, Jalanko H, Ronnholm K
Paeditric kidney transplantation
Ann Med 1998, 30(1): 45-57

Laske A, Gallino A, Schneider J, Bauer EP, Carrel T, Pasic M, von Segesser LK, Turina MI
Prophylactic cytolytic therapy in heart transplantation: monoclonal versus polyclonal antibody therapy
J Heart Lung Transplant 1992, 11: 557-563

Loken MR, Brosnan JM, Ault KA, Bach BA
Establishing optimal lymphocyte gates for immunphenotyping by flow cytometry
Cytometry 1990, 11: 453-459

Lynch S, Kelleher D, McManus R, O'Farrelly C
RAG-1 and RAG-2 expression in human intestinal epithelium: evidence of extrathymic T cell differentiation.
Eur J Immunol 1995, 25(5): 1143-1147

Mackall CL, Fleisher TA, Brown MR, Andrich MP, Chen CC, Feuerstein IM, Horowitz ME, Magrath IT, Shad AT, Steinberg SM et al.
Age, thymopoiesis, and CD4+ T-Lymphozyte regeneration after intensive chemotherapy.
N Engl J Med 1995, 332(3): 143-149

Mackall CL, Fleisher TA, Brown MR, Andrich MP, Clara CC, Feuerstein IM, Magrath IT, Wexler LH, Dimitrov DS, Gress RE
Distinctions between CD8+ and CD4+ T-Cell Regenerative Pathways Result in Prolonged T-Cell Subset Imbalance After Intensive Chemotherapy
Blood 1997, 89(10): 3700-3707

Mackall CL, Hakim FT, Gress RE
T-cell regeneration: All repertoires are not created equal
Immunology today 1997, 18(5): 245-251

Makino Y, Yamagata N, Sasho T, Adachi Y, Kanno R, Koseki H, Kanno M, Taniguchi M
Extrathymic development of Vα14-positive T cells
J Exp Med 1993, 177(5): 1399-1408

McEnery PT, Stablein DM, Arbus G
Renal transplantation in children: a report of the North American Pediatric Renal Transplant Cooperative Study
N Engl J Med 1992, 326: 1727-1732

Merino J, Martinez-Gonzales MA, Rubio M, Inoges S, Sanchez-Ibarrola A, Subira ML
Progressive decrease of CD8high+CD28+CD57- cells with ageing
Clin Exp Immunol 1998, 112(1): 48-51

Merion RM, Howell T, Bromberg JS
Partial T cell activation and anergy induction by polyclonal antithymocyte globulin
Transplantation 1998, 65(11): 1481-1489

Metchnikoff E
Etudes sur la resorption des cellules
Ann Inst Pasteur 1899, 13: 737

Michallet MC, Preville X, Flacher M, Fournel S, Genestier L, Revillard JP
Functional antibodies to leukocyte adhesion molecules in antithymocyte globulins
Transplantation 2003, 75(5): 657-662

Miller RA
Aging and immune function
In: Paul: Fundamental Immunology, Fourth Edition
Lippincott-Raven Publishers, Philadelphia 1999

Mishra N, Kammer GM
Clinical expression of autoimmune diseases in older adults
Clin Geriatr Med 1998, 14(3): 515-542

Mollet L, Sadat-Sowti B, Duntze J, Leblond V, Bergeron F, Calvez V, Katlama C, Debre P, Autran B
CD8hi+CD57+ T lymphocytes are enriched in antigen-specific T cells capable of down-modulating cytotoxic activity
Int Immunol 1998, 10(3): 311-323

Morley J, Batliwalla F, Hingorani, Gregersen PK
Oligoclonal CD8+ T cells are preferentially expanded in the CD57+ subset
J Immunolo 1995, 154(11): 6182-6190

Moudgil A, Jordan SC
Renal transplantation in infants and children
Indian J Pediatr 1999, 66(2): 263-275

Müller TF, Gicklhorn D, Jungraithmayr T, Eickmann M, Radsak K, Reschke M
Pattern and persistence of the epitope-specific IgM response against human cytomegalovirus in renal transplant patients
J Clin Virol 2002, 24(1-2): 45-56

Müller TF, Grebe SO, Neumann MC, Heymanns J, Radsak K, Sprenger H, Lange H
Persistent long-term changes in lymphocyte subsets induced by polyclonal antibodies
Transplantation 1997, 64: 1432-1437

Müller TF, Grebe SO, Reckzeh B, Borruta A, Radsak K, Lange H
Short- and Long-Term effects of Polyclonal Antibodies
Transplant Proc 1999, 31, Supplement: 12-15

Müller TF
Immunologisches Monitoring nach Organtransplantation
Pabst 1998

Müller TF
Long-term T cel dynamics following the use of polyclonal and monoclonal antibodies
Graft 1999, 2(1) Supplement: 15-20

Müller TF, Grebe SO, Neumann MC, Heymanns J, Radsak K, Sprenger H, Lange H
Persistent long-term changes in lymphocyte subsets induced by polyclonal antibodies
Transplantation 1997, 64(10): 1432-1437

Murali-Krishna K, Ahmed R
Cutting edge: Naive T cells masquerading as memory cells
J Immunology 2000, 165(4): 1733-1737

Neiberger R, Weiss R, Gomez M, Greifer I, Tellis VA, Matas AJ
Elimination kinetics of cyclosporine following oral administration to children whith renal transplants
Transplant Proc 1987, 19: 1525

Olsson J, Wikby A, Johansson B, Lofgrens S, Nilsson BO, Ferguson FG
Age-related change in peripheral blood T-lymphocyte subpopulations and cytomegalovirus infection in the very old: the Swedish longitudinal OCTO immune study
Mech Ageing Dev 2000, 20, 121(1-3): 187-201

Paul WE
T-lymphocyte differentiation and biology
Fundamental Immunology, Fourth Edition , Chapter 11. Lippincott-Raven Publishers, Philadelphia 1999

Pawelec G, Barnett Y, Forsey R, frasca D, Globerson A, Mc Leod j, Caruso C, Franceschi C, Fulop T, Gupta S, Mariani E, Mocchegiani E, Solana R
T cells and aging, January 2002 update
Front Biosci 2002, 7: 1056-1183

Potter D, Belzer FO, Rames L, Holliday MA, Kountz SL, Najarian JS
The treatment of chronic uremia in childhood. I. Transplantation
Pediatrics 1970, 45: 432-443

Preville X, Flacher M, LeMauff B, Beauchard S, Davelu P, Tiollier J, Revillard JP
Mechanisms involved in antithymocyte globulin immunosuppressive activity in a nonhuman primate model
Transplantation 2001, 71(3): 460-468

Rebellato LM, Gross U, Verbanac KM, Thomas JM
A comprehensive definition of the major antibodie specifities in polyclonal rabbit antithymocyte globulin
Transplantation 1994, 57 (5): 685-694

Revillard JP, Bonefoy-Berard N, Préville X, Fournel S, Genestier L, Flacher M, Baurmann H, Schwerdtfeger R, Tiollier J, Buffet R
Immunopharmacology of Thymoglobulin
Graft 1999, 2, Supplement: 6-9

Rocha B, Vassalli P, Guy-Grand D
Thymic and extrathymic origins of gut intraepithelial lymphocyte populations in mice
J. Exp. Med. 1994, 180: 681-686

Roederer M
Getting to the HAART of Tcell dynamics
Nature medicine 1998, 4(2): 145-146

Rowbottom AW, Garland RJ, Lepper MW, Kaneria SS, Goulden NJ, Oakhill A, Steward CG
Functional analysis of the CD8+CD57+cell population in normal healthy individuals and matched unrelated T-cell-depleted bone marrow transplant recipients
Br J Haematol 2000, 110(2): 315-321

Sayegh MH, Turka LA
The role of T-cell costimulatory activation pathways in transplant rejection
N Engl J Med 1998, 338(25): 1813-1821

Schroeder T, Superina R, Ettenger R
Monoclonal antibody therapy in pediatric transplantation-A series of teleconferences
Transplant Proc 1992, 24(1)

Schwartz GJ, Feld LG, Langford DJ
A simple estimate of glomerular filtration rate in full-term infants during the first year of life
Pediatrics 1984, 104: 849-854

Schwartz GJ, Haycock GB, Edelmann CM Jr, Spitzer A
A simple estimate of glomerular filtration rate in children derived from body length and plasma creatinin
Pediatrics 1976, 58: 259-263

Seikaly M, Ho PL, Emmett L, Tejani A
The 12th Annual Report of the North American Pediatric Renal Transplant Cooperative Study: renal transplantation from 1987 through 1998
Pediatr Transplant 2001, 5(3): 215-231

Soulillou, Cantarovich D, Le Mauff B, Giral M, Robillard N, Hourmant M, Him M, Jacques I
Randomized controlled trial of a monoclonal antibody against the interleukin-2 receptor (33B3.1) as compared with rabbit antithymocyte globulin for prophylaxis against rejection of renal allografts
New Engl J Med 1990, 322(17): 1175-1182

Spits H, Lanier LL, Philips JH
Development of Human T and Natural Killer Cells
Blood 1995, 85(10): 2654-2670

Sprent J, Surh CD
Cytokines and T cell homeostasis
Immunol Lett 2003, 85(2): 145-149

Starzl TE
Heterologous antilymphocyte globulin
New Engl J Med 1968, 279(13): 700-703

Storek J, Withersporn RP, Storb R
T cell reconstitution after bone marrow transplantation into adult patienta does not resemble T cell development early in life
Bone Marrow Transplant 1995, 16(3): 413-425

Strober S, Cheng L, Zeng D, Palathumpat R, Dejbakhsh-Jones S, Huie P, Sibley R
Double negative (CD4-CD8- alpha beta+)T cells which promote tolerance induction and regulate autoimmunity
Immunol Rev 1996, 149: 217-230

Surh C, Sprent J
Homeostatic T cell proliferation: How far can T cells be activated to self-ligands?
J Exp Med 2000, 192 (4): F9-F14

Tarazona R, DelaRosa O, Alonso C
Increased expression of NK cell markers on T lymphocytes in aging and chronic activation of the immune system reflects the accumulation of effector/senescent T cells
Mech Ageing Dev 2000, 20(121):77-88

Ten Berge RJ, Buysmann S, Bemelman FJ
OKT3 induced upregulation of adhesion molecules as a mechanism for peripheral blood lymphocytopenia
The Ninth International Congress of Immunology. San Francisco 1995, abstract 5109: 861

Troppmann C, Almond PS, Fasola C, Benedetti E, Gruessner RW, Dunn DL, Gores PF, Payne WD, Matas AJ, Najarian JS
Effect of Minnesota antilymphocyte globulin on T-lymphocytes and their subsets during induction therapy in pediatric renal transplantation
Transplant Proc 1994, 26: 26-27

Tuma R, Pamer E
Homeostasis of naive, effector and memory CD8 T cells
Curr Opin Immunol 2002, 14(3): 348-353

Wang E, Borysiewicz L
The role of CD8+CD57+ cells in cytomegalovirus and other viral infections
Scand J Infect Dis 1995, 99: 69-77

Warady BA, Hébert D, Sullivan EK, Alexander SR, Tejani A
Renal transplantation, chronic dialysis and chronic renal insufficiences in children and adolescents.
The 1995 Annual Report of the North American Pediatric Renal Transplant Cooperative Study
Pediatr Nephrol 1997, 11(1): 49-64

Weinberg K, Annett G, Kashyap A, Lenarsky C, Forman SF, Parkman R
The effect of thymic function on immunocompetence following bone marrow transplantation
Biology Blood Marrow Transplant 1995, 1(1): 18-23

Westermann J, Pabst R
Lymphocyte subsets in the blood: A diagnostic window on the lymphoid system?
Immunology today 1990, 11(11): 406-410

Weyand CM, Goronzy JJ
Premature immunosenescence in rheumatoid arthritis
J Rheumatol 2002, 29(6): 1141-1146

Whitington PF, Emond JC, Whitington SH, Broelsch CE, Baker AL
Small bowel length and the dose of cyclosporine in children after liver transplantation.
N Engl J Med 1990, 322(11): 733-738

Wong JT, Eylath AA, Ghobrial I, Colvin RB
The mechansim of anti-CD3 monoclonal antibodies. Mediation of cytolysis by inter-T cell bridging
Transplantation 1990, 50(4): 683-689

Yadin O, Grimm P, Ettenger R
Renal Transplantation in Children: Clinical Aspects
In: Holliday M, Barratt T, Avner E: Pediatric Nephrology. Williams & Wilkins 1993

8. Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
ALG	Antilymphozytenglobulin
ALS	Antilymphozytenserum
ATG	Antithymozytenglobulin
BD	Becton Dickinson
BI	Basisimunsuppression
bzw.	beziehungsweise
CD	Cluster of Differentiation
CMV	Cytomegalievirus
DNA	Desoxyribonukleinsäure
EBV	Epstein-Barr-Virus
EDTA	ethylene diamine tetraacetic acid (Äthylendiamintetraessigsäure)
FACS	Fluorescence activated cell sorting (Fluoreszenzaktivierte Durchflusszytometrie)
FITC	Fluoreszeinisothiozyanat
HLA	Human leukocyte antigen (Oberflächenantigene auf Leukozyten)
GFR	Glomeruläre Filtrationsrate
HAART	Hochaktive antiretrovirale Therapie
HIV	Human immunodeficiency virus (Humanes Immundefizienz Virus)
IgG	Immunglobulin
IL	Interleukin
KG	Körpergewicht
kg	Kilogramm
KOF	Körperoberfläche
MHC	Major histocompatibility complex (Haupthistokompatibilitätskomplex)
n	Number (Anzahl)
NK-Zellen	Natürliche Killerzellen
Nr.	Nummer
OKT3	monoklonaler anti T-Zellantikörper Orthoclone®
PE	Phycoerythrin
PerCP	Peridinchlorophyllprotein
PoAk	polyklonale Antikörper
RNA	Ribonukleinsäure
S.	Seite
Tab.	Tabelle
TCR	T-Zellrezeptor
TNF	Tumornekrosefaktor
Tot. gat. ev.	Total gated events

9. Verzeichnis der Abbildungen

Abb. 1: Das Lymphozyten-„gate“ **9**
Durchflusszytometrische und immunologische Darstellung der leukozytären Zellreihen.

Abb. 2: CD3+Zellen **15**
Dargestellt sind die Prozentanteile der CD3positiven Lymphozyten für alle drei Gruppen als Boxplots.

Abb. 3: CD3+/4+Zellen **15**
Dargestellt sind die CD3+/4+ Zellen in Prozent der Gesamtlymphozytenzahlen für alle drei Gruppen als Boxplots.

Abb. 4: CD3+/8+Zellen **16**
Dargestellt sind die CD3+/8+ Zellen in Prozent der Gesamtlymphozytenzahlen für alle drei Gruppen als Boxplots.

Abb. 5: CD3+/8+Zellen pro µl **16**
Dargestellt sind die CD3+/8+ Zellen in Zellen pro µl für die PoAk und die Kontrollgruppe als Boxplots.

Abb. 6: CD3+/4+/8+ **17**
Dargestellt sind die CD3+/4+/8+ Zellen in Prozent der Gesamtlymphozytenzahlen für alle drei Gruppen als Boxplots.

Abb. 7: CD4+:CD8+Quotient **17**
Dargestellt ist das Verhältnis aus CD4+ zu CD8+ Zellen für alle drei Gruppen als Boxplots.

Abb. 8: CD3+/8+/57+ **18**
Dargestellt sind die CD3+/8+/57+ Zellen in Prozent der Gesamtlymphozytenzahlen für alle drei Gruppen als Boxplots.

Abb. 9: CD3+/8+/57+ pro µl **18**
Dargestellt sind die CD3+/8+/57+ Zellen in Zellen pro µl für die PoAk- und Kontrollgruppe als Boxplots.

Abb. 10: Anteil aller CD8+Zellen mit CD57+ **19**
Dargestellt sind die CD57positiven Zellen als Prozent von CD8+Zellen für die PoAk- und die Kontrollgruppe als Boxplots

Abb. 11: CD45R0 und RA auf CD4-positiven T-Lymphozyten **19**
Dargestellt sind die prozentualen Verteilungen von CD45RA bzw. CD45R0 auf CD4+Zellen als Säulendiagramme.

Abb. 12: CD45R0 und RA auf CD8-positiven T-Lymphozyten **19**
Dargestellt sind die prozentualen Verteilungen von CD45RA bzw. CD45R0 auf CD8+Zellen als Säulendiagramme.

Abb. 13: CD45R0 auf CD8+Zellen **20**
Dargestellt ist der Prozentanteil der CD45R0-Expression auf CD8+Zellen für die BI- und die Kontrollgruppe als Boxplots.

Abb. 14: CD45RA auf CD8+Zellen **20**
Dargestellt ist der Prozentanteil der CD45RA-Expression auf CD8+Zellen für alle drei Gruppen als Boxplots.

Abb. 15: CD3+/2+/16+/56+ **21**
Dargestellt sind Zellen mit Expression von CD3, CD2, CD16 und CD56 in Prozent der Gesamtlymphozytenzahlen für alle drei Gruppen als Boxplots.

Abb. 16: CD3+/2+/16+/56+ pro µl **21**
Dargestellt sind Zellen mit Expression von CD3, CD2, CD16 und CD56 als Zellen pro µl für die PoAk und die Kontrollgruppe in Zellen pro µl.

Abb. 17: Anteil CD16+/56+ an CD3+/2+ **22**
Dargestellt sind der Prozentanteil von Zellen mit CD16 und CD56 Expression unter CD3+/2+ Zellen als Boxplots für die PoAk- und Kontrollgruppe.

Abb. 18: NK-Zellen **22**
Dargestellt sind NK-Zellen pro µl im Vergleich für alle drei Gruppen als Boxplots.

Abb. 19: B-Lymphozyten **23**
Dargestellt sind B-Lymphozyten in Prozent der Gesamtlymphozytenzahlen für alle drei Gruppen als Boxplots.

Abb. 20: B-Lymphozyten pro µl **23**
Dargestellt sind B-Lymphozyten pro µl im Vergleich für die PoAk- und die Kontrollgruppe als Boxplots.

Abb. 21: B-Lymphozyten mit HLA-DR **24**
Dargestellt sind B-Lymphozyten mit HLA-DR-Expression in Prozent der Gesamtlymphozytenzahlen für alle drei Gruppen als Boxplots.

Abb. 22: B-Lymphozyten mit HLA-DR pro µl **24**
Dargestellt sind B-Lymphozyten in Zellen pro µl für die PoAk- und die Kontrollgruppe als Boxplots.

Abb. 23: B-Lymphozyten mit CD5+ **25**
Dargestellt sind B-Lymphozyten mit CD5+Expression in Prozent der Gesamtlymphozytenzahlen für alle drei Gruppen als Boxplots.

Abb. 24: Anteil der B-Lymphozyten mit CD5+ **25**
Dargestellt ist der Prozentanteil der CD5+Expression unter den B-Lymphoyzten für alle drei Gruppen als Boxplots.

Abb. 25: alpha/beta- und gamma/delta-Rezeptoren auf T-Zellen **26**
Dargestellt sind die prozentualen Verteilungen der alpha/beta- bzw. gamma/delta-T-Zellrezeptoren als Säulendiagramme für alle drei Gruppen.

Abb. 26: Messansatz mit Antikörpern gegen CD3, CD4 und CD8 26
In der Abildung ist die Darstellung einer FACS-Analyse mit Antikörpern gegen CD3, CD4 und CD8 zu sehen. Das Verhältnis von CD4 zu CD8 ist erniedrigt

Abb. 27: Messansatz mit Antikörpern gegen CD3, CD8 und CD57 **27**
In der Darstellung ist eine FACS-Analyse mit Antikörpern gegen CD3, CD8 und CD57 zu sehen. Es handelt sich um die Probe eines Patienten aus der PoAk-Gruppe mit einem überdurchschnittlich hohen Anteil an CD57 exprimierenden CD3+/8+Zellen.

Abb. 28: Messansatz mit Antikörpern gegen CD3, CD2 und CD16/56 **27**
Beispiel eines Patienten mit einem überdurchschnittlich hohen NK-Zellanteil.

Abb. 29: Messansatz mit Antikörpern gegen CD45R0, CD45RA und CD4 **28**
Dargestellt ist die typische „keulenförmige“ Aufspaltung in naive und Memory-CD4-Zellen.

Abb. 30: Messansatz mit Antikörpern gegen CD45R0, CD45RA und CD8 **28**
Dargestellt ist das Beispiel eines Patienten mit einem typischen CD45RA- beziehungsweise CD45R0-Expression.

Abb. 31: Messansatz mit Antikörpern gegen CD3, CD19 und HLA-DR **29**
Darstellung der Expression des Aktivierungsmarkers HLA-DR auf T- und B-Zellen

Abb. 32: Messansatz mit Antikörpern gegen CD3, CD19 und CD5 **29**
Darstellung des CD5-Markers auf T- und B-Zellen

Abb. 33: Messansatz mit Antikörpern gegen CD3, gamma/delta- und alpha/beta-T-Zellrezeptoren **30**
Zu sehen ist die Typische Darstellung der T-Zellrezeptorverteilung.

Abb. 34: CD3 positive T-Zellen im Vergleich zwischen erster und zweiter Messung 30
Die Abbildung stellt die Anteile der CD3 positiven Zellen am Gesamtlymphozytenpool als Säulendiagramme in Prozent dar. Jeweils die erste und zweite Messung der beiden Patientengruppen sind nebeneinander dargestellt.

Abb. 35: CD4 und CD8 positive T-Zellen im Vergleich zwischen erster und zweiter Messung 31
Die Abbildung stellt die Anteile der CD4 sowie der CD8 positiven Zellen am Gesamtlymphozytenpool als Säulendiagramme in Prozent dar.

Abb. 36: CD4:CD8-Quotient im Vergleich zwischen erster und zweiter Messung 31
Dargestellt sind als Säulendiagramme die Quotienten aus CD4 zu CD8 jeweils für beide Patientengruppen, nebeneinander die Werte der ersten und zweiten Messung.

Abb. 37: CD45R0 und CD45RA auf CD4positiven T-Zellen im Vergleich zwischen erster und zweiter Messung 32
In der Abbildung sind jeweils benachbart als Säulendiagramme die Werte der ersten beziehungsweise zweiten Messung (in Prozent von CD4+Zellen) der beiden Patientengruppen dargestellt.

Abb. 38: CD45R0 und CD45RA auf CD8 positiven T-Zellen im Vergleich zwischen erster und zweiter Messung 32
In der Abbildung sind jeweils benachbart als Säulendiagramme die Werte der ersten beziehungsweise zweiten Messung (in Prozent von CD4+Zellen) der beiden Patientengruppen dargestellt.

Abb. 39: CD57-positive T-Zellen im Vergleich zwischen erster und zweiter Messung 33
Die Abbildung stellt die Anteile der CD57 positiven Zellen an CD3+/8+ Lymphozyten als Säulendiagramme in Prozent dar. Jeweils die erste und zweite Messung der beiden Patientengruppen sind nebeneinander dargestellt.

10. Verzeichnis der Tabellen

Tabelle 1: Ansätze der Dreifarbanalyse 11
Die Tabelle führt die Zusammensetzung der einzelnen Ansätze der Dreifarbanalyse auf.

Tabelle 2: Patientendaten 14
Die Tabelle zeigt die wichtigsten Patientendaten der beiden untersuchten Transplantiertengruppen.

Tabelle 3: Deskriptive Statistik und p-Werte 1. Messungen 34
Die Tabelle enthält Mittelwert, Median, Standardabweichung, Maximalwert und Minimalwert der in den verschiedenen Gruppen untersuchten Parameter sowie die p-Werte der Gruppenvergleiche.

Tabelle 4: Deskriptive Statistik und p-Werte 2. Messungen 34
Die Tabelle enthält Mittelwert, Median, Standardabweichung, Maximalwert und Minimalwert der in der PoAk und BI-Gruppe nach einem Jahr nachuntersuchten Parameter sowie die p-Werte der Vergleiche von Erst- und Zweitmessung.

11. Anhang

Lebenslauf

Marthe Katharina Mostert
geboren am 30.12.1974 in Frankfurt am Main
ledig, keine Kinder
wohnhaft: Matterstockstraße 19, 97080 Würzburg

Schulausbildung

08/1981-05/1994	Grundschule und Gymnasium in Frankfurt am Main

Studium

10/1994-06/2001	Studium der Humanmedizin an der Philipps-Universität Marburg
08/1996	Ärztliche Vorprüfung
08/1997	Erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
03/2000	Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
06/2001	Dritter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung

Beruflicher Werdegang

09/2001-03/2003	Ärztin im Praktikum in der Abteilung Infektiologie/Hepatologie der Med. Poliklinik der Universität Würzburg
03/2003-06/2003	Tätigkeit im Rahmen eines Drittmittelprojektes in der Infektiologie/Hepatologie der Med. Poliklinik der Universität Würzburg
Seit 07/2003	Weiterbildung zur Fachärztin für Innere Medizin am Kreiskrankenhaus Kitzingen

Verzeichnis der akademischen Lehrer

Meine akademischen Lehrer in Marburg waren die Damen und Herren:
Arnold, Aumüller, Aurich, Basler, Baum, Beato, Braasch, Daume, Drenckham, Egbring, Engel, Eschenbach, Fruhstorfer, Fuhrmann, Ganz, Gemsa, Geuss, Golenhofen, Gotzen, Gressner, Griss, Habermehl, Happle, Havemann, Heubel, Hilgermann, Huffmann, Ihm, Joseph, Kaffarnik, Kalbfleisch, Karlson, Kern, Kleinsasser, Klenk, Koolmann, Koop, Krause, Kretschmer, Krieg, Kroll, Kuni, Lange, Lauer, Lennartz, Lorenz, Lührmann, Maisch, Mannheim, Mannherz, Massarrat, Netter, Neurath, Peter, Pfab, Pohlen, Remschmidt, Richter, Riedmiller, Rothmund, Schachtschabel, Schindler, Schmidt, Schmitz-Moormann, Schneider, Schüffel, Schulz, Schwerk, Seitz, Seyberth, Siegel, Siegrist, Slenczka, Strempel, Sturm, Thomas, Ulshöfer, Unsicker, Vogel, Voigt, Wagner, von Wichert, Zelder

Danksagung

Bedanken möchte ich mich bei Herrn Professor Dr. G. Klaus für die Überlassung des Themas und die vielen wertvollen klinischen Hinweise.

Mein ganz besonderer Dank gilt Herrn PD. Dr. T. Müller, jetzt Boston für die vielfältigen inhaltlichen Anregungen und unzähligen wertvollen Diskussionen, ohne dessen konstruktive Kritik und stete Motivation die Durchführung dieser Arbeit sicherlich nicht möglich gewesen wäre.

Herzlich möchte ich mich bei Frau Dr. B. Reckzeh, jetzt Hildesheim für die kritische Durchsicht der vorliegenden Arbeit sowie bei ihr und den Mitarbeitern des hämatologischen Labors für die Unterstützung bei der Vorbereitung und Durchführung der FACS-Analysen bedanken.

Bedanken möchte ich mich außerdem bei Herrn Dr. S. O. Grebe für die Unterstützung bei der statistischen Bearbeitung der Daten.

Nicht zuletzt gehört mein Dank meiner Schwester, Verena Mostert, die mir bei der Aufbereitung der graphischen Darstellung durch ihre Computerkenntnisse zur Seite stand.

Ehrenwörtliche Erklärung

M. Katharina Mostert
geb.: 30.12.1974 in Frankfurt am Main
Matterstockstraße 19
97080 Würzburg

Würzburg, den 08.03.2004

Ich erkläre ehrenwörtlich, dass ich die im Fachbereich Humanmedizin Marburg zur Promotionsprüfung eingereichte Arbeit mit dem Titel: „Lymphozytensubpopulationen bei nierentransplantierten Kindern-Langzeitveränderungen nach Induktionstherapie mit polyklonalen Antilymphozytenantikörpern“ im Med. Zentrum für Kinderheilkunde unter der Leitung von Herrn Professor Dr. H. W. Seyberth mit Unterstützung durch Herrn Professor Dr. G. Klaus und Herrn PD. Dr. T. Müller sowie Frau Dr. B. Reckzeh ohne sonstige Hilfe selbst durchgeführt und bei der Abfassung der Arbeit keine anderen als die in der Dissertation aufgeführten Hilfsmittel benutzt habe. Ich habe bisher an keinem in- und ausländischen Medizinischen Fachbereich ein Gesuch um Zulassung zur Promotion eingereicht noch die vorliegende oder eine andere Arbeit als Dissertation vorgelegt.

Würzburg, den 08.03.2004

Katharina Mostert

Veröffentlichung

Auszüge der vorliegenden Arbeit sind in folgenden Publikationsorganen bereits erschienen:

Klaus G, Mostert K, Reckzeh B, Mueller TF.
Phenotypic changes in lymphocyte subpopulations in pediatric renal transplant patients after T cell depletion.
Transplantation 2003; 76(12): 1719-24
(Originalartikel)

Mueller TF, Reckzeh B, Borutta A, Grebe SO, Klaus G, Mostert KM, Lange H.
Lymphocyte regeneration and homeostasis in pediatric and adult renal transplant patients [Abstract].
FASEB Summer Research Conference on Transplantation Immunology, Vermont, June 15-20, 2002
(Poster)

Mueller TF, Klaus G, Grebe SO, Borutta A, Mostert KM, Lange H, Reckzeh B.
Novel lymphocyte homeostasis in pediatric and adult transplant patients after T cell depletion [Abstract].
Am J Transpl 2001; Suppl 1; 1: 435.
(Abstract und Poster)

Mueller TF, Reckzeh B, Klaus G, Grebe SO, Borutta A, Mostert KM, Lange H.
Lymphocyte regeneration after therapy with T cell antibodies.
FASEB Summer Research Conference, Vermont, June 24-29, 2000
(Poster)

Mostert KM, Reckzeh B, Borutta A, Grebe SO, Lange H, Müller TF
Lymphocyte regeneration after induction therapy with polyclonal T-cell antibodies [Abstract]
International Symposium on Renal Transplantation
Frankfurt am Main 02.-03.06.2000
(Abstract und Poster)

Klaus G, Mostert MK, Reckzeh B, Müller TF.
Lymphocyte subsets in pediatric transplant patients following T-cell antibody therapy [Abstract].
EDTA congress, Madrid 05.-08.09.99
(Abstract und Poster/Vortrag)

Müller TF, Reckzeh B, Klaus G, Grebe SO, Borutta A, Mostert MK, Lange H.
Lymphocyte regeneration after induction with polyclonal T-cell antibodies in pediatric and adult renal transplant patients [Abstract].
Basic Sciences Symposium, Monterey Peninsula, California, 25.-29.08.99
(Abstract und Poster)