

Aus der Medizinische Klinik mit Schwerpunkt Hämatologie, Onkologie
und Tumorimmunologie der Medizinischen Fakultät Charité –
Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

Zytotoxische Effekte von zwei Antithymozytenglobulin
Präparaten auf primäre humane Thymusstromazellen

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

vorgelegt der Medizinischen Fakultät
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Eva Marianne Käbisch

aus Gießen, Deutschland

Datum der Promotion: 06.09.2019

Meinen Eltern Sonja und Andreas Käbisch

Vorwort

Teile der in der nachfolgenden Dissertation präsentierten Daten und Ergebnisse waren Bestandteil einer von mir, Eva Käbisch, geboren am 04.10.1992 in Gießen, gehaltenen öffentlichen Posterpräsentation im Rahmen des internationalen *4th International Congress on Stem Cell Transplantation and Cellular Therapies (COSTEM)*, am 26.-29. Oktober 2017 in Berlin, Deutschland. Weiterhin wurden Teilergebnisse der vorliegenden Arbeit am 08.05.2019 zur Veröffentlichung bei *Transplantation* angenommen.

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	I
Abbildungsverzeichnis	IV
Tabellenverzeichnis	VI
Abkürzungsverzeichnis	VII
Zusammenfassung	X
Abstract	XII
1. Einleitung	1
1.1 Allogene hämatopoetische Stammzelltransplantation und Transplantat-gegen-Rezipient Erkrankung	1
1.2 Antithymozytenglobulin	3
1.3 Thymusfunktion und deren Bedeutung für die Immunrekonstitution nach einer allogenen hämatopoetischen Stammzelltransplantation	6
1.4 Zielstellung der Arbeit	9
2.1 Humanes Material	10
2.1.1 Humanes Thymusgewebe	10
2.1.2 Humanes Serum von gesunden Spendern	10
2.2 Zelllinien	10
2.3 Geräte	11
2.4 Verbrauchsmaterialien	12
2.5 Reagenzien und Chemikalien	13
2.6 Kits	15
2.7 Puffer und Medien	17
2.8 Antikörper und Fluoreszenzfarbstoffe	18
2.9 Software	19
3. Methoden	21
3.1 Zellkultur und Präparation	21
3.1.1 Enzymatischer Verdau von humanem Thymusgewebe und Isolation von humanen Thymusstromazellen	21
3.1.2 Etablierung der humanen Thymusstromazellkultur	22
3.1.3 Kultivierung von Jurkatzellen	23
3.1.4 Isolation frischer humaner Thymozyten	23

3.2 Durchflusszytometrie	23
3.2.1 Charakterisierung der kultivierten humanen Thymusstromazellen	24
3.2.2 Expansion von serumfrei kultivierten humanen Thymusstromazellen	25
3.2.3 rATG Bindung an humane Thymusstromazellen	26
3.2.4 Bestimmung der rATG-induzierten Apoptose in humanen Thymusstromazellen mittels Annexin V	26
3.2.5 Untersuchung des Apoptosemechanismus mittels Pan-Caspaseinhibitor Q-VD-OPh Hydrat	28
3.2.6 Antigenexpression auf der Jurkatzelllinie, frischen humanen Thymozyten und humanen kultivierten Thymusstromazellen	29
3.3 Mikroskopie und Immunhistochemie	30
3.3.1 Hämatoxylin-Eosin-Färbung von frischem, gefrorenem humanem Thymusgewebe	30
3.3.2 Lichtmikroskopische Untersuchung der Expansion von serumfrei kultivierten humanen Thymusstromazellen	31
3.3.3 Charakterisierung und rATG Bindung der kultivierten humanen Thymusstromazellen	31
3.3.4 Untersuchung der rATG Bindung an humane Thymusstromazellen mittels immunhistochemischer Färbung von ex-vivo schockgefrorenem, humanem Thymusgewebe	32
3.4 Statistik	32
4. Ergebnisse	34
4. 1 Gating Strategie der humanen Thymusstromazellen	34
4. 2 Charakterisierung der kultivierten humanen Thymusstromazellen	35
4.3 Expansion von serumfrei kultivierten humanen Thymusstromazellen	39
4.4 rATG Bindung an humane Thymusstromazellen	41
4.5 Bestimmung der rATG-induzierten Apoptose in kultivierten, humanen Thymusstromazellen mittels Annexin V Färbung	43
4.6 Untersuchung des Apoptosemechanismus mittels Pan-Caspaseinhibitor QVD	47
4. 7 Antigenexpression auf der Jurkatzelllinie, frischen humanen Thymozyten und humanen kultivierten Thymusstromazellen	47
5. Diskussion	49
5.1 Etablierung der primären humanen Thymusstromazellkultur	49
5.2 Beurteilung der Effekte von ATG und ATLG auf kultivierte humane Thymusstromazellen	51

5.3 Bewertungen der rATG-induzierten Zytotoxizität unter Beachtung klinisch relevanter Konzentrationen	56
5.4 Beurteilung der Ausgangshypothese und immunphänotypische Charakterisierung von Jurkatzellen, frischen Thymozyten und kultivierten humanen Thymusstromazellen	58
5.5 Schlussfolgerung	59
6. Literaturverzeichnis	61
Eidesstattliche Erklärung	71
Lebenslauf	72
Publikationsliste	74
Danksagung	75

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Hämatoxylin-Eosin-Färbung von <i>ex vivo</i> schockgefrorenem, humanem Thymusgewebe.	7
Abbildung 2: Darstellung des Versuchsaufbaus zur Ermittlung der Komplement-unabhängigen und Komplement-abhängigen Apoptose durch rATG.	28
Abbildung 3: Gating Strategie der humanen kultivierten Thymusstromazellen.	35
Abbildung 4: Etablierung der Epithelzellfärbung mit EpCAM mithilfe der Kolonkarzinom-Zelllinie HT-29.	36
Abbildung 5: Kulturmorphologie und durchflusszytometrische EpCAM Färbung.	37
Abbildung 6: Immunhistochemische Färbungen der Thymusepithelzellen in beiden Kulturansätzen.	38
Abbildung 7: Darstellung der unterschiedlichen Zellgruppen und deren Anteil im serumfreien Kultursystem.	39
Abbildung 8: Expansion der serumfrei kultivierten Thymusstromazellen.	40
Abbildung 9: Ki-67 Expression von EpCAM ⁺ und CD45 ⁻ Kulturzellen.	41
Abbildung 10: Bindung von ATG und ATLG an EpCAM ⁺ und EpCAM ⁻ Thymusstromazellen.	42
Abbildung 11: Bindung von ATG und ATLG an frisches, schockgefrorenes humanes Thymusgewebe.	43
Abbildung 12: Exemplarische Darstellung des durch ATG und ATLG ausgelösten, dosisabhängigen Zelltods.	44
Abbildung 13: rATG-induzierte Apoptose in kultivierten, humanen Thymusstromazellen.	45

-
- Abbildung 14: Vergleich der MFI der Annexin V⁺ Zellen zwischen EpCAM⁺ und EpCAM⁻ Zellen nach Inkubation mit verschiedenen rATG Konzentrationen. 46
- Abbildung 15: rATG-induzierte Apoptose in EpCAM⁺ kultivierten, humanen Thymusstromazellen unter Zugabe des Pan-Caspaseinhibitors QVD. 47
- Abbildung 16: Expression verschiedener Oberflächenmarker auf Jurkatzellen, frischen humanen Thymozyten und kultivierten humanen Thymusstromazellen. 49

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Zusammensetzung von Puffern und Medien.	17
Tabelle 2: Für Durchflusszytometrie verwendete monoklonale Antikörper.	18
Tabelle 3: Für Immunhistochemie verwendete Sekundärantikörper.	19
Tabelle 4: Verwendete Fluoreszenzfarbstoffe.	19
Tabelle 5: Verwendete Antikörper zur Charakterisierung der Antigenprofile von Jurkatzellen, frischen humanen Thymozyten und humanen Thymusstromazellen.	30

Abkürzungsverzeichnis

aGvHD	akute Transplantat-gegen-Rezipient Erkrankung, engl. <i>acute graft-versus-host-disease</i>
alloHSZT	allogene hämatopoetische Stammzelltransplantation
APC	Allophycocyanin
ATG	Antithymozytenglobulin
BSA	bovines Serumalbumin, engl. <i>bovine serum albumin</i>
CDC	Komplement-abhängige Zytotoxizität, engl. <i>complement-dependent cytotoxicity</i>
cGvHD	chronische Transplantat-gegen-Rezipient Erkrankung, engl. <i>chronic graft-versus-host-disease</i>
CIC	Komplement-unabhängige Zytotoxizität, engl. <i>complement-independent cytotoxicity</i>
Cy-3	Cyanin-3
DAPI	4',6-Diamidin-2-phenylindol
dH ₂ O	destilliertes Wasser
DMEM/Ham's F12	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium: Nutrient Mixture F-12</i>
eATG	Antithymozytenglobulin vom Pferd, engl. <i>equine anti-thymocyte globulin</i>
EpCAM	epitheliales Zelladhäsionsmolekül, engl. <i>epithelial cell adhesion molecule</i>
FACS	Fluoreszenz-abhängige Zellsortierung, engl. <i>fluorescence-activated cell sorting</i>
FCS	fetales Kälberserum, engl. <i>fetal calf serum</i>
FITC	Fluoreszein

G-CSF	Granulozyten-Kolonie-stimulierender Faktor, engl. <i>granulocyte-colony stimulating factor</i>
GvHD	Transplantat-gegen-Rezipient Erkrankung, engl. <i>graft-versus-host-disease</i>
GvL	Transplantat-gegen-Leukämie, engl. <i>graft-versus-leukemia</i>
HE	Hämatoxylin Eosin
HLA	humanes Leukozytenantigen, engl. <i>human leukocyte antigen</i>
IL-7	Interleukin-7
KGF	Keratinozyten Wachstumsfaktor, engl. <i>keratinocyte growth factor</i>
MFI	mittlere Fluoreszenzintensität, engl. <i>mean fluorescent intensity</i>
MHC	Haupthistokompatibilitätskomplex, engl. <i>major histocompatibility complex</i>
NegKtrl	Negativkontrolle
Pan-ZK	Pan-Zytokeratin
PB	<i>Pacific Blue</i>
PBMC	periphere mononukleäre Blutzellen, engl. <i>peripheral blood mononuclear cells</i>
PBSC	periphere Blutstammzellen, engl. <i>peripheral blood stem cells</i>
PE	Phycoerythrin
PerCP-Cy5.5	Peridinin Chlorophyll Protein Cyanin 5.5
PFA	Paraformaldehyd
PO	<i>Pacific Orange</i>

rATG	Antithymozytenglobulin vom Kaninchen, engl. <i>rabbit anti-thymocyte globulin</i>
RIC	Konditionierungsregime reduzierter Intensität, engl. <i>reduced intensity conditioning</i>
rlgG	Kaninchen Immunglobulin G, engl. <i>rabbit immunoglobulin G</i>
RPMI	<i>Roswell Park Memorial Institute</i>
RT	Raumtemperatur
SEM	Standardfehler des Mittelwerts, engl. <i>standard error of the mean</i>
TBS	Tris-gepufferte Lösung, engl. <i>Tris-buffered solution</i>
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
TSZ	Thymusstromazellen

Zusammenfassung

Einleitung: Trotz wissenschaftlicher Fortschritte stellt die Transplantat-gegen-Rezipient Erkrankung (engl. *graft-versus-host-disease*, GvHD) eine der häufigsten Ursachen für Morbidität und Mortalität nach der allogenen hämatopoetischen Stammzelltransplantation (alloHSZT) dar. Die Gabe von Antithymozytenglobulin aus Kaninchen (rATG) bietet eine Möglichkeit, GvHD nach einer alloHSZT zu reduzieren. Allerdings werden eine durch rATG hervorgerufene verzögerte Immunzellrekonstitution sowie eine daraus folgende erhöhte Infektanfälligkeit diskutiert. In der vorliegenden Arbeit wird die Fragestellung untersucht, ob die rATG Präparate Grafalon® und Thymoglobulin® eine Zytotoxizität gegenüber humanem Thymusgewebe aufweisen und damit die T-Zell Rekonstitution nach einer alloHSZT möglicherweise negativ beeinflussen.

Methoden: Zunächst wurden zur Etablierung einer humanen Thymusstromzellkultur zwei Ansätze zur Kultivierung von humanen Thymusstromazellen untersucht und der Anteil an Thymusepithelzellen mittels Durchflusszytometrie und Immunzytologie ermittelt. Es wurde die Bindung der beiden rATG Präparate an humane Thymusstromazellen und insbesondere an Thymusepithelzellen mittels Durchflusszytometrie und immunhistologischer Färbungen überprüft sowie deren komplementabhängige und -unabhängige Zytotoxizität ermittelt. Durch den Pan-Caspaseinhibitor Q-VD-OPh Hydrat wurde der Apoptosemechanismus durch die beiden rATG Präparate genauer untersucht. Weiterhin wurde die Expression ausgewählter Oberflächenantigene auf der Jurkatzelllinie, frischen humanen Thymozyten und humanen Thymusstromazellen charakterisiert.

Ergebnisse: Die beiden Kulturansätze zeigten unterschiedliche Anteile an EpCAM⁺ Thymusepithelzellen: der serumhaltige Ansatz wies maximal 5% an EpCAM⁺ Zellen auf, in der serumfreien Kultur konnten bis zu >50% EpCAM⁺ Zellen erreicht werden. Beide rATG Präparate zeigten eine vergleichbare, dosisabhängige Bindung an humane Thymusstromazellen. Weiterhin wiesen beide rATG Präparate eine dosisabhängige, weitgehend Komplement-unabhängige Zytotoxizität gegenüber humanen Thymusstromazellen auf. Die durch die beiden rATG Präparate induzierte Apoptose konnte nicht mittels eines Pan-Caspaseinhibitor unterdrückt werden. Bei der

Suche nach möglichen gemeinsamen Bindungsepitopen der zu untersuchenden Thymusstromazellen und der für die Produktion der rATG Präparate wichtigen Jukatzellen bzw. Thymozyten, konnten CD31, CD90 und HLA-DR auf Jurkatzellen und humanen Thymusstromzellen sowie CD31 und HLA-DR auf frischen humanen Thymozyten und humanen Thymusstromazellen als gemeinsame Oberflächenmarker identifiziert werden.

Schlussfolgerung: Beide rATG Präparate zeigen vergleichbare zytotoxische Effekte auf humane Thymusstromazellen und könnten somit die thymusabhängige T-Zell Rekonstitution nach alloHSZT negativ beeinflussen. Folglich unterstützen unsere Daten für den Klinikalltag eine Kombination von rATG mit Thymus-protectiven Therapiemöglichkeiten (z.B. IL-7 und Keratinozyten-Wachstumsfaktor), um eine suffiziente GvHD Prophylaxe zu ermöglichen und gleichzeitig eine verzögerte T-Zell Rekonstitution zu vermeiden.

Abstract

Introduction: Even though significant progress has been made, graft-versus-host disease (GvHD) still remains one of the most common causes for morbidity and mortality after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation (alloHSCT). Rabbit anti-thymocyte globulin (rATG) represents one possibility for reducing GvHD after alloHSCT. However, a delayed immune reconstitution and consequently, higher rates of infection following rATG treatment are being discussed. In the following investigation, we examined two commonly used rATG preparations, Grafalon® and Thymoglobulin®, in respect to their cytotoxic effects on human thymic stroma cells and therewith on proper T cell reconstitution after alloHSCT.

Methods: First, two different cell culture conditions were established and evaluated via flow cytometry and immunocytology regarding their amount of thymic epithelial cells. Moreover, the binding of both rATG preparations to human thymic stroma cells was compared by flow cytometry analysis and immunohistology stainings. Complement-dependent and -independent cytotoxicity of both rATG preparations towards human thymic stroma cells were assessed by flow cytometry analysis. The apoptosis mechanism was further analyzed by introducing the pan-caspase-inhibitor Q-VD-OPh hydrate. Additionally, we investigated the expression of selected antigens on the Jurkat cell line, fresh human thymocytes and cultured human thymic stroma cells.

Results: Within the compared cell culture systems, EpCAM⁺ human thymic epithelial cells developed differently. Whereas the serum-containing approach contained a maximum of 5% EpCAM⁺ thymic epithelial cells, the serum-free approach showed a fraction of up to 50%. Both rATG preparations showed a comparable dose-dependent binding to human thymic stroma cells. Both rATG preparations exerted a mostly complement-independent and dose-dependent cytotoxicity towards human thymic stroma cells. rATG-induced apoptosis could not be inhibited by a pan-caspase-inhibitor. A number of antigens are expressed on both Jurkat cells (CD31, CD90, HLA-DR) and cultured human thymic stroma cells or fresh thymocytes (CD31, HLA-DR) and cultured human thymic stroma cells.

Conclusion: Both rATG preparations exert similar cytotoxic effects on human thymic stroma cells, thus possibly hampering the thymus-dependent T cell reconstitution after alloHSCT. Consequently, our data supports a combined treatment of rATG and exogenous thymus-protective strategies (e.g. IL-7, keratinocyte growth factor), in order to simultaneously overcome delayed T cell reconstitution and offer sufficient GvHD prophylaxis.

1. Einleitung

1.1 Allogene hämatopoetische Stammzelltransplantation und Transplantat-gegen-Rezipient Erkrankung

Die alloHSZT stellt eine etablierte, kurative Therapieoption für die Behandlung vieler maligner und nicht-maligner hämatologischer Erkrankungen dar. Die Indikation für eine alloHSZT kann gestellt werden, wenn alternative Therapiemöglichkeiten mit einer schlechteren Prognose einhergehen würden, die Transplantation also hinsichtlich ihrer Morbidität und Mortalität anderen Therapien überlegen ist [1]. Vor einer alloHSZT erfolgt die sogenannte Konditionierungstherapie. Je nach Grunderkrankung und vorhandenen Komorbiditäten, Alter, Remissionsstatus, Rezidivrisiko sowie weiteren für die Prognose entscheidenden Faktoren, werden verschiedene Konditionierungsregime angewandt. Es können myeloablative und nicht-myeloablative Schemata, welche üblicherweise eine Kombination aus Chemo- und/oder Bestrahlungstherapie enthalten, sowie Konditionierungen mit reduzierter Intensität (engl. *reduced intensity conditioning, RIC*) vorbereitend auf eine alloHSZT erfolgen. Jede dieser Konditionierungstherapien hat neben der chemotherapeutischen Wirkung auf die malignen Zellen unter anderem zum Ziel, eine Immunsuppression zu erzeugen, um eine primäre Abstoßung des Transplantats durch körpereigene Abwehrzellen zu vermeiden und so ein Anwachsen der Spenderzellen (engl. *Engraftment*) zu ermöglichen. Zusätzlich existiert die Vorstellung, dass durch die Ablation des Empfängermarkes „Raum“ in der Knochenmarknische für die Spenderzellen geschaffen wird.

Auf Grund der durch die Konditionierung geschwächten bzw. fehlenden Immunabwehr entwickeln die Patienten ein hohes Infektionsrisiko, welches über die Dauer der Immunsuppression hinweg bestehen bleibt. Aus diesem Grund erfolgt in diesem Zeitraum eine spezielle Unterbringung der Patienten in keimarmen Räumlichkeiten sowie die Gabe verschiedener prophylaktischer Antiinfektiva. Die Stammzellen des Spenders können aus dem Knochenmark, dem peripheren Blut sowie aus Nabelschnurblut isoliert werden, wobei im Rahmen einer alloHSZT beim Erwachsenen

aktuell am häufigsten periphere Stammzellen (engl. *peripheral blood stem cells*, PBSC) verwendet werden [2]. Diese werden vor der Stammzellapherese im Spender mittels des rekombinant hergestellten Zytokins Granulozytenkolonie-stimulierender Fraktor (engl. *granulocyte-colony stimulating factor*, G-CSF) aus dem Knochenmark mobilisiert. Bei der Auswahl des Spenders ist die Kompatibilität der humanen Leukozytenantigen Moleküle (engl. *human leukocyte antigen*, HLA) entscheidend, welche eine Aussage über die Verträglichkeit der Spenderzellen mit dem Empfängergerewebe erlauben und so eine Abschätzung über das Risiko der Entstehung einer Alloreaktivität, der so genannten Transplantat-gegen-Rezipient Erkrankung (engl. *graft-versus-host disease*, GvHD), zulassen. Bei der Typisierung und Auswahl der Spender spielen vor allem die Gewebeantigene HLA-A, -B, -C, -DRB1 und DQB1 eine Rolle [3]. Besteht eine unzureichende HLA-Kompatibilität zwischen Spender und Empfänger, kann es zum Krankheitsbild der GvHD kommen, bei welcher eine akute oder chronische, durch alloreaktive Spender-T-Zellen hervorgerufene, systemische Inflammation auftritt. Diese alloreaktive Reaktion ist desto wahrscheinlicher, je weniger Gewebeantigene des Spenders mit denen des Empfängers übereinstimmen. Sie kann jedoch auch bei einer Spende auftreten, bei welcher alle bestimmten Gewebemarker des Spenders mit denen des Empfängers identisch sind. Prinzipiell kann die GvHD jedes Organ bzw. Organsystem betreffen, Hauptmanifestationen sind jedoch Haut, Leber und Darm [4]. Da die akute (aGvHD) und die chronische GvHD (cGvHD) mit einer erheblichen Morbidität und Mortalität assoziiert sind [4,5], widmen sich zahlreiche Studien dem Ermitteln der optimalen Transplantationsbedingungen, welche das Risiko für aGvHD und cGvHD so weit wie möglich reduzieren. Mehrere Arbeiten haben gezeigt, dass eine HLA-idente Familienspende, also von einer Spenderin bzw. einem Spender aus dem engeren Familienkreis, welche(r) 10/10 übereinstimmende HLA-Moleküle aufweist, einer HLA-identen Fremdspende sowie einer HLA-Mismatch (<10/10) oder haplo-identen Spende bezüglich des GvHD Risikos überlegen ist. Allerdings sollte hier das Alter und Geschlecht des Spenders beachtet werden, da beispielsweise eine HLA-idente Spende eines jungen Spenders einer HLA-identen Familienspende eines deutlich älteren Spenders ebenbürtig ist [6]. Lässt sich kein HLA-identer Familienspender finden, so kann dennoch eine alloHSZT mit Zellen HLA-identer Fremdspender, Mismatch- oder haploidenter Spender erfolgen, bei welcher das Risiko einer GvHD jedoch als erhöht eingeschätzt wird [7,8]. Weiterhin konnte

gezeigt werden, dass die cGvHD durch den mittlerweile weithin herkömmlichen Gebrauch von PBSC als Stammzellquelle in den letzten Jahren signifikant gestiegen ist [9]. Die auch bei einer Familienspende zur Prävention einer GvHD verabreichte Medikation bestehend aus Cyclosporin A oder Tacrolimus sowie Methotrexat oder Mycophenolat, kann in einem Hochrisiko-Setting beispielweise durch die Gabe des T-Zell-depletierenden Antikörpers Antithymozytenglobulin erweitert werden.

1.2 Antithymozytenglobulin

Neben klassischen Immunsuppressiva wird Antithymozytenglobulin zur GvHD Prophylaxe im Rahmen einer alloHSZT eingesetzt. Antithymozytenglobulin ist ein Gemisch polyklonaler Antikörper, welcher in Pferden (engl. *equine antithymocyte-globulin*, eATG) oder Kaninchen (engl. *rabbit antithymocyte-globulin*, rATG) hergestellt wird. Die zur Prophylaxe der GvHD verwendeten Präparate stammen überwiegend aus dem Kaninchen, da mehrere Analysen zeigen konnten, dass diese im Vergleich zu eATG eine deutlich stärkere Effektivität in der Reduktion der GvHD aufweisen [10]. Aktuell werden vor allem zwei rATG Präparate zur GvHD Prophylaxe verwendet. Zum einen Thymoglobulin® (Genzyme, Cambridge, MA, USA; im Folgenden ATG, im engl. *antithymocyte globulin*), welches durch die Immunisierung von Kaninchen mit humanen Thymozyten hergestellt wird. Zum anderen Grafalon® (Neovii Biotech, Gräfeling, Germany; im Folgenden ATLG, im engl. *Anti-T-lymphocyte globulin*), welches durch die Immunisierung von Kaninchen mit der humanen T-Zell Leukämie Zelllinie Jurkat hergestellt wird.

Mehrere kontrollierte, randomisierte Studien zeigten, dass durch die Hinzunahme von rATG in das Konditionierungsregime das Auftreten einer aGvHD sowie einer cGvHD nach alloHSZT reduziert werden kann [11-14]. Der Hauptmechanismus der rATG-Wirkung besteht in der T-Zelldepletion, welche zu einer Unterdrückung bzw. Eliminierung der alloreaktiven Spender T-Zellen führt [15,16]. Allerdings werden bei dieser Depletion neben T-Lymphozyten auch andere Immunzellen, beispielsweise B- und NK-Zellen sowie dendritische Zellen depletiert [17,18], sodass eine nachhaltige Suppression des Immunsystems die Folge ist [16]. rATG kann bis zu fünf Wochen im Serum von transplantierten Patienten nachgewiesen werden, wobei die herbeigeführte T-Zellsuppression bis zu 6 Monate andauern kann [19,20]. Mehrere randomisierte und

nicht-randomisierte Studien haben die Fragestellung, ob rATG auf Grund seiner starken und langanhaltenden Immunsuppression zu einer erhöhten Morbidität und Mortalität führt, untersucht. Zwei randomisierte kontrollierte Studien konnten dabei bei niedrigeren Dosen keine erhöhte Infektanfälligkeit durch rATG im Vergleich zu Patienten, die ohne rATG behandelt wurden, feststellen [14,21,22]. Allerdings konnte in einigen Arbeiten eine erhöhte Infektmortalität bei höheren rATG-Dosen beobachtet werden. In der Studie von Bacigalupo *et al.* zeigten Patienten, die 15 mg/kg ATG während der Konditionierung erhalten hatten, eine signifikant höhere infektbedingte Mortalität als Patienten ohne ATG. Dies galt allerdings nicht für Patienten, die lediglich eine Dosis von 7,5 mg/kg ATG erhalten hatten [21]. Auch andere Studien konnten zeigen, dass die Dosishöhe des eingesetzten ATG eine Auswirkung auf die Infektrate und -mortalität der Patienten zeigt [23-25]. Demgegenüber stehen Ergebnisse anderer Arbeiten, welche diese dosisabhängige Infektanfälligkeit nicht bestätigen konnten [26-28]. Weiterhin wird eine Reduktion des *Graft-versus-Leukemia* (GvL) Effekts durch rATG diskutiert. Bei diesem Effekt handelt es sich um einen immuntherapeutischen Effekt der Transplantation, bei welchem fremde Spender-T-Lymphozyten maligne (Leukämie-) Zellen des Empfängers als solche erkennen und zerstören. So ist auch das Phänomen zu erklären, dass Patienten, welche sich nach einer alloHSZT mit milden bis mittelschweren Zeichen einer chronischen GvHD präsentieren, ein besseres Gesamtüberleben und niedrigere Rezidivraten aufweisen als Patienten, die keine Zeichen einer GvHD zeigen [29-31]. Wie in der Übersichtsarbeit von Storek *et al.* diskutiert, scheint ein negativer Effekt von rATG auf die Rezidivraten transplanteder Patienten unter anderem von dem verabreichten Konditionierungsregime abhängig zu sein [32]. So ist in Studien, welche sämtliche Patienten, die myeloablative oder kombiniert myeloablative Konditionierungen und RIC beurteilen, keine erhöhte Rezidivrate durch rATG zu verzeichnen [14,21,23]. Entgegen dieser Ergebnisse zeigen Studien, welche nur Patienten mit einer RIC Konditionierung einschlossen, eine Assoziation von rATG mit erhöhten Rezidivzahlen [27,31,33]. rATG ist daher bislang lediglich bei Patienten mit einem hohen Risiko für GvHD empfohlen, stellt jedoch für diese Patientengruppe ein potentes Medikament zur Prävention und Bekämpfung der GvHD dar.

Obwohl beide rATG Präparate in Kaninchen produziert werden, weisen sie durch die verschiedenen Immunisierungsprozesse unterschiedliche Antigenprofile auf. Zur Produktion von ATG werden humane Thymozyten verwendet, wohingegen bei der Herstellung von ATLG die T-Zelllinie Jurkat verwendet wird. Daraus ergibt sich eine möglicherweise abweichende Effektivität der beiden rATG Präparate aufgrund unterschiedlicher Spektren an Bindungsepitopen und damit abweichenden zytotoxischen Effekten auf Organe der Patienten nach einer alloHSZT. Fokus dieser Arbeit war der Thymus.

Bisher haben sich nur wenige, nicht kontrollierte Studien mit dem Vergleich beider Präparate auseinandergesetzt, einige hiervon in einem experimentellen Setting. So konnten mehrere Arbeiten eine *in vitro* signifikant höhere Zytotoxizität durch ATG feststellen, wenn diese mit der durch ATLG verursachten Zytotoxizität verglichen wurde [18,34-36]. Neben experimentellen Untersuchungen, wurden die beiden rATG Präparate auch *in vivo* untersucht. Dabei ergab die Studie von Huang *et al.*, bei welcher das klinische Outcome nach ATG- oder ATLG-Gabe im Rahmen einer HLA-Mismatch alloHSZT untersucht wurde, nur marginale Unterschiede. Jedoch zeichnete sich ein Trend zu weniger cGvHD nach einer Therapie mit ATLG ab [37]. Eine weitere Studie konnte sogar eine signifikant bessere Reduktion von cGvHD durch ATLG zeigen [38]. In einer aktuellen Studie von Polverelli *et al.* wurde die GvHD Prophylaxe durch ATLG (30 mg/kg) und ATG (7,5 mg/kg) im Rahmen von unverwandten HLA-identen alloHSZT verglichen. Auch hier konnte eine signifikant verminderte Rate an moderater bis schwerer cGvHD nach ATLG verzeichnet werden. Zudem konnte ein Trend zu längerem Überleben nach ATLG beobachtet werden [39]. In einer anderen retrospektiven Untersuchung konnten wiederum keine signifikanten Unterschiede zwischen den beiden rATG Präparaten festgestellt werden [40]. Weiterhin konnten in der Arbeit von Remberger *et al.* zwar weniger unerwünschte Nebenwirkungen nach ATLG verzeichnet werden, allerdings zeigte sich auch mehr aGvHD nach ATLG- als nach ATG-Gabe [41].

Unsere Arbeitsgruppe konnte zeigen, dass ATG die Auswurfleistung des Thymus (= *thymic output*), welche einen indirekten Hinweis für die Thymusfunktion liefert, nach einer alloHSZT nachhaltig beeinträchtigt, wobei insbesondere die Reifung von CD4⁺ T-Helferzellen sowie die der regulatorischen T-Zellen gestört ist [42]. Die höchst

potente und potentiell gefährliche T-Zelldepletion durch ATG wird durch eine weitere Studie aus der pädiatrischen Hämatologie untermauert. Diese postuliert, dass lediglich sehr niedrige Dosen von ATG eingesetzt werden sollten, um neben dem erwünschten T-Zell-depletierenden Effekt eine optimale T-Zell Rekonstitution nach alloHSZT zu ermöglichen. Die Autoren vermuten, dass ATG auf Grund seiner Herstellungsweise mit human Thymozyten, eine signifikante Anzahl an Antikörpern gegen naive T-Zellrezeptoren aufweist. Ebenso konnten sie feststellen, dass Patienten mit hohen Serumkonzentrationen von ATG ein kürzeres ereignisfreies-freies Überleben zeigen [43]. All diese Erkenntnisse lassen vermuten, dass ATG eine potentere, jedoch auch eine weniger T-Zell-spezifische Zytotoxizität aufweist, welche mit hoher Wahrscheinlichkeit auf das Produktionsverfahren des Antikörpers zurückzuführen ist.

1.3 Thymusfunktion und deren Bedeutung für die Immunrekonstitution nach einer allogenen hämatopoetischen Stammzelltransplantation

Der Thymus gehört wie das Knochenmark zu den primär lymphatischen Organen. Die Hauptaufgabe des Thymus besteht in der Reifung der T-Zellen, welche als unreife Progenitoren aus einer multipotenten hämatopoetischen Stammzelle im Knochenmark gebildet werden und daraufhin in den Thymus migrieren. Der menschliche Thymus zeigt eine klare Aufteilung in einen durch eine hohe Zellularität gekennzeichneten Kortex und eine weniger zellreiche Medulla. Im Kortex finden sich vor allem reife T-Zellen, so genannte Thymozyten, und vereinzelte Makrophagen. In der Medulla finden sich neben reiferen T-Zellvorläufern und Makrophagen auch dendritische Zellen und B-Zellen. Neben diesen Zelltypen findet sich im gesamten Thymus zusätzlich ein Netzwerk aus Epithel endodermalen Ursprungs, das Thymusstroma, welches ein optimales Mikromilieu für die T-Zellreifung schafft und für diese essentiell ist; ähnlich der Bedeutung des Knochenmarkstromas für die B-Zellreifung [44,45]. So können die Thymusepithelzellen mittels des Notch Signalwegs die Expression spezifischer Gene in Thymozyten induzieren und damit deren Reifungsprozess initiieren [46]. Auch die Thymozyten können das sie umgebende Epithel beeinflussen. Um den für die Reifung notwendigen Kontakt zwischen Thymusepithel und Thymozyten für alle im Thymus

vorhandenen T-Zellvorläufer zu ermöglichen, induzieren diese eine retikuläre Struktur im Epithelzellverband [47].

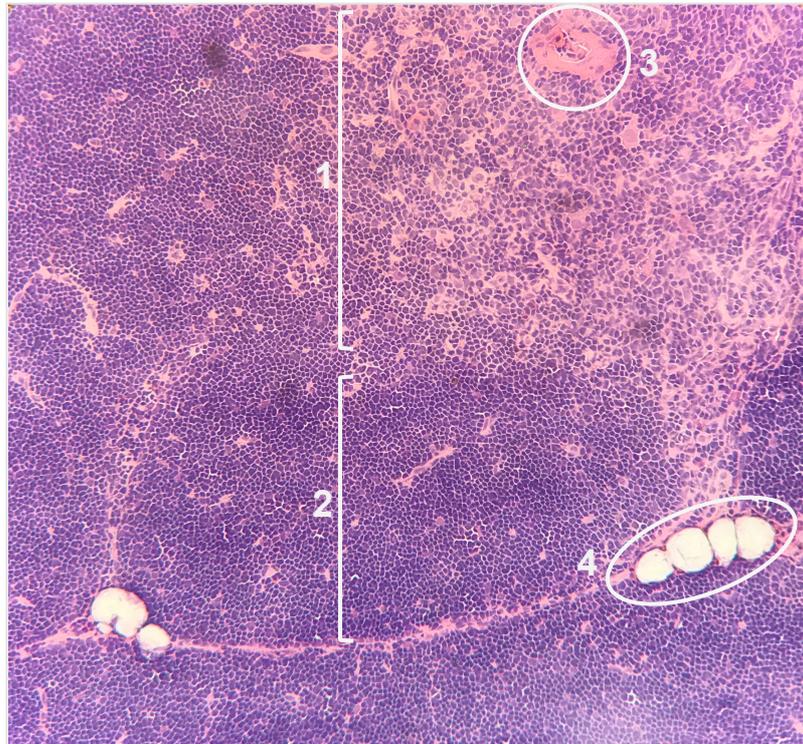


Abbildung 1: Hämatoxylin-Eosin-Färbung von *ex vivo* schockgefrorenem, humanem Thymusgewebe.

1: Weniger zellreiche Medulla; 2: Zellreicher Kortex; 3: Hassall Körperchen; 4: interlobuläres Fettgewebe.

Die Thymusentwicklung beginnt beim Menschen bereits während der frühen Embryonalentwicklung. Noch während der Entwicklung kommt es zu einer Besiedlung mit hämatopoetischen Zellen, welche die Struktur des Thymus maßgeblich beeinflussen [47]. Im Gegensatz zu Mäusen, bei welchen die Entwicklung des Thymus nach der Geburt noch weitere 3-4 Wochen andauert, ist der menschliche Thymus bei der Geburt vollends entwickelt [44]. Während der Kindheit und bis zur Pubertät erreicht der Thymus sein Maximum an T-Zellproduktion. Die Rolle des Thymus wird unter anderem bei der Betrachtung des DiGeorge-Syndroms deutlich, bei welchem die Betroffenen neben weiteren Anomalien an einer Thymusaplasie leiden und daher zwar B-Zellen, jedoch nur sehr wenige bis keine funktionstüchtigen T-Zellen herstellen können [48]. Dahingegen konnten mehrere Studien, welche die Folgen einer Thymektomie im Säuglings- bzw. Kindesalter bei offener Herzchirurgie untersuchten,

zwar langfristige Veränderungen innerhalb der verschiedenen T-Zell-Subpopulationen nachweisen, jedoch keinerlei klinische Relevanz dieser Veränderungen eruieren [49-52]. Demnach kann vermutet werden, dass sobald ein T-Zellrepertoire etabliert ist, die Immunität auch ohne signifikante Zunahme der T-Zell-Rezeptor Diversität, also weitgehend thymusunabhängig, erhalten werden kann. Beim gesunden Erwachsenen findet eine T-Zell Expansion entweder als Antwort auf eine Antigenstimulation oder aber auf Grund einer Lymphopenie, als sogenannte homöostatische periphere Expansion, statt. Letztere wird hauptsächlich durch schwache Bindung an Selbstantigene in Verbindung mit hohen Zytokinkonzentrationen (z.B. IL-15, IL-2 und IL-7) getriggert, welche unter anderem durch den fehlenden Verbrauch dieser Zytokine bei einer Lymphopenie vorliegen können [53,54].

Wie bereits unter 1.1 besprochen, kommt es bei Patienten im Rahmen der alloHSZT zu einer starken Immunsuppression. Neben der antileukämischen Wirkung der Konditionierungstherapie kompromittiert diese als Nebeneffekt maßgeblich sowohl die Immunantwort des Empfängers während als auch die Immunrekonstitution nach der Transplantation. Hierbei ist insbesondere die Rekonstitution der adaptiven Immunabwehr prolongiert, während die angeborene Immunabwehr (z.B. neutrophile Granulozyten, Monozyten und Natürliche Killerzellen) sich innerhalb von zwei bis vier Wochen rehabilitiert [55,56]. Es konnte gezeigt werden, dass es im Rahmen der T-Zell-Rekonstitution zunächst durch die vorherrschende Lymphopenie getriggert zu einer peripheren Expansion transplantiert T-Zellen des Spenders bzw. überlebender Empfänger-T-Zellen kommt [57]. Diese T-Zellen haben jedoch keine Möglichkeit einer zentralen Toleranzentwicklung und stellen potentielle Mediatoren der GvHD dar. Weiterhin kann angenommen werden, dass das durch die periphere Expansion entstehende T-Zell-Rezeptor Repertoire begrenzt ist und damit in der hochsensiblen Phase nach einer alloHSZT nur unzureichend vor Krankheitserregern schützt. Die später folgende *de novo* Produktion naiver Spender T-Zellen im Thymus des Empfängers ist demnach essentiell für eine vollständige T-Zellrekonstitution nach einer alloHSZT [53,58-60]. Hierbei muss die T-Zellneubildung, also die Reifung naiver Spender-T-Zellen im Thymus des Empfängers ablaufen. Diese bereits unphysiologische Situation kann zusätzlich durch die zuvor verabreichte Konditionierungstherapie, das Auftreten einer GvHD (unter anderem des Thymus)

sowie deren Therapie erschwert werden [56,61,62]. So lieferte eine Studie Hinweise darauf, dass Chemo- und Strahlentherapien im Rahmen der Konditionierung direkt das murine Thymusstroma schädigen, insbesondere Thymusepithelzellen [63]. Überdies konnte im Mausmodell gezeigt werden, dass alloreaktive T-Zellen im Rahmen einer GvHD des Thymus die Struktur sowie das stromale Mikromilieu des Thymus beschädigen [53,64]. Da die T-Zell Reifung bedeutend von der Architektur des Thymus abhängig ist (siehe Abschnitt 1.3.1), führt eine solche Schädigung zu einer verlängerten T-Lymphopenie und damit zu einer kompromittierten Immunabwehr. Weiterhin bestätigte eine Studie unserer Arbeitsgruppe, dass das rATG Präparat ATG als Teil der Konditionierung die thymusabhängige T-Zell Rekonstitution signifikant verlangsamt [35].

1.4 Zielstellung der Arbeit

Neben der erwünschten Prophylaxe einer GvHD führt rATG durch eine Depletion von T-Zellen und anderen Immunzellen zu einer ausgeprägten Immunsuppression nach alloHSZT, welche zu einer erhöhten infektbedingten Morbidität und Mortalität der Patienten führen kann.

Es ergibt sich die Hypothese, dass ATG aufgrund seiner Herstellungsweise ein breiteres Wirkungsspektrum als ATLG aufweist und damit eine verstärkte zytotoxische Wirkung auch gegenüber Zellen des Thymusstromagewebes zeigt. Das Ziel dieser Arbeit ist die Untersuchung und der Vergleich der beiden beschriebenen rATG Präparate - ATG und ATLG - in ihrem Bindungsverhalten sowie ihrer zytotoxischen Aktivität gegenüber primären humanen Thymusstromazellen. Es erfolgte die Etablierung einer primären humanen Thymusstromazellkultur, die Durchführung verschiedener funktioneller Assays sowie immunhistologischer Färbungen. Weiterhin sollten mögliche gemeinsame Bindungsepitope auf kultivierten Thymusstromazellen und Jurkatzellen bzw. humanen Thymozyten eruiert werden.

2. Materialien

2.1 Humanes Material

2.1.1 Humanes Thymusgewebe

Für die vorliegende Arbeit wurde uns das humane Thymusgewebe freundlicherweise von Frau Mi-Young Cho aus der Klinik für Chirurgie angeborener Herzfehler des Deutschen Herzzentrums Berlin zur Verfügung gestellt. Das verwendete humane Thymusgewebe wurde Kindern im Alter von 6 Tagen bis 5 Jahren entnommen, bei welchen aufgrund eines angeborenen Herzfehlers im Rahmen einer Operation am offenen Herzen eine Sternotomie vorgenommen wurde. Die Eltern der Kinder gaben im Voraus der Operation ihr Einverständnis zur Teilnahme an der Studie. Es liegt ein Ethikvotum (EA1/233/09) vor.

2.1.2 Humanes Serum von gesunden Spendern

Zur Untersuchung der rATG-induzierten Apoptose in Abhängigkeit des humanen Komplementsystems wurde humanes Serum von zwei gesunden Probanden gewonnen. Diese gaben zuvor ihr Einverständnis.

2.2 Zelllinien

Die humane T-Zell Lymphoblasten Zelllinie Jurkat wird zur Immunisierung von Kaninchen bei der Herstellung des rATG Präparats ATLG verwendet. Aus diesem Grund wurden mögliche Überschneidungen der Antigenexpression von Jurkatzellen, kultivierten humanen Thymusstromazellen sowie humanen Thymozyten untersucht. Die humane Kolonkarzinom Zelllinie HT-29 diente als Positivkontrolle bei der Etablierung der Epithelfärbung (CD236 = EpCAM) mittels Durchflusszytometrie.

2.3 Geräte

Brutschrank Forma Steri-Cycle	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
Inkubationshaube Certomat H	B. Braun, Melsungen, Deutschland
Bakterienschüttler Certomat R	B. Braun, Melsungen, Deutschland
Durchflusszytometer LSRII	BD Biosciences, Franklin Lakes, NJ, USA
Gefrierschrank -80 °C UF755G	Domestic Medical Systems, Hosingen, Luxemburg
gentleMACS™ Dissociator	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Deutschland
Kryotom CM 1950	Leica, Wetzlar, Deutschland
Kühl- und Gefrierschrank KGK2833	Liebherr, Biberach an der Riß, Deutschland
Mikropipetten (0.1 µl – 1000 µl)	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Mikroskop Axio Scope.A1	Carl Zeiss AG, Oberkochen, Deutschland
Mikroskop BX300	Will, Wetzlar, Deutschland
Mr. Frosty™ Freezing Container	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
pH-Meter inoLab pH Level 1	WTW, Weilheim, Deutschland
Pipettierhilfe Pipetus® Akku	Hirschmann Laborgeräte, Eberstadt, Deutschland
Präzisionswaage M-Prove AY123	Sartorius, Göttingen, Deutschland
Präzisionswaage R200D	Sartorius, Göttingen, Deutschland
Schüttler KM-2 Akku	Edmund Bühler, Hechingen, Deutschland
Sterilbank HERAsafe® (Klasse II)	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA

Sterilbank LaminAir 2010 1.2 (Klasse II)	Heto-Holten, Allerød, Dänemark
Vortex-Genie 2	Scientific Industries, New York, USA
Wasserbad WBT12	Medingen, Arnsdorf, Deutschland
Zellzählkammer Neubauer (0.100 mm/0.0025 mm ²)	Laboroptik, Lancing, Vereinigtes Königreich
Zentrifuge Heraeus Fresco 17	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
Zentrifuge Heraeus Multifuge 3SR+	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA

2.4 Verbrauchsmaterialien

Cryotubes (1.6 ml)	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
Deckgläser 24x32mm, Glasdicke 0,13-0,16mm	R. Langenbrinck GmbH, Emmendingen, Deutschland
gentleMACS™ C Tubes (15 ml)	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Deutschland
Glasküvetten, verschiedene Größen	DURAN®, Wertheim, Deutschland
Konische Zentrifugenröhrchen Falcon® (15 ml, 50 ml)	BD Biosciences, Franklin Lakes, NJ, USA
Objektträger HistoBond®	Marienfeld, Lauda-Königshofen, Deutschland
Petrischale 100mm, Falcon™	Corning, Corning, NJ, USA
Pinzette, spitz	Medishop, Markgröningen, Deutschland
Pipettenspitzen (10 µl, 100 µl, 1000 µl)	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
Reagiergefäße SafeSeal® (0.5 ml, 1.5 ml, 2 ml)	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland

Rotilabo®-Einmal-Wägeschalen, verschiedene Größen	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Rundbodengefäße (5 ml) Falcon® mit/ohne Zellsieb (35 µm) (Polystyrene)	BD Biosciences, Franklin Lakes, NJ, USA
Schere, gerade	Medishop, Markgröningen, Deutschland
Schere, schräg	Karl Hammacher GmbH, Solingen, Deutschland
Schmalband-Einwegklingen, Typ 819	Leica, Wetzlar, Deutschland
Serologische Pipetten (5 ml, 10 ml, 25 ml) Falcon®	Corning, Corning, NJ, USA
Tiefkühl-Objektträgerkasten True North®, verschiedene Größen	Sakura, Alphen aan den Rijn, Niederlande
Vakuumfiltrationseinheit Filtropur V50 500ml, 0,22µm	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
Zellkulturplatten 6-Loch, flacher Boden (Polystyrene)	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
Zellkulturplatten 6-Loch, mit Kollagen I beschichtet	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
Zellsieb (100 µm) Falcon®	BD Biosciences, Franklin Lakes, NJ, USA

2.5 Reagenzien und Chemikalien

2-Methylbutan, ReagentPlus®, ≥99%	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Ampuwa Wasser für Injektionszwecke (destilliert)	Fresenius, Bad Homburg, Deutschland
Antibody Diluent	DAKO Agilent, Santa Clara, CA, USA

Bovines Serumalbumin (BSA), lyophilisiert	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Dimethylsulfoxid (100%)	Calbiochem, Bad Soden, Deutschland
Dulbecco's Modified Eagle Medium, Nutrient Mixture F-12 (DMEM/F12)	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
DNase I rekombinant, RNase-frei	Roche, Basel, Schweiz
Essigsäure 96%	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Ethanol, absolut (>96%)	J.T. Baker, Pennsylvania, USA
Flebo- γ , humanes IgG	Grifols, Frankfurt am Main, Deutschland
FACS Clean	BD Biosciences, Franklin Lakes, NJ, USA
FACS Flow	BD Biosciences, Franklin Lakes, NJ, USA
FACS Rinse	BD Biosciences, Franklin Lakes, NJ, USA
FCS (hitze-inaktiviert)	Merck Millipore, Darmstadt, Deutschland
Fluoromount G	SouthernBiotech, Birmingham, AL, USA
Grafalon ®	Neovii Biotech GmbH, Gräfeling, Deutschland
Insulin/Transferrin/Selen (IST-G) (100x)	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
Kaninchen IgG Isotypkontrolle, pur	BD Biosciences, Franklin Lakes, NJ, USA
Kaninchen Komplement, lyophilisiert	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Kollagen I vom Rattenschwanz	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Kollagenase A	Roche, Basel, Schweiz

Natriumchlorid, EMSURE®	Merck Millipore, Darmstadt, Deutschland
Normalserum Esel, unkonjugiert	Dianova, Hamburg, Deutschland
Normalserum Ziege, unkonjugiert	Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA
Paraformaldehyd, ≥95,0%	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
PBS (1x) Gibco®	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
Penicillin/Streptomycin	Merck Millipore, Darmstadt, Deutschland
RPMI 1640 Medium	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
Thymoglobulin®	Sanofi Genzyme, Cambridge, MA, USA
Tissue-Tec™ O.C.T. (Optimal Cutting Compound)	Sakura, Alphen aan den Rijn, Niederlande
Triton™ X-100	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Trizma® base	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Trizma® Hydrochlorid, ≥99,0%	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Trypsin/EDTA 0,5% (10x)	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
Vitro-Clud®	R Langenbrinck GmbH, Emmendingen, Deutschland

2.6 Kits

CompensationBeads, anti-mouse Igk	BD Biosciences, Franklin Lakes, NJ, USA
FITC Annexin V Apoptosis Detection Kit I	BD Biosciences, Franklin Lakes, NJ, USA
FoxP3 / Transcription Factor Staining Buffer Set	eBioscience™, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA

LIVE/DEAD® Fixable Aqua Dead Cell
Stain Kit

Molecular Probes®, Eugene, Oregon,
USA

2.7 Puffer und Medien

Tabelle 1: Zusammensetzung von Puffern und Medien.

Puffer/Medium	Zusammensetzung
FACS-Puffer	PBS, 2% Flebo-γ
Fixierungslösung Immunhistologie	TBS, 4%PFA, 1%BSA
RPMI Medium	RPMI, 10%FCS, 1% Penicillin/Streptomycin
Serumhaltiges Medium	DMEM/Ham'S F12 (1:1) , 10% FCS, 1% Penicillin/Streptomycin
Serumfreies Medium	DMEM/Ham'S F12 (1:1), 0,5 μg/ml Hydrocortison, 20 ng/ml EGF, 1 mg/ml Insulin, 0,55 mg/ml Transferrin, 0,67 mg/ml Selen
Waschlösung Immunhistologie	TBS, 0,025% Triton, pH=8,2

2.8 Antikörper und Fluoreszenzfarbstoffe

Die folgenden monoklonalen Antikörper murinen Ursprungs wurden zur Antigendetektion per Durchflusszytometrie oder Immunfluoreszenzmikroskopie verwendet:

Tabelle 2: Für Durchflusszytometrie verwendete monoklonale Antikörper.

Antikörper	Klon	Fluorochrom	Verdünnung	Hersteller
Anti-Fibroblast	REA165	VioBlue	1:100	Miltenyi Biotec
Anti-Pan Zytokeratin	AE1/AE3	unkonjugiert	1:40	Abcam
CD3	OKT3	PerCP-Cy5.5	1:40	Biolegend
CD31	WM59	PerCP-Cy5.5	1:80	Biolegend
CD45	HI30	Pacific Blue	1:40	Biolegend
CD90	5E10	FITC	1:400	Biolegend
EpCAM (CD326)	9C4	PE	1:40	Biolegend
HLA-DR	L243	PerCP-Cy5.5	1:40	Biolegend
IgG1κ	MOPC.21	FITC	je nach Antikörper	Biolegend
IgG12a, κ	MOPC-173	PerCP-Cy5.5	je nach Antikörper	Biolegend
IgG2b/κ	MPC-11	PE	je nach Antikörper	Biolegend
Ki-67	REA183	FITC	1:10	Miltenyi Biotec
PD-1 (CD279)	EH12.2H7	PerCP-Cy5.5	1:40	Biolegend

Folgende Sekundärantikörper wurden verwendet:

Tabelle 3: Für Immunhistochemie verwendete Sekundärantikörper.

Antikörper	Fluorochrom	Verdünnung	Hersteller
Esel anti-Kaninchen IgG (H+L)	Cy-3	1:200	Dianova, Hamburg, Deutschland
Ziege anti-Kaninchen IgG (H+L)	Alexa Fluor™ 700	1:200	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
Ziege anti-Maus IgG (H+L)	Alexa Fluor™ 488	1:400	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA

Folgende Fluoreszenzfarbstoffe wurden zur Viabilitätsmessung von Zellen verwendet:

Tabelle 4: Verwendete Fluoreszenzfarbstoffe.

Farbstoff	Hersteller
DAPI (4',6-Diamidino-2-Phenylindol, Dihydrochlorid)	Molecular Probes®, Eugene, Oregon, USA
LIVE/DEAD® Pacific Orange	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA

2.9 Software

AxioVision Version 4.7.2 Carl Zeiss Microscopy, Jena, Deutschland

FACSDiva TM Software Version 6.2 BD Biosciences, New Jersey, USA

FlowJo Version 9.5.3 Tree Star, Oregon, USA

GraphPad Prism Version 5.0.0.288 GraphPad Software, California, USA

ImageJ2

Wayne Rasband, National Institute of Health,
Bethesda, MD, USA

3. Methoden

3.1 Zellkultur und Präparation

3.1.1 Enzymatischer Verdau von humanem Thymusgewebe und Isolation von humanen Thymusstromazellen

Zwischen der sterilen Entnahme des Gewebes im Operationssaal und der weiteren Verarbeitung wurden die Thymi bei 4 °C gelagert. Die weitere Verarbeitung wurde unter einer Sterilbank vorgenommen. Zunächst wurde überschüssiges Fett- und Bindegewebe entfernt. Hiernach wurde das Gewebe in circa 1 cm große Stücke geschnitten und gewogen. Etwa 10 ml sterile Phosphatpuffersalzlösung (engl. *phosphate buffered saline, PBS*) wurden den Gewebestücken hinzugefügt und die im Gewebe enthaltenen Thymozyten mit dem stumpfen Ende einer 5 ml Spritze herausgedrückt. Das nun von den herausgedrückten Thymozyten milchig-rosa gefärbte PBS wurde verworfen. Etwa 10 ml frisches PBS wurde dem Gewebe zugegeben. Das Herausdrücken der Thymozyten wurde 3-4 Mal wiederholt, bis das entstehende Exsudat ausreichend klar war. Das übrig gebliebene Thymusgewebe wurde nun mit einer sterilen Schere homogenisiert. Zur enzymatischen Digestion wurde ein Enzymmix verwendet, welcher 2 mg/ml Kollagenase sowie 0,1 mg/ml DNase in RPMI Medium enthielt. Es wurden 10 ml Enzymmix zu maximal 10 g homogenisiertem, humanem Thymusgewebe hinzugegeben und die Gewebesuspension in ein gentleMACS™ C Tube (15 ml) übertragen. Im weiteren Verlauf wurde ein mechanischer Verdau mittels eines gentleMACS™ Dissociator durchgeführt. Darauf folgend wurde die Gewebesuspension in einem Bakterieneschüttler bei 37 °C und 200 Umdrehungen pro Minute (=U/min) für 20 Minuten inkubiert. Nach der Inkubation wurde das Gewebe bei 110 g für 2 Minuten zentrifugiert und der Überstand wurde vorsichtig abgenommen und verworfen. In einem zweiten Verdauungsschritt wurden weitere 10 ml des Enzymmix dem Gewebe hinzugefügt. Mittels gentleMACS™ Dissociater wurde die Gewebesuspension weiter dissoziiert. Danach folgte eine weitere Inkubation im Bakterieneschüttler bei 37 °C und 200 U/min für 20 Minuten, woraufhin das Gewebe abermals bei 110 g für 2 Minuten zentrifugiert wurde. Der Überstand wurde verworfen. Der zweite Digestionsschritt

wurde nochmals wiederholt, wobei nach der zwanzigminütigen Inkubation nicht zentrifugiert wurde, sondern zur Arretierung der Digestion fetales Kälberserum (engl. *fetal calf serum, FCS*) in einem Verhältnis von 1:5 der Gewebesuspension beigelegt wurde. Die Gewebesuspension wurde weitere 10 Minuten bei 37 °C und 200 U/min inkubiert. Nach dieser Inkubation wurde bei 110 g für 2 Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde in ein 50 ml Falcon Röhrchen transferiert, bis zu einem Gesamtvolumen von 50 ml mit sterilem PBS aufgefüllt und dann bei 400 g für 10 Minuten zentrifugiert. Das entstehende Zellpellet wurde entweder in serumhaltigem oder serumfreiem Medium resuspendiert. Die Zellanzahl wurde mittels Trypanblaufärbung und einer Neubauer Zählkammer ermittelt.

3.1.2 Etablierung der humanen Thymusstromazellkultur

Zur Etablierung der humanen Thymusstromazellkultur wurden zwei unterschiedliche Kulturbedingungen untersucht, um einen möglichst hohen Anteil an Thymusepithelzellen zu erreichen. Diese wurden mittels des epithelialen Zelladhäsionsmoleküls und Epithelzellmarkers EpCAM (CD326) detektiert (engl. *epithelial cell adhesion molecule*), welches unter anderem von retikulären Thymusepithelzellen exprimiert wird [65].

Bei der ersten Kulturbedingung wurde DMEM/Ham's F12 (1:1) Medium verwendet, welchem 10% FCS sowie 100 U/ml Penicillin und 100 µg/ml Streptomycin (1% P/S) beigelegt wurden. Die Kultivierung der Zellen erfolgte in einer befeuchteten Atmosphäre bei 37 °C und 5% CO₂ in T75 Zellkulturflaschen sowie in 6-Well Zellkulturplatten. Es wurden ca. 5×10^7 frisch isolierte humane Thymusstromazellen in 25 ml Medium pro T75 Zellkulturflasche und $0,5-2 \times 10^7$ frisch isolierte humane Thymusstromazellen in 2 ml Medium pro 6-Well ausgesät. Diese hohe Zellkonzentration wurde gewählt, da trotz des Versuchs, die Thymozyten aus dem Gewebe zu entfernen, eine hohe Anzahl an T-Zellvorläufern im Zellisolat verbleiben. Da diese jedoch nicht adhärent wachsen und unter den beschriebenen Kulturbedingungen innerhalb von Stunden bis wenigen Tagen versterben, können sie als Suspensionszellen mit der Erneuerung des Mediums entfernt werden. Aus diesem Grund wurde das Medium 24h nach Isolation erstmalig gewechselt. Im weiteren

Verlauf wurde das Medium alle 2-3 Tage erneuert. Die Zellen wurden etwa 2-4 Wochen bis zu einer Konfluenz von 70-80% kultiviert.

In einem zweiten, serumfreien Ansatz wurde ebenfalls DMEM/Ham's F12 (1:1) Medium verwendet, welchem einige Zusätze beigefügt wurden (siehe Tabelle 1). Es wurden 1% P/S hinzugefügt. Die Aussaat und Kultivierung erfolgte wie beim serumhaltigen Kulturansatz beschrieben.

3.1.3 Kultivierung von Jurkatzellen

Die Jurkatzelllinie wurde in T75 Zellkulturflaschen bei 37 °C und 5% CO₂ in einer befeuchteten Atmosphäre kultiviert. Dafür wurden ca. 1-2 x 10⁵ Zellen/ml in 25 ml in RPMI 1640 mit 10% FCS und 1% P/S ausgesät. Das Medium wurde alle 2-3 Tage erneuert, bei der gleichen Gelegenheit wurden die Zellen passagiert. Nach 5-7 Tagen wurden ca. 1 x 10⁶ Zellen pro Probe für die durchflusszytometrische Untersuchung geerntet.

3.1.4 Isolation frischer humaner Thymozyten

Primäre humane Thymozyten wurden wie unter Abschnitt 3.1.1 beschrieben aus frischem humanem Thymusgewebe gewonnen. Humane Thymozyten wurden in sterilem PBS gewaschen und mithilfe von Trypanblau und einer Neubauerkammer gezählt. Für die durchflusszytometrische Untersuchung wurden je ca. 1 x 10⁶ Zellen ohne Kultivierung unmittelbar nach der Isolation in 4 °C kaltem FACS-Puffer geblockt und gefärbt.

3.2 Durchflusszytometrie

Mittels Durchflusszytometrie wurde zunächst eine Charakterisierung der kultivierten Thymusstromazellen beider Kultivierungsbedingungen vorgenommen. Weiterhin wurde die Bindung von ATG und ATLG an kultivierte humane Thymusstromazellen untersucht, sowie die Zytotoxizität der beiden rATG-Präparationen per Annexin V Assay und LIVE/DEAD™ ermittelt. Alle Messungen, sofern nicht anders angezeigt, erfolgten am BD LSR II und wurden anschließend mit dem Computerprogramm FlowJo® ausgewertet.

Die Durchflusszytometrie ist ein zellbiologisches Messverfahren, bei welchem Zelloberflächenmoleküle sowie intrazelluläre Moleküle qualitativ und quantitativ detektiert werden können. Die zu untersuchenden Moleküle werden mittels Fluorochrom-konjugierter monoklonaler Antikörper markiert und durch monochromatisches Licht angeregt, sodass eine Fluoreszenz emittiert wird, welche wiederum von einem Detektor empfangen und ausgewertet werden kann. Die Zellen werden mittels hydrodynamischer Fokussierung vereinzelt und hintereinander gemessen. Wird eine Zelle von einem Laser getroffen, so streut sie Licht in verschiedene Richtungen. Der sogenannte Photomultiplier, der Detektor des Vorwärtsstreulichts (engl. *forward side scatter*, *FSC*), misst dabei die Größe und das Volumen der Zellen, der Detektor für das Seitwärtsstreulicht (engl. *sideward side scatter*, *SSC*) erhebt Informationen zur Granularität der Zelle. Außerdem können emittierte Fluoreszenzen, welche durch die Bindung Fluorochrom-konjugierter monoklonaler Antikörper an ihre Zielantigene entstehen, durch weitere Detektoren gemessen werden. Da tote Zellen häufig unspezifisch binden und daher falsch-positive Ergebnisse erbringen können, wurden sie mittels einer LIVE/DEAD™ Färbung exkludiert. Werden mehrere Fluorochrom-konjugierte monoklonale Antikörper in einer Zellsuspension verwendet, kann es zu einer Überschneidung der Emissionsspektren kommen. Daher wurde vor einer Messung stets eine Kompensation durchgeführt, um die ineinander streuenden Signale zu korrigieren und eine akkurate Separation der Zellpopulationen zu ermöglichen.

3.2.1 Charakterisierung der kultivierten humanen Thymusstromazellen

Zur durchflusszytometrischen Evaluation der kultivierten humanen Thymusstromazellen wurde das Medium von einer 6-Well Platte entfernt. Es wurde mit 1 ml PBS gespült und daraufhin die Zellen mit 1 ml 0,5% Trypsin/EDTA in PBS für 8 Minuten bei 37 °C und 5% CO₂ von der Kulturplatte dissoziiert. Anschließend wurden die noch nicht gelösten Zellen behutsam durch Spülen mit einer 1000 µl Pipette von der Kulturplatte gelöst und in 1,5 ml Reagenzgefäße überführt. Es folgte ein Waschschrift mit einer Zentrifugierung bei 1.200 g für 2 Minuten. Der Überstand wurde verworfen und die Zellen in 1 ml eiskaltem PBS 2% Flebo-γ (FACS-Puffer) für 15 Minuten auf Eis geblockt. Danach erfolgte eine weitere Zentrifugierung bei 1.200 g für

2 Minuten, der Überstand wurde verworfen und das Zellpellet in 100 μ l eiskaltem FACS-Puffer resuspendiert. Im Weiteren wurden die Zellen mit den folgenden Fluorochrom-konjugierten monoklonalen Antikörpern für 20 Minuten auf Eis gefärbt: 2,5 μ l CD45 PB, 2,5 μ l EpCAM PE, 2,5 μ l CD31 PerCP-Cy5.5, 4 μ l Anti-Fibroblast VioBlue sowie 1 μ l LIVE/DEAD® PO. Nach der Färbung wurden die Zellen abermals mit 1 ml FACS-Puffer gewaschen und der Überstand verworfen. Das Zellpellet wurde resuspendiert, die Zellsuspension in ein 5 ml Rundbodengefäß mit 35 μ m Zellsieb überführt und bei 365 g für eine Minute zentrifugiert.

3.2.2 Expansion von serumfrei kultivierten humanen Thymusstromazellen

Zur Evaluation der Expansion der kultivierten humanen Thymusstromazellen wurden die Kulturzellen an den Tagen +1, +7, +14, +21 und +28 nach Isolation durchflusszytometrisch untersucht. Hierfür wurden lediglich die in serumfreiem Medium kultivierten Thymusstromazellen verwendet. Das Medium wurde von einem Well entfernt, mit 1 ml PBS gespült. Daraufhin wurden die Zellen wie unter 3.2.2 für die Färbung präpariert und mit den folgenden Fluorochrom-konjugierten monoklonalen Antikörpern für 20 Minuten auf Eis im Dunkeln inkubiert: 1,25 μ l CD3 PerCP-Cy5.5, 2,5 μ l CD45 PB, 2,5 μ l EpCAM PE sowie 1 μ l LIVE/DEAD® PO. Vor der durchflusszytometrischen Messung folgte ein Waschschrift. Daraufhin wurde die Zellsuspension in ein 5 ml Rundbodengefäß mit 35 μ m Zellsieb überführt.

Weiterhin wurde an den Tagen +7, +14 und +21 durchflusszytometrisch die Wachstumsfraktion verschiedener Subpopulationen der Kulturzellen mittels des Proliferationsmarkers Ki-67 gemessen. Hierzu erfolgte zunächst die extrazelluläre Färbung mit 1,25 μ l CD3 PerCP-Cy5.5, 2,5 μ l CD45 PB, 2,5 μ l EpCAM PE sowie 1 μ l LIVE/DEAD® PO für 30 min auf Eis im Dunkeln. Die intrazelluläre Färbung wurde mittels FoxP3 / *Transcription Factor Staining Buffer Set* (siehe Abschnitt 2.6) und laut Herstellerangaben durchgeführt. Die intrazelluläre Färbung mit Ki-67 Fluoreszein (FITC) erfolgte in der Verdünnung 1:10 und wurde für 30 min auf Eis im Dunkeln inkubiert.

3.2.3 rATG Bindung an humane Thymusstromazellen

Zur Untersuchung der Bindung von ATG und ATLG an kultivierte humane Thymusstromazellen wurden ca. 5×10^7 frisch isolierte humane Thymusstromazellen in 25 ml serumfreien Medium in einer beschichteten T75 Zellkulturflasche bis zu einer Konfluenz von 70-80% kultiviert. Die Zellen wurden wie unter Abschnitt 3.2.2 beschrieben mittels 10 ml 0,05% Trypsin/EDTA in PBS von der Oberfläche der Zellkulturflasche gelöst. Die gelösten Zellen wurden in ein 15 ml Reagiergefäß überführt und bei 365 g für 10 Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und die Zellen in 1 ml FACS-Puffer resuspendiert. Darauffolgend wurde eine Zellzählung mit Hilfe von Trypanblau (1:1) und einer Neubauer Zählkammer vorgenommen. Die Zellsuspension wurde zu gleichen Anteilen auf 1,5 ml Reagiergefäße aufgeteilt, sodass pro Probe etwa $0,5 \times 10^6$ Zellen verwendet wurden. Jeder Probe wurde je 1 ml eiskalter FACS-Puffer hinzugegeben und die Proben wurden für 15 Minuten auf Eis inkubiert. Danach erfolgte eine Zentrifugierung bei 1.200 g für 2 Minuten, der Überstand wurde verworfen. Die einzelnen Proben wurden mit je 1 $\mu\text{g/ml}$, 10 $\mu\text{g/ml}$, 25 $\mu\text{g/ml}$, 50 $\mu\text{g/ml}$, 100 $\mu\text{g/ml}$ und 1000 $\mu\text{g/ml}$ ATG, ATLG oder Kaninchen Immunglobulin G (engl. *rabbit immunoglobulin G*, rIgG) verdünnt in 100 μl FACS-Puffer für 20 Minuten auf Eis inkubiert. Nach der Inkubation erfolgte eine Zentrifugierung bei 1.200 g für 2 Minuten, der Überstand wurde verworfen. Anschließend wurden alle Proben mit je 0,5 μl Esel anti-Kaninchen (*goat anti-rabbit* = GaR) Alexa Fluor™ 700 für 20 Minuten auf Eis im Dunkeln inkubiert. Es folgte ein weiterer Waschschrift und eine zweite Färbung mit 2,5 μl CD45 PB, 2,5 μl EpCAM PE sowie 1 μl LIVE/DEAD® PO in 100 μl FACS-Puffer. Diese wurden ebenfalls für 20 Minuten auf Eis im Dunkeln inkubiert. Daraufhin wurde bei 1.200 g für 2 Minuten abermals zentrifugiert, der Überstand verworfen und das Pellet in 100 μl FACS-Puffer resuspendiert. Je 100 μl Zellsuspension wurden in ein 5 ml Rundbodengefäß mit 35 μm Zellsieb überführt.

3.2.4 Bestimmung der rATG-induzierten Apoptose in humanen Thymusstromazellen mittels Annexin V

Zur Untersuchung der Komplement-unabhängigen Zytotoxizität (engl. *complement-independent cytotoxicity*, CIC) wurden serumfrei kultivierte humane

Thymusstromazellen mit unterschiedlichen ATG- oder ATLG-Konzentrationen für 24h bei 37 °C und 5% CO₂ inkubiert (1 µg/ml, 10 µg/ml, 100 µg/ml und 1000 µg/ml). Um die Komplement-abhängige Zytotoxizität (engl. *complement-dependent cytotoxicity, CDC*) zu evaluieren, wurden kultivierte humane Thymusstromazellen zusätzlich zu ATG oder ATLG (1 µg/ml, 10 µg/ml, 100 µg/ml und 1000 µg/ml) mit humanem Serum von gesunden Spendern (1:50) oder mit Kaninchenkomplement (1:50) für 24h bei 37 °C und 5% CO₂ inkubiert. Für den genauen Versuchsaufbau, siehe Abbildung 2. Nach 24 Stunden wurden die Zellen wie zuvor unter 3.2.2 beschrieben von den Kulturplatten gelöst und für die Färbung vorbereitet. Alle Proben wurden mit GaR Alexa Fluor™ 700, CD45 PB, EpCAM PE sowie LIVE/DEAD® PO in 100 µl FACS-Puffer gefärbt. Für die anschließende Annexin V Färbung wurden die Zellen in Annexinpuffer (1:10) resuspendiert und mit jeweils 5 µl Annexin V FITC für 15 Minuten im Dunkeln bei RT inkubiert. Abschließend erfolgte eine weitere Zentrifugierung bei 1.200 g für 2 Minuten, der Überstand wurde abgenommen und die Zellen in 100 µl Annexinpuffer resuspendiert. Je 100 µl Zellsuspension wurden in ein 5 ml Rundbodengefäß mit 35 µm Zellsieb überführt und bei 365 g für eine Minute zentrifugiert. Die gefärbten Zellen wurden innerhalb von 60 Minuten am LSR II gemessen.

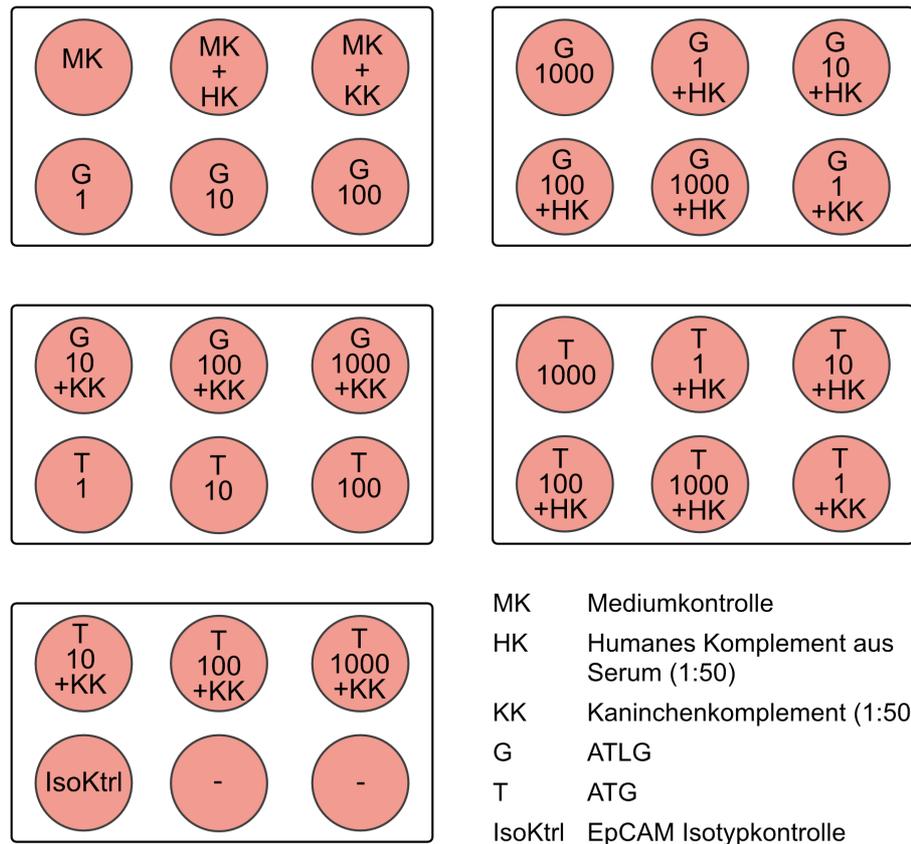


Abbildung 2: Darstellung des Versuchsaufbaus zur Ermittlung der Komplement-unabhängigen und Komplement-abhängigen Apoptose durch rATG.

3.2.5 Untersuchung des Apoptosemechanismus mittels Pan-Caspaseinhibitor Q-VD-OPh Hydrat

Um den Mechanismus der durch rATG induzierten Apoptose genauer zu charakterisieren, wurden kultivierte humane Thymusstromazellen wie oben beschrieben mit unterschiedlichen ATG- oder ATLG-Konzentrationen, jedoch unter der Zugabe von $10\mu\text{mol/l}$ Pan-Caspaseinhibitor Q-VD-OPh Hydrat (QVD), für 24h bei $37\text{ }^\circ\text{C}$ und 5% CO_2 inkubiert ($1\mu\text{g/ml}$, $10\mu\text{g/ml}$, $100\mu\text{g/ml}$ und $1000\mu\text{g/ml}$). Zur Kontrolle wurden abermals Zellen mit den entsprechenden rATG-Konzentrationen beimpft, jedoch erfolgte anstelle des QVDs eine Beigabe von Dimethylsulfoxid (DMSO) in einer Konzentration von 1:1000. DMSO wurde den Kontrollen hinzugegeben, da der Pan-Caspaseinhibitor QVD in DMSO gelöst ist und dieses durch die jeweilige Verdünnung in einer Endkonzentration von 1:1000 vorliegt. Um ein durch DMSO bedingtes Zellsterben zu kontrollieren, erfolgte ein Angleichen der Kontrollen.

3.2.6 Antigenexpression auf der Jurkatzelllinie, frischen humanen Thymozyten und humanen kultivierten Thymusstromazellen

Jurkatzellen, frische humane Thymozyten sowie kultivierte humane Thymusstromazellen wurden wie zuvor berichtet isoliert bzw. kultiviert und für die durchflusszytometrische Untersuchung wie unter Abschnitt 3.2.2 präpariert. Es folgte eine Färbung verschiedener Oberflächenmarker für 20 Minuten auf Eis im Dunkeln, siehe Tabelle 5. Anschließend wurden die Zellen gewaschen, die Überstände verworfen und die pelletierten Zellen in 100 μ l FACS-Puffer resuspendiert. Die Zellsuspension wurde in ein 5 ml Rundbodengefäß mit 35 μ m Zellsieb überführt.

Tabelle 5: Verwendete Antikörper zur Charakterisierung der Antigenprofile von Jurkatzellen, frischen humanen Thymozyten und humanen Thymusstromazellen.

Antikörper	Fluorochrom	$\mu\text{l}/100\mu\text{l}$
Anti-Fibroblast	VioBlue	4
CD3	APC	2,5
CD31	PerCp-Cy5.5	5
CD45	AF700	1
CD90	FITC	0,25
EpCAM	PE	2,5
HLA-DR	PerCp-Cy5.5	2,5
LIVE/DEAD®	Pacific Orange	1
PD-1	PerCp-Cy5.5	2,5

3.3 Mikroskopie und Immunhistochemie

3.3.1 Hämatoxylin-Eosin-Färbung von frischem, gefrorenem humanem Thymusgewebe

Frisches humanes Thymusgewebe wurde unmittelbar nach der Entnahme des Gewebes in *Optimal cutting temperature compound* (O.C.T.) eingebettet und mittels flüssigen Stickstoffs und 2-Methylbutan schockgefroren. Bis zur Weiterverarbeitung wurde das Gewebe bei -80 °C gelagert. An einem Kryotom wurden Gewebeschnitte von $5\text{-}7\mu\text{m}$ Dicke angefertigt, welche daraufhin für mindestens zwei Stunden bei Raumtemperatur (RT) getrocknet wurden. Es erfolgte eine zehnmündige Fixierung in 4% Paraformaldehyd (PFA) in Tris-gepufferter Kochsalzlösung (engl. *tris-buffered saline*, TBS) und 1% BSA bei RT, danach wurde eine Rehydrierung mittels destilliertem Wasser (dH_2O) durchgeführt. Die Gewebeschnitte wurden zunächst in Hämatoxylin gefärbt, wonach zwei fünfminütige Waschschrirte mit dH_2O erfolgten. Danach wurde mit Eosin gefärbt und hiernach mit einer aufsteigenden Alkoholreihe

gewaschen. Abschließen erfolgte eine vierminütige Inkubation mit Xylol und die Deckelung der Gewebeschnitte mittels Vitro-Clud®.

3.3.2 Lichtmikroskopische Untersuchung der Expansion von serumfrei kultivierten humanen Thymusstromazellen

Die Isolation der humanen Thymusstromazellen erfolgte wie unter Abschnitt 3.1.1 beschrieben. Ca. $0,5-2 \times 10^7$ frisch isolierte humane Thymusstromazellen wurden in je 2 ml serumfreien Medium in mit Kollagen I beschichteten 6-Well Kulturplatten bei 37 °C und 5% CO₂ kultiviert. Das Wachstum sowie die sich verändernde Morphologie der Zellen wurde an den Tagen +1, +7, +14, +21 und +28 nach Isolation lichtmikroskopisch dokumentiert.

3.3.3 Charakterisierung und rATG Bindung der kultivierten humanen Thymusstromazellen

Die Isolation der humanen Thymusstromazellen erfolgte wie zuvor beschrieben. Deckgläschen wurden mittels >96% Ethanol desinfiziert und unter der Sterilbank luftgetrocknet. Anschließend wurde je ein Deckgläschen in ein Well einer 6-Well Zellkulturplatte überführt und mit 2 ml Zellsuspension benetzt, je nach Ansatz mit $0,5-2 \times 10^7$ Thymusstromazellen in DMEM/Ham's F12 mit 10% FCS oder in DMEM/Ham's F12 + Zusätze resuspendiert. Die Zellen wurden bei 37 °C und 5% CO₂ bis zu einer Konfluenz von 70-80% kultiviert. Die immunzytochemische Färbung erfolgte in der 6-Well Zellkulturplatte. Hierfür wurde zunächst das Medium abgenommen und die Zellen mit je 1 ml PBS gespült. Zur Fixierung wurden die Zellen für 10 Minuten bei RT in 4% PFA in TBS 1% BSA inkubiert. Anschließend erfolgte ein Waschschrift, bei dem drei Mal für fünf Minuten in TBS+0,025% Triton (pH-Wert 8,2) inkubiert wurden. Zum Blocken wurde das Gewebe in 5% Ziegenserum in TBS mit 1% BSA für 30 Minuten bei RT inkubiert. Anschließend erfolgte die Inkubation des Primärantikörpers Pan-Zytokeratin (Pan-ZK) in einer Konzentration von 1:40 bei 4 °C über Nacht. Es wurde als Negativkontrolle für die Pan-ZK-Färbung ein Gewebeschnitt lediglich mit Antikörper-Diluent behandelt. Am nächsten Tag erfolgten abermals 3 Waschschriffe à 5 Minuten mit TBS + 0,025% Triton. Daraufhin wurde der sekundäre Antikörper, ein Alexa Fluor 488-konjugierter Ziegen-Anti-Maus Antikörper, für 60 Minuten bei RT

inkubiert. Im Anschluss erfolgten abermals drei fünfminütige Waschschriffe mit TBS+0,025% Triton und ein fünfminütiger Wässerungsschritt in destillierten Wasser (dH₂O). Es wurde eine Zellkernfärbung mittels DAPI (1:1500) vorgenommen, welche für 10 Minuten bei RT inkubierte; es folgten abermals drei fünfminütige Waschschriffe in dH₂O. Abschließend wurden die Deckgläschen mittels einer Pinzette mobilisiert und mithilfe von Fluoromount auf Objektträgern fixiert. Die Evaluation mittels Axio Scope erfolgte maximal drei Tage nach der Färbung.

3.3.4 Untersuchung der rATG Bindung an humane Thymusstromazellen mittels immunhistochemischer Färbung von ex-vivo schockgefrorenem, humanem Thymusgewebe

Frisch entnommenes humanes Thymusgewebe wurde wie oben beschrieben schockgefroren und geschnitten. Die Fixierung, die Blockung und die Inkubation der Primär- und der Sekundärantikörper wurde wie unter Abschnitt 3.3.3 durchgeführt. Zum Blocken wurde das Gewebe in 5% Normalserum in TBS 1% BSA für 30 Minuten bei RT inkubiert, wobei es sich bei dem Normalserum je nach Sekundärantikörper entweder um Esel- oder um Ziegenserum handelte. Anschließend erfolgte die Inkubation der Primärantikörper bei 4 °C über Nacht: 100 µg/ml rIgG, 100 µg/ml ATG oder 100 µg/ml ATLG sowie Pan-ZK, wie unter Abschnitt 3.3.3 beschrieben. Am nächsten Tag erfolgte die Färbung der Sekundärantikörper wie unter 3.3.3 beschrieben, allerdings unter Zugabe eines Cy3-konjugierten Esel-Anti-Kaninchen Antikörpers zur rATG bzw. rIgG Detektion und eines Alexa Fluor™ 488-konjugierten Ziegen-Anti-Maus Antikörpers zur PanZK Detektion. Im Anschluss erfolgten drei Waschschriffe mit TBS + 0,025% Triton und ein Wässerungsschritt in dH₂O. Anschließend wurde eine Zellkernfärbung mittels DAPI (1:1500) vorgenommen, welche für 10 Minuten bei RT inkubiert wurde; es folgten abermals drei Waschschriffe in dH₂O. Abschließend wurden die Gewebeschnitte mittels Fluoromount gedeckelt und bis maximal drei Tage nach der Färbung via Axio Scope evaluiert und fotografiert.

3.4 Statistik

Die statistischen Analysen erfolgten mithilfe des Computerprogramms GraphPad Prism. Eine Irrtumswahrscheinlichkeit von $p \leq 0,05$ wurde als statistisch signifikant

gewertet. Der zweiseitige Mann-Whitney-U Test wurde für unabhängige Proben, der Rangsummentest nach Wilcoxon wurde für gepaarte Proben verwendet. Es wurde nicht von einer Gauß'schen Normalverteilung der Variablen ausgegangen. Alle Ergebnisse wurden als Mittelwerte \pm Standardfehler des Mittelwerts (engl. *Standard error of the mean, SEM*) angegeben.

4. Ergebnisse

4. 1 Gating Strategie der humanen Thymusstromazellen

Bei der durchflusszytometrischen Untersuchung kultivierter, humaner Stromazellen wurden zunächst im FSC und SSC Gate alle Thymusstromazellen ausgewählt (siehe Abbildung 3). Durch die Anzeige der FSC-Fläche (engl., *FSC-area*, *FSC-A*) gegen die FSC-Höhe (engl., *FSC-height*, *FSC-H*) wurden alle Dubletten ausgeschlossen. Bei der Messung kultivierter humaner Thymusstromazellen wurde nun mittels zwei leerer Fluoreszenzkanäle ein Gating auf autofluoreszente Zellen durchgeführt, um falsch-positive Zellen von der Analyse auszuschließen. Sofern nicht anders angegeben, folgte anschließend eine Exklusion der LIVE/DEAD®⁺ toten Zellen. Danach wurden eventuell vorhandene residuale CD45⁺ hämatopoetische Zellen ausgeschlossen. Im Anschluss erfolgte je nach Versuchsaufbau zunächst eine Aufteilung der rATG⁺ und rATG⁻ Zellen oder direkt die Darstellung EpCAM⁺ und EpCAM⁻ Thymusstromazellen. Die EpCAM⁺ Epithelzellen wurden mittels Isotypkontrolle ermittelt. Um die Spezifität der rATG-Bindung sicherzustellen wurde rIgG eingesetzt.

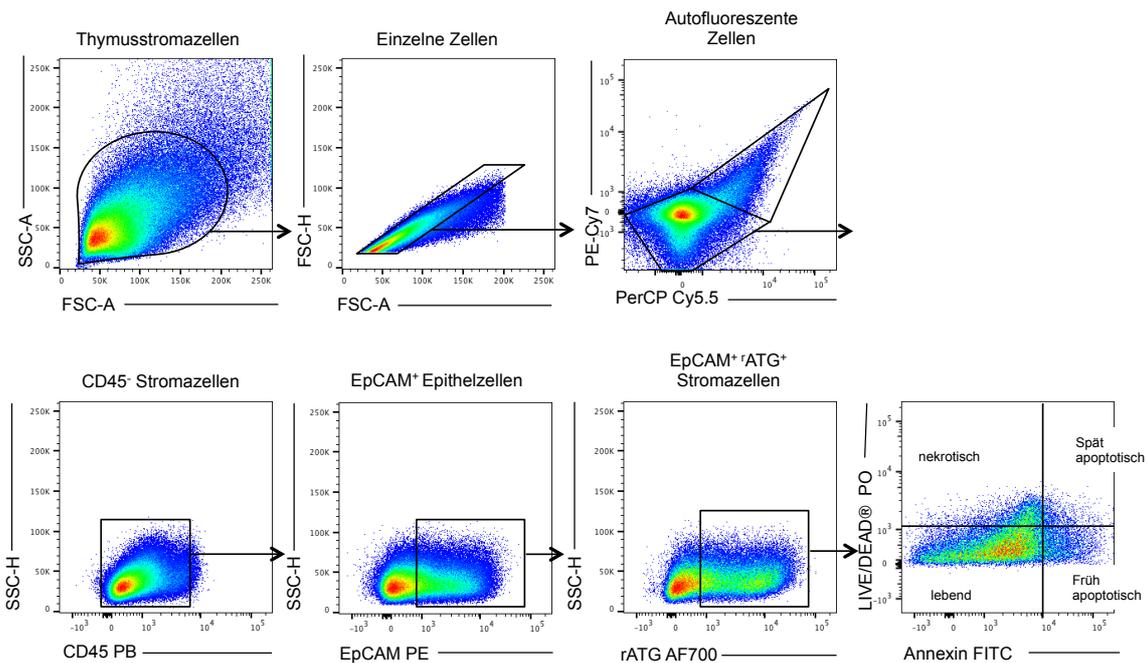


Abbildung 3: Gating Strategie der humanen kultivierten Thymusstromazellen.

Zur Abgrenzung der EpCam⁺ und rATG⁺ Populationen wurde eine Isotype bzw. ein unspezifisches rIgG eingesetzt. Gezeigt ist ein repräsentatives Beispiel mit 1 µg/ml ATLG.

4. 2 Charakterisierung der kultivierten humanen Thymusstromazellen

Humane Thymusstromazellen wurden zunächst in serumhaltigem oder serumfreiem Medium kultiviert. Neben der morphologischen Beurteilung der Kulturzellen mittels Lichtmikroskopie wurde der Anteil an Thymusepithelzellen in der serumfreien sowie in der serumhaltigen Kultur durchflusszytometrisch und immunhistochemisch untersucht.

In der durchflusszytometrischen Untersuchung wurde das Oberflächenmolekül EpCAM (CD326) als Marker für Epithelzellen verwendet. Es wurde eine Positivkontrolle des EpCAM Antikörpers mittels einer Färbung der epithelialen Kolonkarzinomzelllinie HT-29, sowie eine Negativkontrolle mittels entsprechender Isotype (IgG_{2b} κ) durchgeführt (siehe Abbildung 4).

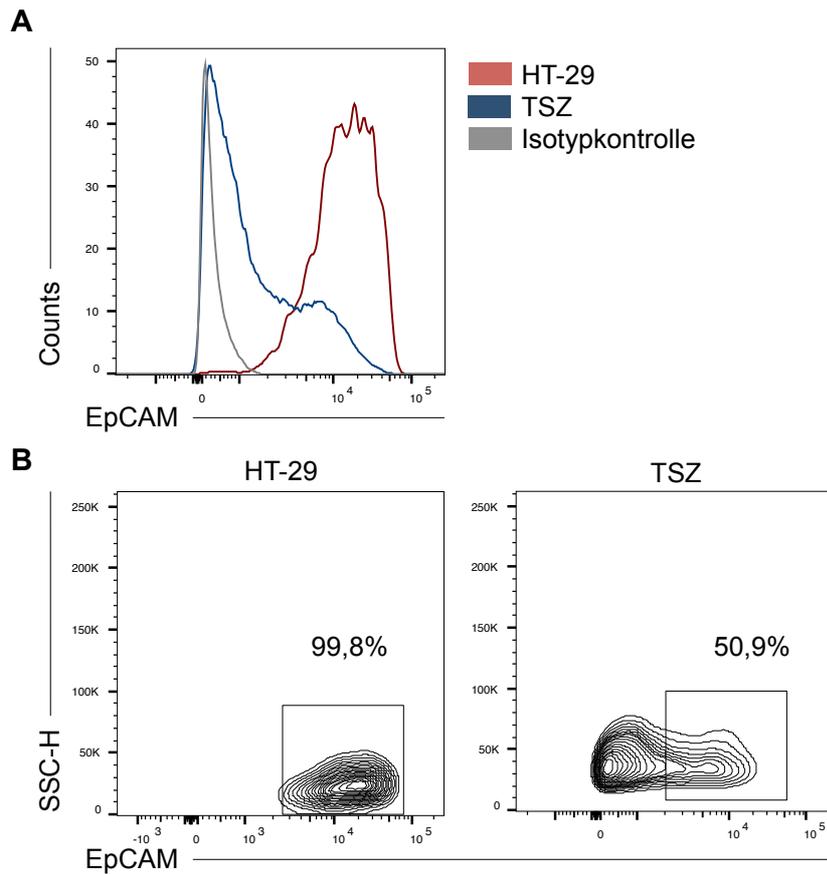


Abbildung 4: Etablierung der Epithelzellfärbung mit EpCAM mithilfe der Kolonkarzinom-Zelllinie HT-29.

A: Histogrammdarstellung einer EpCAM Färbung von TSZ und HT-29 Zellen sowie einer IgG_{2b} κ Färbung an CD45⁻ TSZ im Sinne einer Negativkontrolle. B: Exemplarische Darstellung der EpCAM Färbung an CD45⁻ TSZ und HT-29 Zellen als Konturplot.

Insgesamt konnte in der serumhaltigen Kultur ein Anteil an EpCAM⁺ Zellen von bis zu ca. 5%, bei der serumfreien Kultur ein Anteil an EpCAM⁺ Zellen von bis zu >50% beobachtet werden (siehe Abbildung 5).

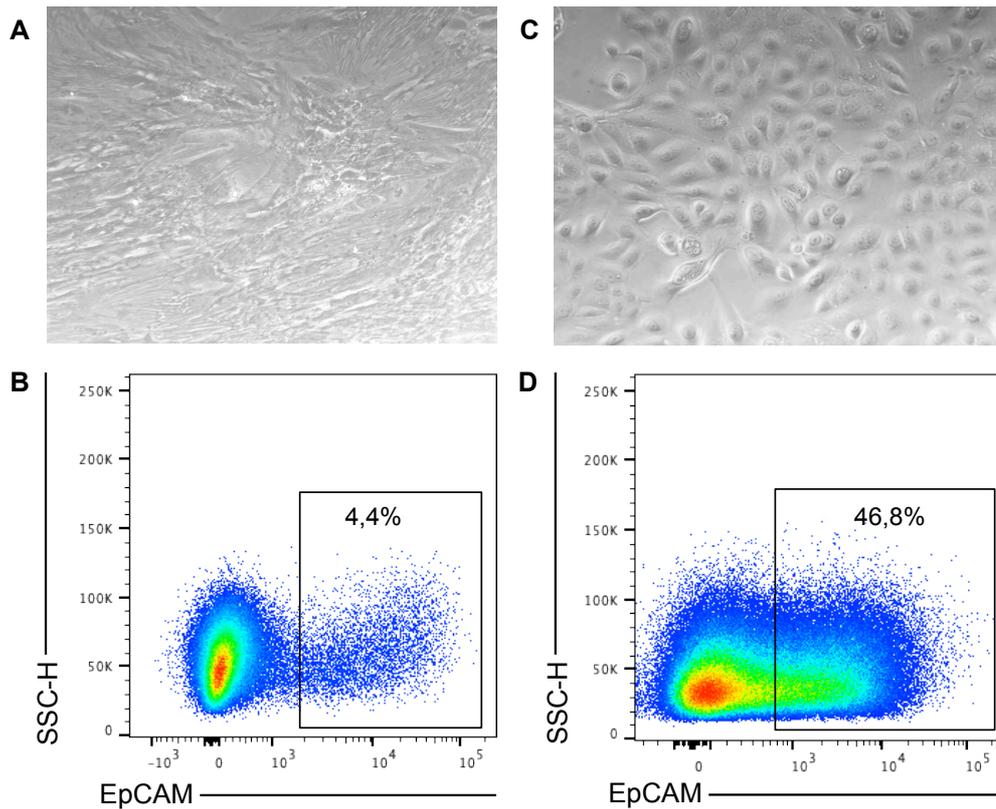


Abbildung 5: Kulturmorphologie und durchflusszytometrische EpCAM Färbung.

A+B zeigen die serumhaltig kultivierten, C+D die serumfrei kultivierten Thymusstromazellen. Morphologisch und durchflusszytometrisch sind in der serumfreien Kultur deutlich mehr CD45- EpCAM+ Thymusepithelzellen zu beobachten. Das EpCAM Gate wurde jeweils anhand der Isotypkontrolle gesetzt. Gezeigt sind repräsentative Beispiele aus zwei unabhängigen Experimenten.

Der hohe Epithelzellanteil konnte mittels Fluoreszenzmikroskopie bestätigt werden. Die immunhistochemische Färbung erfolgte mittels eines Pan-ZK-Antikörpers, welcher mit dem Farbstoff Alexa Fluor™ 488 gekoppelt und mithilfe eines Fluoreszenzmikroskops sichtbar gemacht wurde. Es konnte ein deutlich höherer Anteil an Pan-ZK-exprimierenden Epithelzellen im serumfreien Kulturansatz als in der serumhaltigen Kultur detektiert werden. So zeigten nahezu alle der serumfrei kultivierten Zellen eine positive Färbung mit dem Pan-ZK Antikörper, während nur wenige Zellen des serumhaltigen Kultursystems eine Pan-ZK Färbung aufwiesen (siehe Abbildung 6).

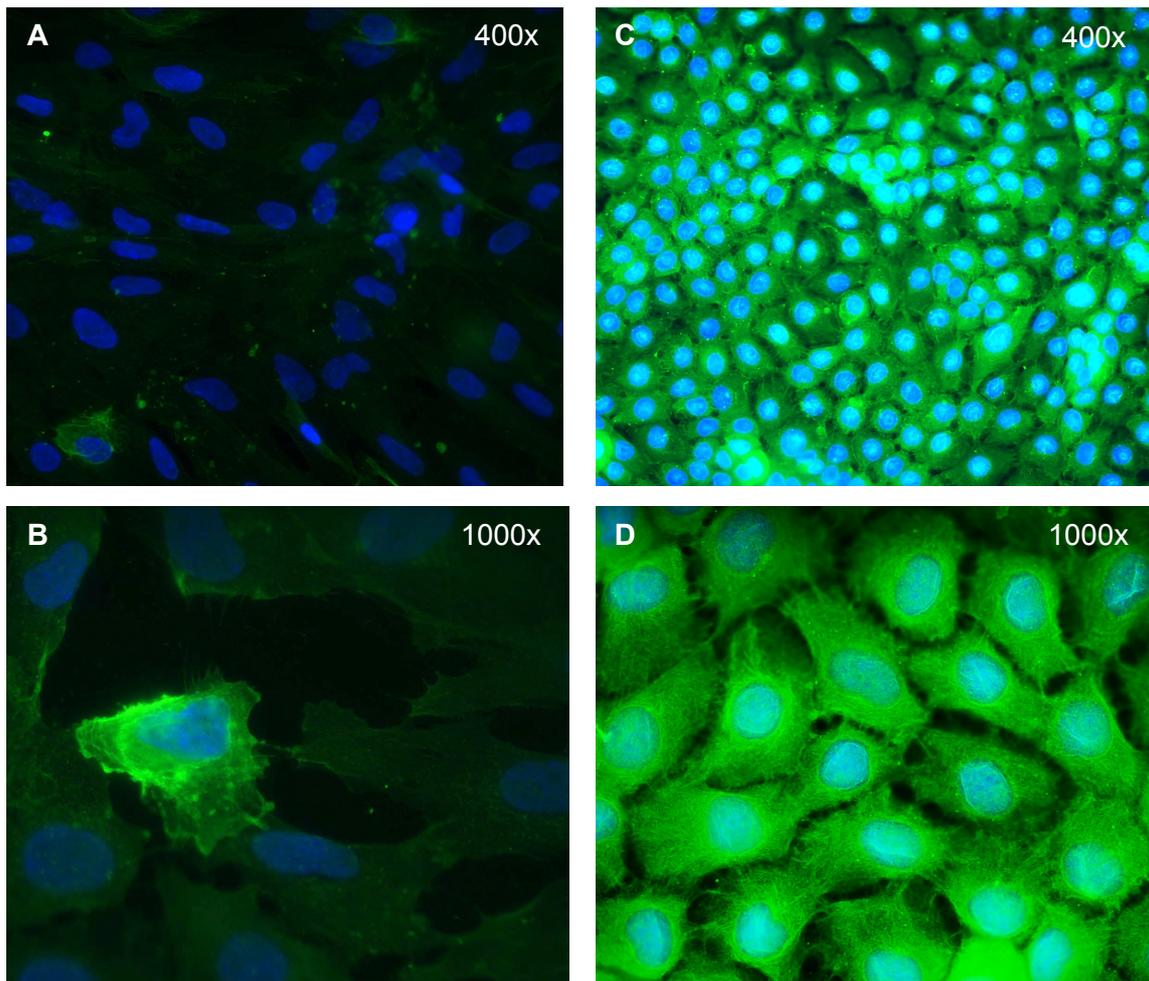


Abbildung 6: Immunhistochemische Färbungen der Thymusepithelzellen in beiden Kulturansätzen.

Pan-ZK (grün), DAPI (blau). A+B zeigen deutlich weniger Pan-ZK positive Thymusepithelzellen in der serumhaltigen Kultur. C+D zeigen einen hohen Anteil an Pan-ZK positiven Thymusepithelzellen in der serumfreien Kultur.

Des Weiteren wurden immunphänotypische Färbungen der serumfrei kultivierten Zellen mittels Durchflusszytometrie durchgeführt, um die EpCAM⁺ Fraktion, welche sich in vorangegangenen Versuchen darstellte, genauer zu charakterisieren. So wurde neben dem Epithelzellmarker EpCAM auch der Endothelzellmarker CD31 und ein Anti-Fibroblasten Antikörper untersucht. Die anteiligen Zellen des serumfreien Kultursystems sind in Abbildung 7 dargestellt.

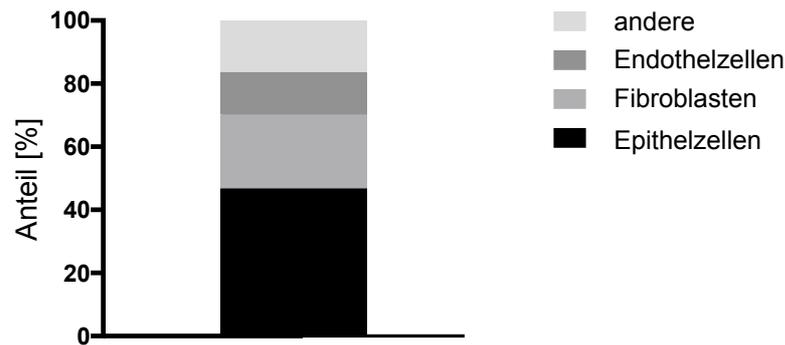


Abbildung 7: Darstellung der unterschiedlichen Zellgruppen und deren Anteil im serumfreien Kultursystem.

Die serumfrei kultivierten Thymusstromazellen bestehen zum größten Teil aus EpCAM⁺ Epithelzellen (ca. 47%). Die EpCAM⁻ Zellfraktion kann in Fibroblasten (ca. 23%) und Endothelzellen (ca. 13%) unterteilt werden. Etwa 16% der Zellen konnte keiner der Gruppen zugeordnet werden. TSZ = kultivierte Thymusstromazellen. n=1.

Da die oben dargestellten Ergebnisse zeigen konnten, dass der serumfreie Kulturansatz deutlich mehr Thymusepithelzellen aufweist, wurden alle weiteren funktionellen Experimente, sofern nicht anders angegeben, ausschließlich mit serumfrei kultivierten Thymusstromazellen durchgeführt. Weiterhin stellte sich die Beschichtung der Kulturgefäße mit Kollagen I in der serumfreien Kultur als unverzichtbar heraus. Ein Unterlassen besagter Beschichtung führte zu einem fehlenden Anheften der adhäsiv wachsenden Thymusstromazellen und somit zu einem raschen Absterben ebendieser.

4.3 Expansion von serumfrei kultivierten humanen Thymusstromazellen

Um die Expansion der unterschiedlichen Komponenten der serumfreien Kultur zu beurteilen, wurden Zellen an den Tagen +1, +7, +14, +21 und +28 nach Isolation lichtmikroskopisch und durchflusszytometrisch untersucht. Dabei wurde neben der sich wandelnden Morphologie auch das sich verändernde Verhältnis zwischen CD3⁺ Thymozyten, CD45⁺ hämatopoetischen Zellen und EpCAM⁺ Thymusepithelzellen untersucht (siehe Abbildung 8). Die durchflusszytometrische Untersuchung ergab einen sprunghaften Anstieg der CD45⁻ Zellen innerhalb der ersten Woche von 5,24% an Tag 1 auf 96,8% an Tag 7. Dieses Ergebnis veränderte sich an den nachfolgenden

Messzeitpunkten nur geringfügig (Tag 14: 99,1%, Tag 21: 98,2%, Tag 28: 99,6%). Ebenso fand eine nennenswerte Expansion der EpCAM⁺ Thymusepithelzellen statt. Einen Tag nach Isolation der Thymusstromazellen betrug der Anteil an EpCAM⁺ Thymusepithelzellen nur 1,71%, dieser stieg bis zum Tag 21 auf 43,8% (Tag 14 23,9%, Tag 21: 55,9%, Tag 28: 31,6%).

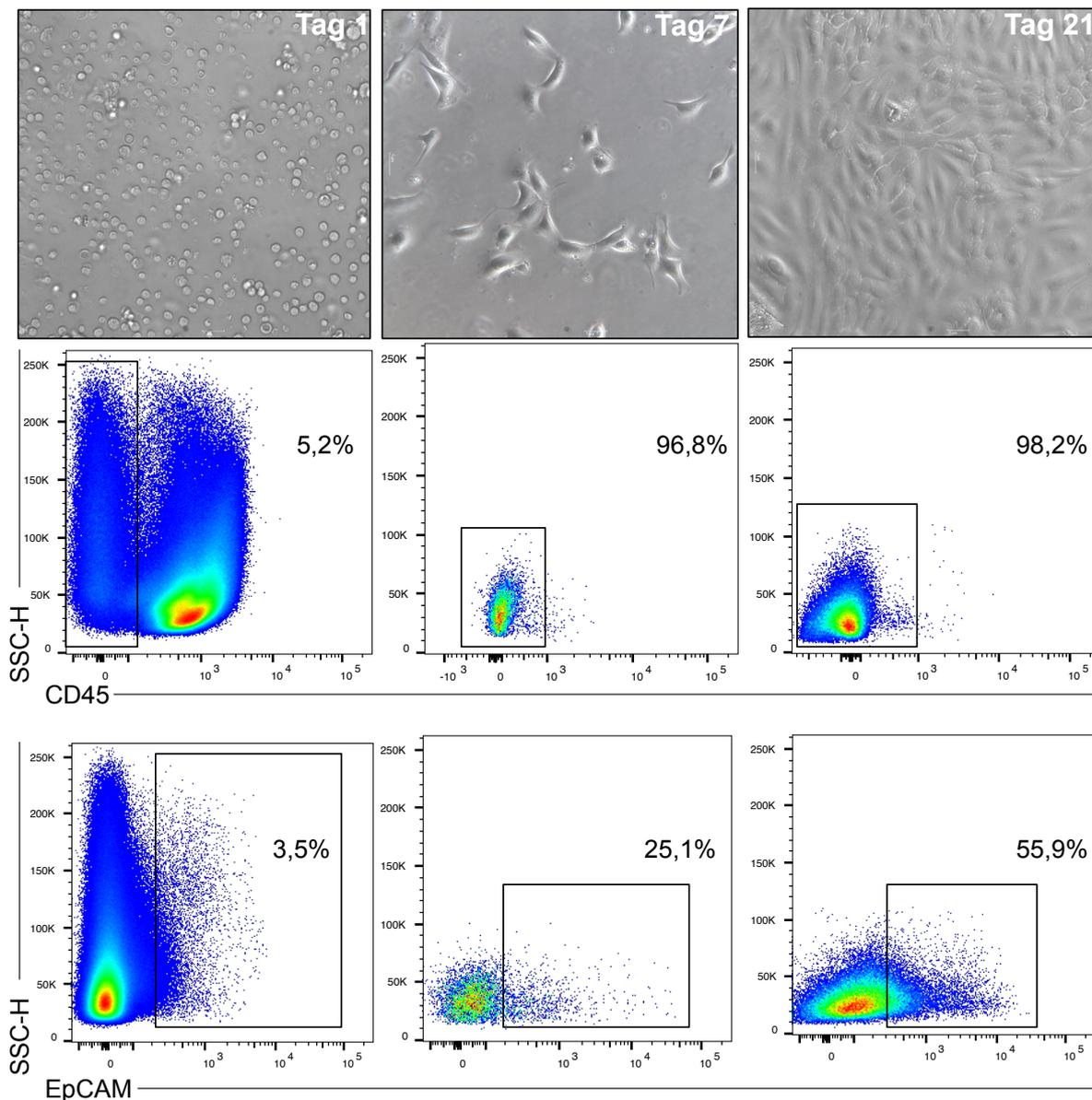


Abbildung 8: Expansion der serumfrei kultivierten Thymusstromazellen.

Gezeigt sind repräsentative Beispiele der Tage 1, 7 und 21. Das Gating der EpCAM Färbung erfolgte mithilfe der entsprechenden Isotypkontrolle.

Dieser sprunghafte Anstieg der EpCAM⁺ Zellen spiegelt sich ebenso in der durchflusszytometrischen Färbung mit dem Proliferationsmarker Ki-67 wider (siehe

Abbildung 9). So zeigen diese eine Expression von 84,1% am Tag 7 nach Kulturbeginn. Mit zunehmendem Alter der Kulturzellen nimmt diese Expression stetig ab (Tag 14: 33,2%, Tag 21: 5,4%). Ähnliche Bewegungen sind bei den CD45⁻ Zellen insgesamt zu verzeichnen, welche alle Thymusstromazellen miteinschließen. Hier fällt die Proliferationsrate im Vergleich mit EpCAM⁺ Zellen jedoch geringer aus (Tag 7: 29,6%, Tag 14: 26,8; Tag 21: 4,4%).

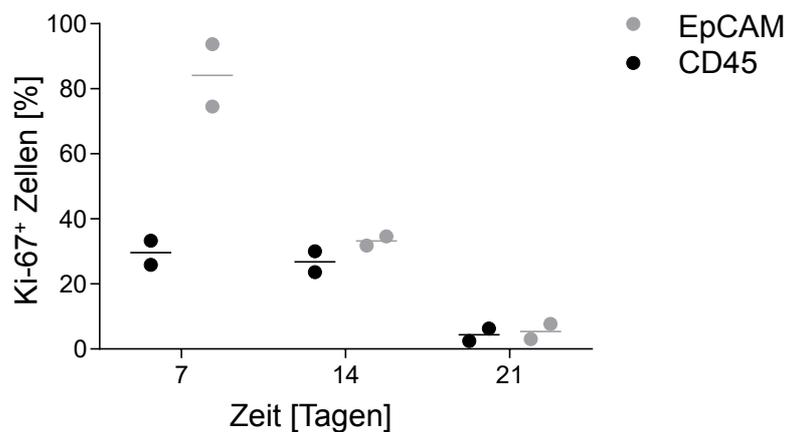


Abbildung 9: Ki-67 Expression von EpCAM⁺ und CD45⁻ Kulturzellen.

Dargestellt sind die Tage 7, 14 und 21 nach Isolation der Thymusstromazellen aus frischem, humanem Thymusgewebe. n=2.

4.4 rATG Bindung an humane Thymusstromazellen

Um die Interaktion zwischen Antithymozytenglobulin und humanem Thymusstroma zu untersuchen, wurde zunächst die Bindung von ATG und ATLG an serumfrei kultivierte humane Thymusstromazellen durchflusszytometrisch untersucht. Weiterhin wurde die Bindung der beiden rATG-Präparate an *ex vivo* schockgefrorenem Thymusgewebe mittels immunhistochemischer Fluoreszenz-färbungen dargestellt.

Mittels Durchflusszytometrie konnte eine vergleichbare Bindung von ATG und ATLG an kultivierte humane Thymusstromazellen gemessen werden (siehe Abbildung 10). Weiterhin konnte eine Dosisabhängigkeit beider Präparate beobachtet werden. Die Affinität zu EpCAM⁻ Thymusstromazellen und EpCAM⁺ Thymusepithelzellen stellte sich als vergleichbar dar. Beide Medikamente erreichten ein Plateau ab einer

Konzentration von 5 $\mu\text{g/ml}$ mit einer Bindung von >99% der untersuchten Zellen. Dieses Plateau verblieb bis zu einer rATG-Konzentration von 50 $\mu\text{g/ml}$. Bei höheren Konzentrationen nahm die Bindung beider Medikamente wieder ab. Eine mögliche Erklärung für diese Abnahme könnte darin liegen, dass es bei höheren Konzentrationen zu einer Aggregation der Antikörper innerhalb des polyklonalen Gemischs kommt und somit eine Bindung an die zu untersuchenden Thymusstromzellen behindert wird.

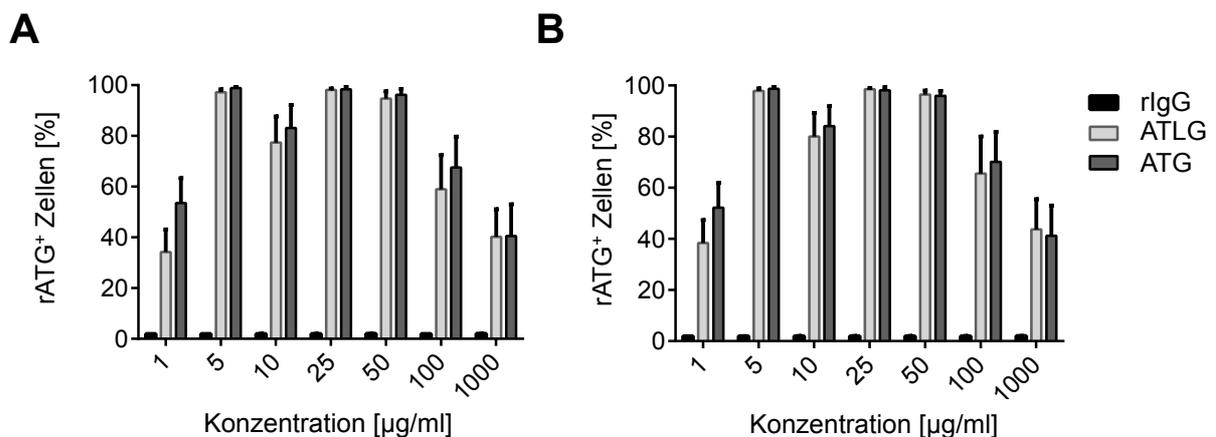


Abbildung 10: Bindung von ATG und ATLG an EpCAM⁺ und EpCAM⁻ Thymusstromazellen.

Gezeigt ist die dosisabhängige Bindung von ATG und ATLG an (A) EpCAM⁻ Thymusstromazellen sowie (B) EpCAM⁺ Thymusepithelzellen. n=3-11.

Bei niedrigen Konzentrationen (1 $\mu\text{g/ml}$, 5 $\mu\text{g/ml}$, 10 $\mu\text{g/ml}$ and 25 $\mu\text{g/ml}$) kann eine dezente Tendenz zur stärkeren Bindung von ATG an humane Thymusstromazellen beobachtet werden. Allerdings erreichte diese Tendenz bei keiner Konzentration eine Signifikanz. Um eine unspezifische Bindung der beiden rATG Präparate auszuschließen, erfolgte bei jedem Experiment eine Kontrollfärbung mittels unspezifischem rIgG, welche in keinem Experiment eine Bindung von 2% überschritt. Demnach wurde die Bindung von ATG und ATLG an Thymusstromazellen als spezifisch bewertet.

Die immunhistochemische Färbung erfolgte mit jeweils 100 $\mu\text{g/ml}$ ATG und ATLG und einem Pan-Zytokeratin zur Anfärbung der Thymusepithelzellen. Es wurde rIgG als Negativkontrolle der rATG-Färbung sowie eine Pan-ZK Negativkontrolle angefertigt. Beide rATG Präparate zeigen eine großflächige Bindung an das frische, schockgefrorene humane Thymusgewebe (siehe Abbildung 11). Es stellt sich eine

Bindung an das in grün gefärbte Thymusepithelnetzwerk dar, jedoch zeigt sich ebenso eine Anfärbung der zahlreichen zwischen den Epithelzellen liegenden Thymozyten sowie an bindegewebige Binnenstrukturen wie interlobuläre Septen und Gefäße.

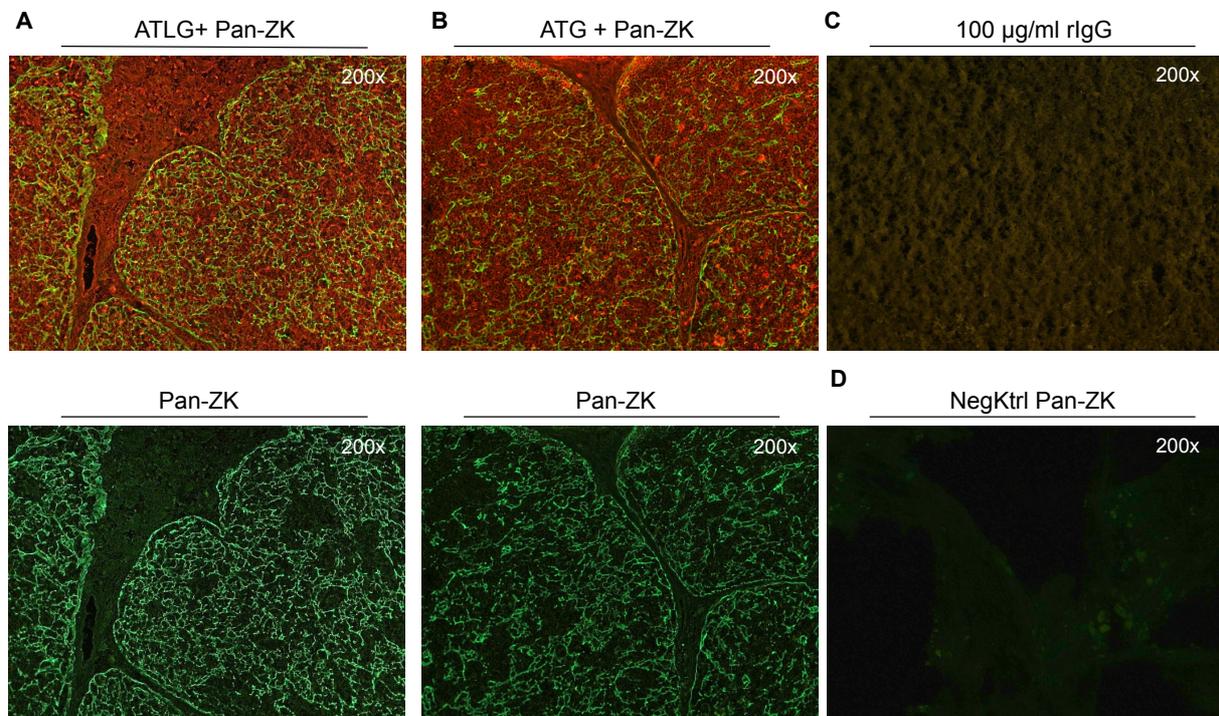


Abbildung 11: Bindung von ATG und ATLG an frisches, schockgefrorenes humanes Thymusgewebe.

Anti-Kaninchen Antikörper zur rATG-Detektion (rot), Pan-ZK (grün). A: 100 µg/ml ATLG (rot) und Pan-ZK (grün); B: 100 µg/ml ATG (rot) und Pan-ZK (grün); C: 100 µg/ml rIgG Kontrolle; D: Negativkontrolle Pan-ZK. Dargestellt sind repräsentative Beispiele, insgesamt n=3.

4.5 Bestimmung der rATG-induzierten Apoptose in kultivierten, humanen Thymusstromazellen mittels Annexin V Färbung

Die Komplement-unabhängige Zytotoxizität (CIC) sowie die Komplement-abhängige Zytotoxizität (CDC) durch ATG und ATLG wurden durchflusszytometrisch mittels Annexin V und LIVE/DEAD® Färbung untersucht. Bei der vorliegenden Analyse wurden einfach positive Annexin V⁺ Zellen sowie doppelt positive AnnexinV⁺/LIVE/DEAD®⁺ Zellen als tote Zellen gewertet. Allerdings war der Anteil an doppelt positiven Zellen dabei zu vernachlässigen (siehe Abbildung 12).

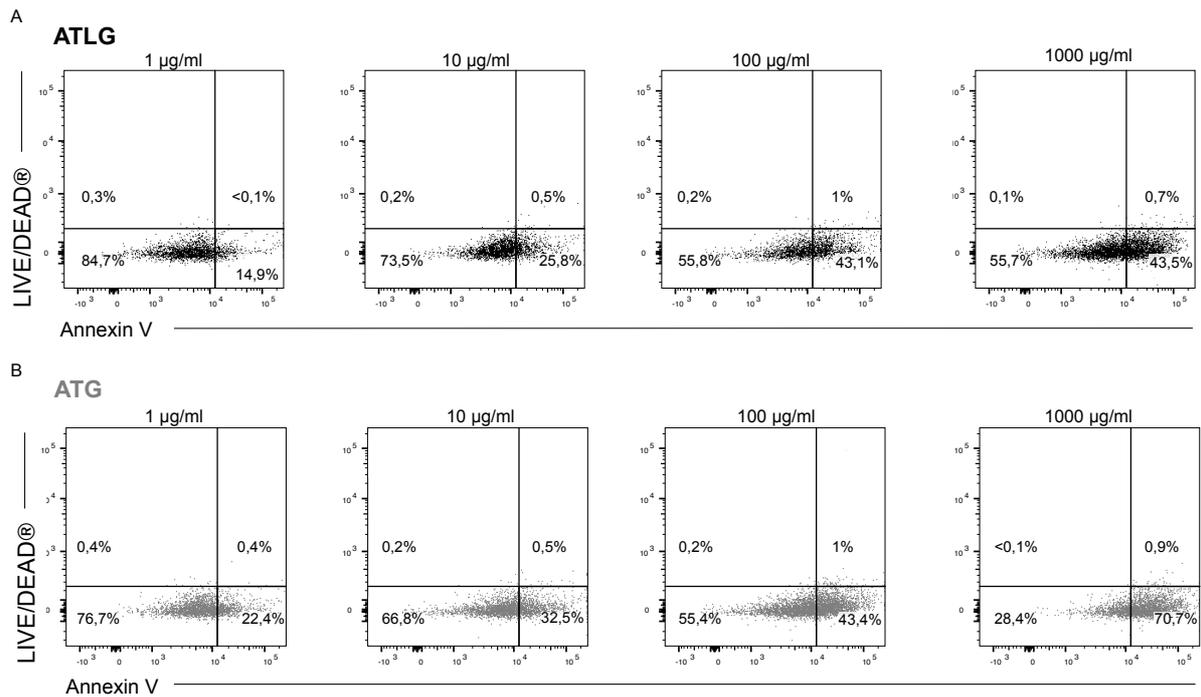


Abbildung 12: Exemplarische Darstellung des durch ATG und ATLG ausgelösten, dosisabhängigen Zelltods.

Unter A ist die durch ATLG, unter B die durch ATG ausgelöste dosisabhängige Apoptose dargestellt. Der Anteil der LIVE/DEAD®⁺ Zellen ist konzentrationsunabhängig gering, daher kann der durch beide rATG Präparate verursachte Zelltod als Apoptose gedeutet werden. Gezeigt ist ein unabhängiges Experiment.

ATG und ATLG zeigten ähnliche Ergebnisse bezüglich der CIC und CDC. Beide Medikamente präsentierten eine dosisabhängige Apoptose. Die Fraktion an toten, also Annexin V⁺/LIVE/DEAD®⁺ Zellen zeigte mit steigender rATG Konzentration eine Zunahme. Die Anzahl der toten Zellen konnte durch die Hinzugabe von humanem Serum als Quelle humanen Komplements sowie durch die Hinzugabe von Kaninchenkomplement erhöht werden. Allerdings blieb bei beiden Komplementformen die Verstärkung des zytotoxischen rATG Effekts unterhalb der Signifikanzgrenze. Die durch Kaninchenkomplement herbeigeführte Steigerung war als stärker zu beobachten (siehe Abbildung 13).

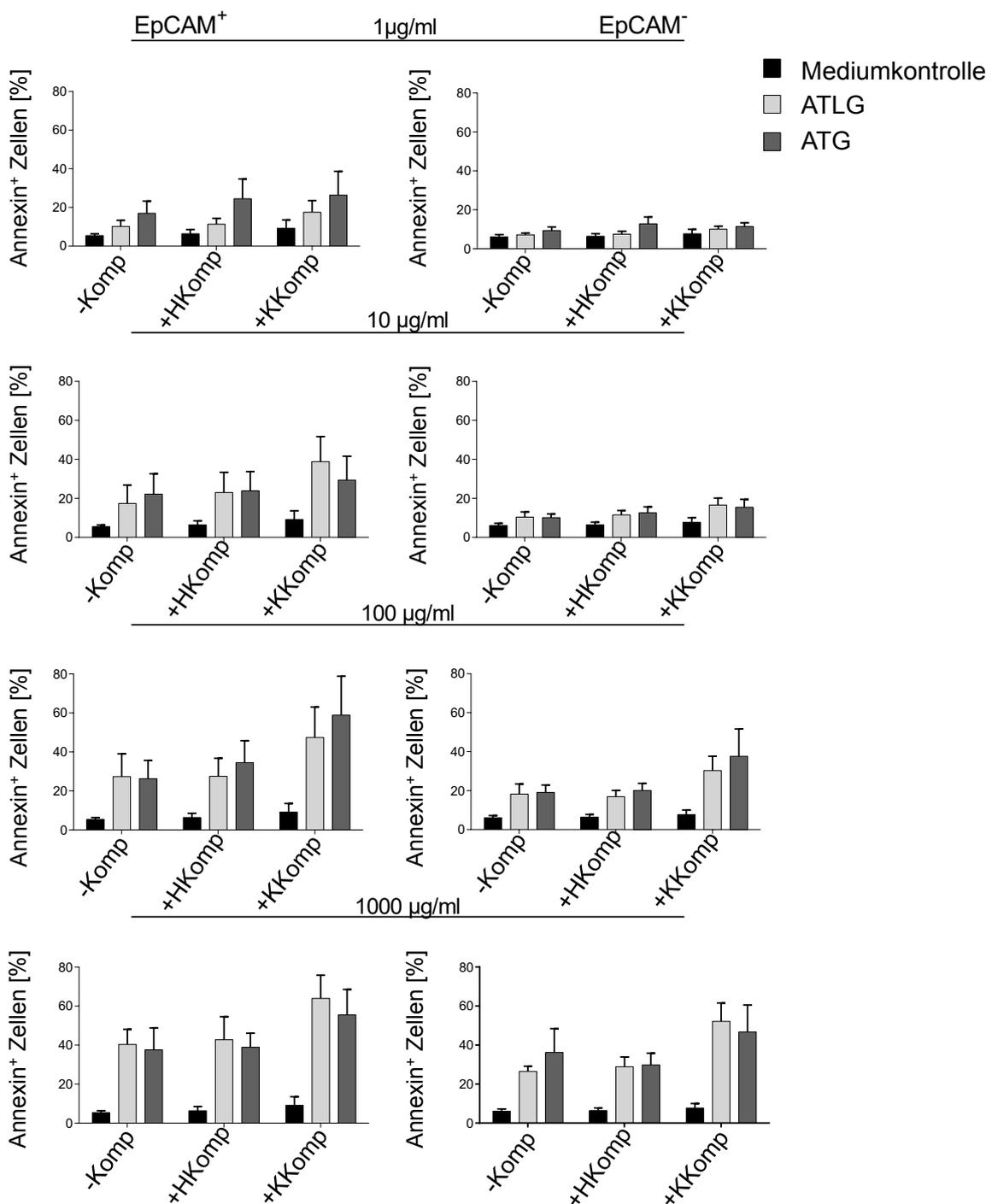


Abbildung 13: rATG-induzierte Apoptose in kultivierten, humanen Thymusstromazellen.

EpCAM⁺ und EpCAM⁻ Annexin V⁺ Thymusepithelzellen nach 24h Inkubation mit verschiedenen rATG Konzentrationen ± humanem Serum bzw. Kaninchenkomplement. Gezeigt sind die Mittelwerte ± SEM von n=5 (+KKomp) bzw. n=6 (-Komp, +HKomp) unabhängigen Experimenten. (-Komp = ohne Komplement; +KKomp = mit Kaninchenkomplement; +HKomp = mit humanem Serum).

Beim Vergleich zwischen EpCAM⁻ Thymusstromazellen und EpCAM⁺ Thymusepithelzellen fiel auf, dass beide rATG Präparate einen stärkeren

apoptotischen Effekt auf EpCAM⁺ Thymusepithelzellen ausübten als auf EpCAM⁻ Stromazellen. Dies kann sowohl in der Annexin V⁺ Fraktion (siehe Abbildung 12) als auch in der Darstellung der mittleren Fluoreszenzintensität (engl. *Median Fluorescent Intensity, MFI*) der Annexin-Färbung beobachtet werden (siehe Abbildung 14). Bei den ATG-Konzentrationen von 1 $\mu\text{g/ml}$ und 10 $\mu\text{g/ml}$ ist der Unterschied zwischen EpCAM⁺ und EpCAM⁻ Thymusstromazellen signifikant, ebenso bei einer ATLG-Konzentration von 1000 $\mu\text{g/ml}$.

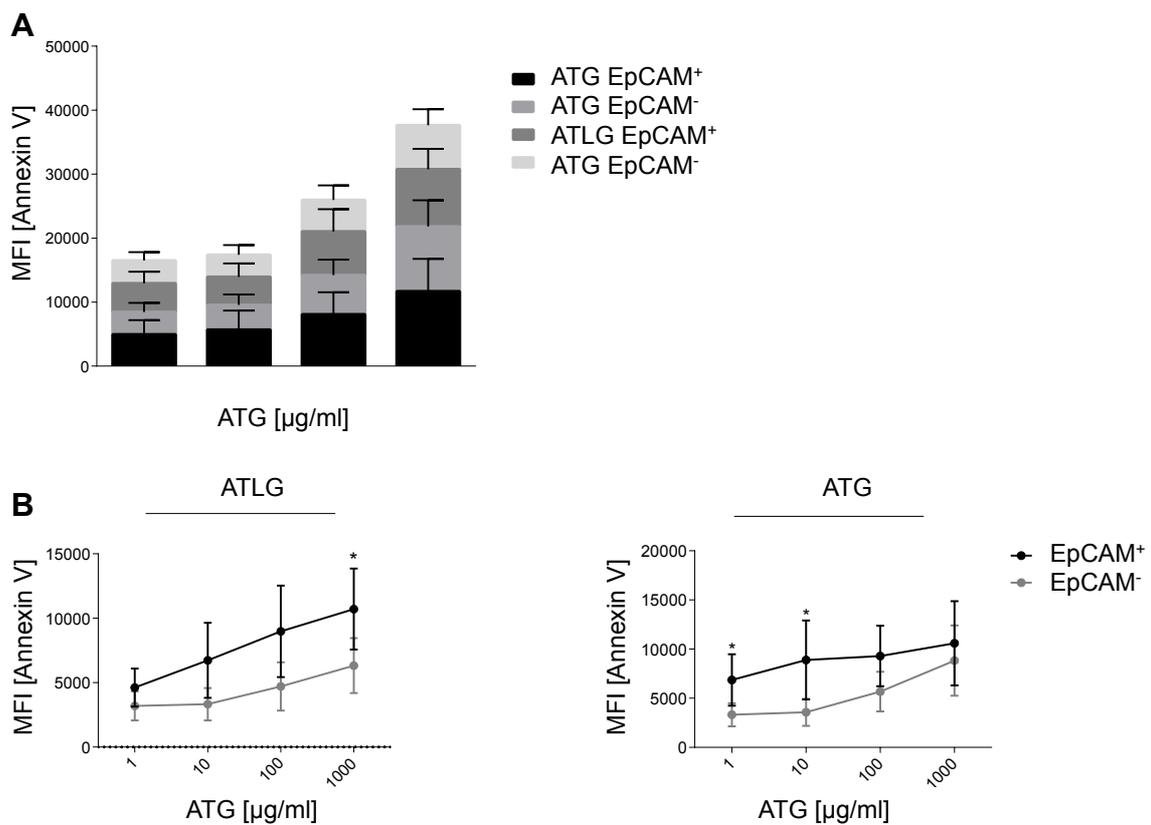


Abbildung 14: Vergleich der MFI der Annexin V⁺ Zellen zwischen EpCAM⁺ und EpCAM⁻ Zellen nach Inkubation mit verschiedenen rATG Konzentrationen.

A zeigt den Vergleich beider Präparate und deren zytotoxischer Effektivität auf EpCAM⁺ und EpCAM⁻ Thymusstromazellen. B zeigt jeweils die Auswirkungen von ATLG und ATG auf beide Zellkompartimente. * = $p < 0,05$. $n = 6$.

4.6 Untersuchung des Apoptosemechanismus mittels Pan-Caspaseinhibitor QVD

Zur weiteren Charakterisierung des Apoptosemechanismus wurde der Einfluss des Pan-Caspaseinhibitors QVD auf die Interaktion zwischen rATG und kultivierten humanen Thymusstromazellen mittels Durchflusszytometrie untersucht. Dabei konnte festgestellt werden, dass der Caspaseinhibitor QVD die durch ATG sowie die durch ATLG induzierte Apoptose in kultivierten humanen Thymusstromazellen nicht signifikant inhibieren konnte (siehe Abbildung 15).

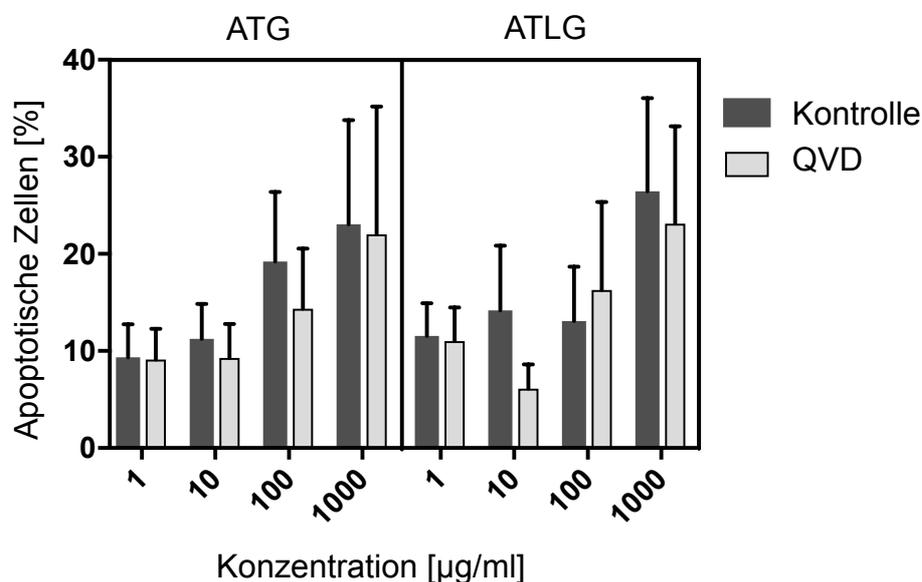


Abbildung 15: rATG-induzierte Apoptose in EpCAM+ kultivierten, humanen Thymusstromazellen unter Zugabe des Pan-Caspaseinhibitors QVD.

Gezeigt sind durchflusszytometrische Messungen der Annexin V⁺ apoptotischen Zellen. Es ist die Kontrolle (nur rATG) im Vergleich zum Pan-Caspaseinhibitor QVD (plus rATG) dargestellt. Es zeigte sich keine signifikante Inhibition der Apoptose durch die Hinzugabe des Pan-Caspaseinhibitors QVD. n=4.

4.7 Antigenexpression auf der Jurkatzelllinie, frischen humanen Thymozyten und humanen kultivierten Thymusstromazellen

Um mögliche unerwünschte Effekte von ATG und ATLG auf humanes Thymusstroma zu erklären, wurde die Expression verschiedener Oberflächenmarker auf Jurkatzellen, frischen humanen Thymozyten und humanen kultivierten Thymusstromazellen

untersucht. Wie in Abbildung 16 gezeigt, konnten mehrere Oberflächenmarker gefunden werden, welche auf Jurkatzellen und kultivierten humanen Thymusstromazellen (CD31, CD90, HLA-DR) oder auf frischen Thymozyten und kultivierten humanen Thymusstromazellen (CD31, HLA-DR) exprimiert werden. CD31 wurde auf 85% der Jurkatzellen und auf 13,4% der kultivierten humanen Thymusstromazellen exprimiert. CD90 wurde auf 80,1% der Jurkatzellen und auf 84,6% der kultivierten humanen Thymusstromazellen exprimiert. HLA-DR wurde von 25,3% der Jurkatzellen und von 20% der kultivierten humanen Thymusstromazellen exprimiert. Weitere Oberflächenmarker wie CD3, CD45, EpCAM sowie Anti-Fibroblasten Antikörper wurde nur entweder auf Jurkatzellen oder auf kultivierten humanen Thymusstromazellen gefunden (CD3: 93,8% auf Jurkatzellen, <1% auf kultivierten humanen Thymusstromazellen; CD45: 97,9% auf Jurkatzellen, <1% auf kultivierten humanen Thymusstromazellen; EpCAM: <0.05% auf Jurkatzellen, >20% auf kultivierten humanen Thymusstromazellen; Anti-Fibroblasten Antikörper: <0.1% auf Jurkatzellen, >20% auf kultivierten humanen Thymusstromazellen). Als gemeinsame Oberflächenmarker von frischen Thymozyten und kultiviertem humanem Thymusstroma konnten CD31 (31,5% auf frischen Thymozyten und 13,4% auf kultivierten Thymusstromazellen) sowie HLA-DR (17,1% auf frischen Thymozyten und 25,3% auf kultivierten Thymusstromazellen) identifiziert werden. CD3, CD45, EpCAM und den Anti-Fibroblasten Antikörper konnten bei der Betrachtung frischer Thymozyten im Vergleich zu kultivierten humanen Thymusstromazellen nur auf jeweils einer der Zellgruppen gefunden werden (CD3: 83,3% auf frischen Thymozyten, <1% auf kultivierten humanen Thymusstromazellen; CD45: 94,9% auf frischen Thymozyten, <1% auf kultivierten humanen Thymusstromazellen; EpCAM: <0,05% auf frischen Thymozyten, >20% auf kultivierten humanen Thymusstromazellen; Anti-Fibroblasten Antikörper: >0.1% frischen Thymozyten, >20% auf kultivierten humanen Thymusstromazellen).

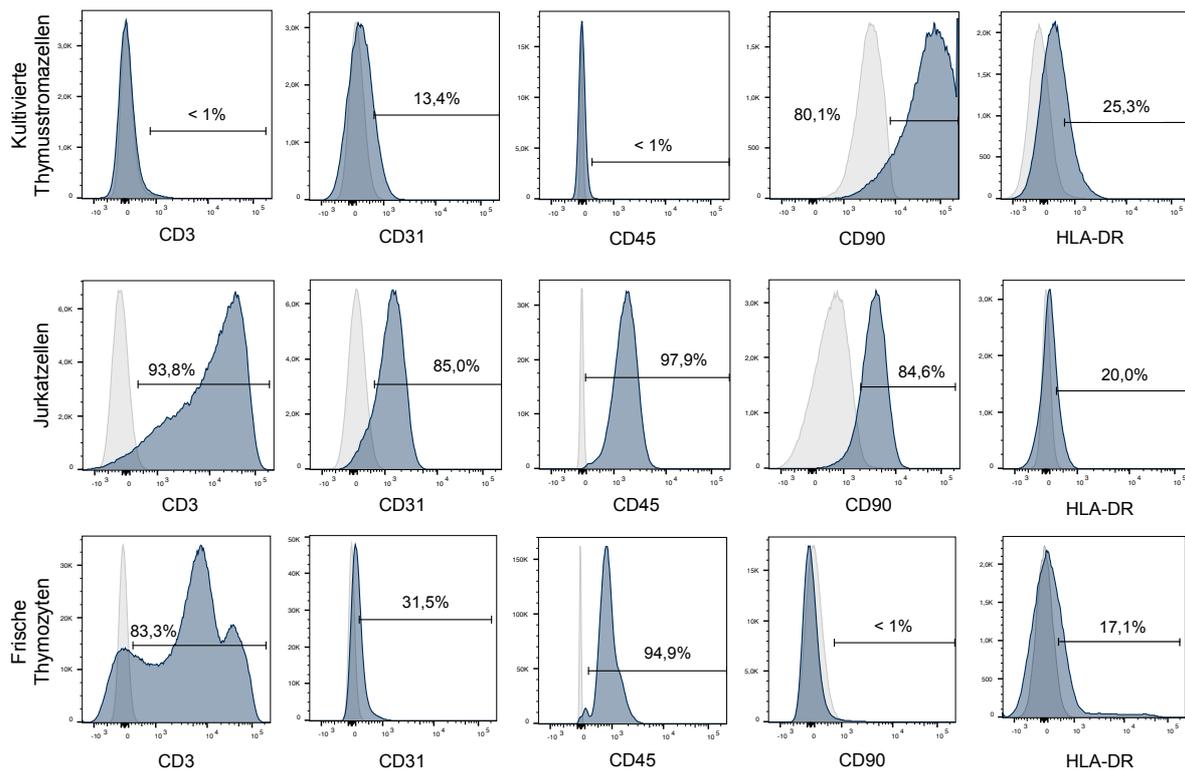


Abbildung 16: Expression verschiedener Oberflächenmarker auf Jurkatzellen, frischen humanen Thymozyten und kultivierten humanen Thymusstromazellen.

In dunkelgrau ist die Antikörperfärbung, in hellgrau die jeweilige Isotypkontrolle dargestellt. Gezeigt ist die MFI eines unabhängigen Experiments.

5. Diskussion

In der vorliegenden Arbeit wurde untersucht, ob und in welchem Maß ATG und ATLG neben dem erwünschten Effekt einer T-Zelldepletion im Rahmen der GvHD Prävention auch die T-Zellrekonstitution nach einer alloHSZT negativ beeinflussen, indem sie eine zytotoxische Aktivität gegenüber humanen Thymusstromazellen aufweisen.

5.1 Etablierung der primären humanen Thymusstromazellkultur

Die erfolgte Etablierung einer primären humanen Thymusstromazellkultur unter Verwendung von frischem Thymusgewebe hatte zum Ziel, ein Kultursystem zu entwickeln, welches einen möglichst hohen Anteil an Thymusepithelzellen aufweist. Dazu wurden zunächst ein serumhaltiger sowie ein serumfreier Kulturansatz erprobt,

welche in ähnlicher Form bereits in der Literatur beschrieben wurden [66-69]. Schnell wurde deutlich, dass die serumfrei kultivierten Zellen - im Gegensatz zu serumhaltig kultivierten - einen größeren Anteil an Epithel-ähnlichen Zellen aufwiesen. Diese zunächst auf die Morphologie gestützte Annahme konnte durch immunphänotypische Charakterisierungen mittels Durchflusszytometrie sowie mittels immunzytologischer Färbungen bestätigt werden. Wie bereits vielfach beschrieben, begünstigte das dem serumhaltigen Kulturansatz hinzugefügte fetale Kälberserum ein Überwachsen von Fibroblasten [70]. Dieser Umstand konnte unter serumfreien Kulturbedingungen und der Zugabe verschiedener Hormone und Spurenstoffe sowie dem Beschichten der Kulturplatten mit Kollagen Typ I umgangen werden. Ein Unterlassen der Beschichtung der Kulturplatten mit Kollagen Typ I führte bei der serumfreien Kultur trotz identischer Mediumzusammensetzung zu einem raschen Absterben der Zellen und ist demnach als ein essentieller Bestandteil für das Überleben und die Adhäsion der humanen Thymusstromazellen zu bewerten. Die Relevanz der serumfreien Kultivierung und der Beschichtung der Kulturplatten beschrieben bereits Schreiber *et al.* im Jahr 1991 [69]. Auch diese Arbeitsgruppe untersuchte verschiedene Kultivierungsansätze für humane Thymusstromazellen sowie die Beschichtung der Kulturplatten mit einer Extrazellulärmatrix, welche in einem aufwändigen Verfahren aus bovinen kornealen Endothelzellen extrahiert wurde. Die in der vorliegenden Arbeit verwendeten mit Kollagen I beschichteten Kulturplatten stellen eine effizientere Methode dar, welche zu einem mindestens ebenso zufriedenstellenden Ergebnis führt. Weiterhin favorisierten Schreiber *et al.* gleichermaßen eine serumfreie Kultivierungsmethode. Dem von ihnen genutzten Medium wurden einige zusätzliche Faktoren, namentlich EGF (= *epithelial growth factor*), Insulin, Hydrokortison, HDL (= *high density lipoprotein*), Triiodthyronin, Transferrin und Selen, hinzugefügt. In dem hier beschriebenen Kultursystem waren für die erfolgreiche Kultivierung humaner Thymusepithelzellen lediglich EGF, Insulin, Hydrokortison, Transferrin und Selen notwendig. Neben der Gruppe von Schreiber *et al.* kultivierten auch andere erfolgreich humane Thymusstromazellen und stellten das Vorhandensein von Epithelzellen meist mittels immunhistochemischer Zytokeratin- [67-69] oder EpCAM-Färbungen [68] fest. Allerdings wurden von keiner der Arbeiten mögliche Epithelzellmarker mittels Durchflusszytometrie untersucht oder aber die Anzahl der Epithelzellen mit anderen Methoden - abgesehen von der

Immunhistochemie - objektiviert. Die hier präsentierten Ergebnisse zeigen, dass die immunhistochemische Pan-Zytokeratin-Färbung der serumfrei kultivierten Thymusstromzellen zwar auf einen Anteil von nahezu 100% Epithelzellen hinweist; die durchflusszytometrisch gemessene Fraktion der gleichen Zellen jedoch nur bis zu 60% EpCAM⁺ Epithelzellen beträgt. Die hier gezeigte unterschiedliche Sensitivität von EpCAM⁺ und EpCAM⁻ Zellen gegenüber der beiden rATG Präparate (siehe Abbildung 13 und 14) lassen darauf schließen, dass es sich tatsächlich um funktionell unterschiedliche Zellen handelt. Die durchflusszytometrische Auftrennung in Epithel- und Nicht-Epithelzellen scheint demnach spezifischer zu unterscheiden als die Immunhistochemie. Des Weiteren geht aus der Arbeit von Skogberg *et al.* hervor, dass bei den von der Gruppe vorgenommenen immunhistochemischen Färbungen EpCAM⁺ kultivierte Thymusstromzellen nicht zwangsläufig gleichzeitig auch Zytokeratin 5 bzw. 8 positiv sind [68]. Folglich kann also angenommen werden, dass die Färbung von Zytokeratinen und EpCAM unterschiedliche (Epithel-) Zellen detektiert. Ein Grund dafür mag in den sehr unterschiedlichen Eigenschaften der beiden Epithelmarker liegen. So stellen die Zytokeratine als intrazelluläre Filamente einen Bestandteil des Zytoskeletts von Epithelzellen dar, wobei die einzelnen Vertreter (z.B. Zytokeratin 5 oder Zytokeratin 8) jeweils in spezifischen Epithelzellen vorkommen. Die Filamente dienen hierbei vor allem der Formgebung sowie der intrazellulären Kommunikation der Zelle, beispielsweise bei Prozessen wie der Mitose [71]. Dahingegen ist EpCAM ein oberflächliches Transmembran-Glykoprotein, das die Adhäsion von Epithelzellen an benachbarte Epithelzellen vermittelt und auf den meisten humanen Epithelzellen exprimiert wird [72]. Es kann angenommen werden, dass eine Auftrennung mittels EpCAM, wie sie in dieser Arbeit gezeigt wird, eine verlässlichere Methode der Epithelzellerkennung von Kulturzellen darstellt.

5.2 Beurteilung der Effekte von ATG und ATLG auf kultivierte humane Thymusstromzellen

Wie eingangs dargelegt, spielt das Thymusepithel bei der T-Zellreifung und der T-Zellrekonstitution nach erfolgter alloHSZT eine entscheidende Rolle [53]. Daher wurden alle hier gezeigten funktionellen Versuche insbesondere mit Augenmerk auf das EpCAM⁺ Thymusepithel unternommen. Das etablierte serumfreie Kultursystem

stellt eine verlässliche Möglichkeit dar, *in vitro* Untersuchungen an humanem Thymusstroma- und Thymusepithelzellen durchzuführen. Auch wenn durch das Fehlen der Dreidimensionalität und des Gefäßnetzes die tatsächlichen Begebenheiten des menschlichen Thymus unmöglich vollends zu imitieren sind, kann doch eine begrenzte Vergleichbarkeit mit den tatsächlichen Verhältnissen angenommen werden.

Die unter 4.4 dargestellten Ergebnisse zur rATG Bindung zeigen, dass beide rATG Präparationen in den durchflusszytometrischen Messungen eine dosisabhängige, starke Bindung an Thymusstromazellen aufweisen. Dies gilt gleichermaßen für EpCAM⁻ Stromazellen und EpCAM⁺ Epithelzellen. Auch die immunhistochemischen Färbungen an Gefrierschnitten lassen eine breite Bindung von ATG und ATLG an einige Strukturen des humanen Thymusgewebes erkennen (siehe Abbildung 11). So zeigt sich eine starke Färbung der intralobulär gelegenen Thymozyten und Thymusepithelzellen, jedoch auch der umgebenden bindegewebigen Strukturen und Gefäße. Eine Kontrolle mittels unspezifischem rIgG konnte eine unspezifische Bindung der rATG Antikörper ausschließen. Folglich ist anzunehmen, dass beide rATG Präparate aufgrund ihrer Polyklonalität nicht nur T-Zellen und T-Zellvorläufer depletieren, sondern darüber hinaus auch einen Effekt auf die Stromazellen des Thymus aufweisen.

Die gezeigte Bindung bestätigt jedoch noch keine zytotoxische Aktivität, sodass im Anschluss ebendiese durchflusszytometrisch mittels Annexin V und LIVE/DEAD® Färbung untersucht wurde. Interessanterweise kann trotz nahezu identischer Bindungsaffinität ein Unterschied bezüglich der Zytotoxizität von rATG auf EpCAM⁻ Stromazellen und EpCAM⁺ Thymusepithelzellen festgestellt werden. So zeigt sich bei ATG eine signifikant stärkere zytotoxische Aktivität gegenüber Thymusepithelzellen im Vergleich zu EpCAM⁻ Zellen in den Konzentrationen von 1 µg/ml und 10 µg/ml. Bei einer ATLG-Konzentration von 1000 µg/ml kann ebenfalls eine signifikant stärkere Zytotoxizität gegenüber Thymusepithel im Vergleich zu den EpCAM⁻ Stromazellen festgestellt werden (siehe Abbildung 14). Demnach scheinen beide Medikamente zytotoxische Effekte insbesondere auf das für die T-Zell Rekonstitution wichtige Thymusepithelzellnetz auszuüben. Es kann allerdings auch eine gewisse Zytotoxizität gegenüber Nicht-Epithelzellen beobachtet werden, welche innerhalb des

Kultursystems vorrangig aus Fibroblasten und Endothelzellen bestehen, wie in immunphänotypischen Färbungen mittels Anti-Fibroblasten Antikörper und dem Endothelzellmarker CD31 bestätigt werden konnte (siehe Abbildung 7). Zur genaueren Untersuchung des Wirkungsmechanismus der beiden rATG Präparate wurde zunächst die Zytotoxizität ohne Zugabe von Komplement sowie unter Zugabe von humanem Serum als menschliche Komplementquelle oder aufgereinigtem Kaninchenkomplement gemessen. So konnten Rückschlüsse auf die CIC und die CDC gezogen werden. Wie unter Abschnitt 4.5 dargestellt, wird der Hauptanteil der zytotoxischen Aktivität auf humane Thymusstromazellen von ATLG und ATG über CIC vermittelt. Es kann zwar eine Steigerung des Effekts unter der Zugabe von menschlichem Serum und - noch stärker - unter der Zugabe des Kaninchenkomplements beobachtet werden, allerdings bleiben diese Steigerungen unterhalb des Signifikanzniveaus.

Die hier präsentierten Ergebnisse stellen die erste Untersuchung des Effekts von rATG auf humane Thymusstromazellen dar. Eine Studie aus dem Jahr 2001 untersuchte im Rahmen von Haut- und Herztransplantationen am Primatenmodell bereits die Infiltration von ATG in lymphatische Organe. In dieser Arbeit konnten die Autoren keine ATG-Bindung an Lymphozyten, die aus dem Thymus isoliert worden waren, feststellen; die Antikörper penetrierten laut Autoren das Thymusgewebe nicht. Diese Aussage steht im Widerspruch zu der dieser Arbeit zu Grunde liegenden Annahme, wonach rATG den Thymus erreicht und somit beeinflusst. Allerdings ist das Ergebnis der besagten Studie angesichts mehrerer Gründe kritisch zu betrachten. Zunächst wurden in der Studie erwachsene Makaken als Versuchstiere verwendet, welche vor der rATG Applikation – ungleich mit der realen Situation während einer alloHSZT am Menschen – keinerlei Form von Chemo- oder Radiotherapie erhalten hatten. Der erwachsene Thymus der Makaken wurde also weder durch eine vorhandene Lymphopenie in einen „aktivierten“ Zustand versetzt noch durch die Toxizität einer Konditionierungstherapie vorgeschädigt. Weiterhin räumen die Autoren ein, dass die ATG-Bindung im Makaken insgesamt etwa sechsfach schwächer ist als im Menschen, obwohl den Makaken herkömmliche rATG Dosierungen verabreicht wurden (1 mg/kg, 5 mg/kg, 20 mg/kg). Auch durfte die Halbwertszeit des Medikaments deutlich kürzer gewesen sein als unter echten Bedingungen im Rahmen einer alloHSZT, da die

Makaken durch die fehlende Konditionierung über ein effektives Immunsystem verfügten und höchstwahrscheinlich rasch Anti-rATG-Antikörper gebildet haben, welche zu einer gesteigerten Clearance beigetragen haben dürften. Aus den dargelegten Gründen wurde in der hier vorliegenden Arbeit trotz der Ergebnisse der oben beschriebenen Studie eine Penetration von rATG in den menschlichen Thymus im Rahmen einer alloHSZT angenommen.

Allerdings wurden auch einige andere Zellpopulationen und deren Sensitivität gegenüber rATG in anderen Studien evaluiert. Obwohl rATG vornehmlich zur T-Zelldepletion und damit zur Vermeidung einer GvHD nach alloHSZT eingesetzt wird, zeigen beide Medikamente, bedingt durch ihre Polyklonalität, weitaus mehr Spezifitäten. ATG, welches mittels der Immunisierung von Kaninchen mit humanen fetalen Thymozyten hergestellt wird, weist unter anderem Antikörper gegen CD2, CD3, CD4, CD8, CD11a, CD18, CD25, CD38, CD45, CD52, CD126, CD138 und HLA-DR auf [73-76]. Einige Arbeiten konnten außerdem das breite zytotoxische Potential des Medikaments zeigen. So konnten pro-apoptische Effekte von ATG auf T-Zellen, B-Zellen, Monozyten, Thymozyten, primäre Myelomzellen und -zelllinien sowie auf primäre Leukämiezellen und -zelllinien detektiert werden [35,36,76-81]. Die zytotoxischen Effekte von ATLG sowie dessen Antigenspezifitäten waren ebenfalls Bestandteil einiger Untersuchungen. Da ATLG durch die Herstellung mit der Jurkatzelllinie vorrangig gegen aktivierte T-Zellen gerichtet sein soll, wurden von Bourdage *et al.* vor allem T-Zell typische Oberflächenmoleküle untersucht und Antikörper gegen die Oberflächenmoleküle CD2, CD5, CD7 und CD45 beschrieben [82]. Allerdings sind weitere Antikörper gegen andere Antigene anzunehmen, da auch ATLG eine weitreichende zytotoxische Aktivität zeigt. So konnte eine ATLG-induzierte Apoptose in sämtlichen PBMC Kompartimenten, Thymozyten, Jurkat- und anderen Leukämiezellen sowie Myelomzellen beobachtet werden [17,35,36,81,83-85]. Interessanterweise untersuchten auch einige Gruppen beide rATG Präparate im Vergleich. Unsere Arbeitsgruppe stellte *in vitro* eine signifikant höhere Toxizität von ATG gegenüber humanen Thymozyten im Vergleich zu ATLG fest [35]. Weiterhin konnte ein Trend zur stärkeren Apoptose in Lymphozyten, Monozyten und chronisch lymphatischen Leukämiezellen durch ATG gezeigt werden [36,81]. Darüber hinaus untersuchten einige Arbeiten die CIC und CDC der beiden rATG Präparate. In der

Mehrheit der Untersuchungen konnte eine rATG-induzierte CDC verschiedener Zellen (PBMCs, Thymozyten, Jurkatzellen, Leukämie- und Myelomzellen) beobachtet werden [35,36,76,77,80,81,85]. Einige Autoren beschrieben jedoch auch eine starke CIC, wie sie in der vorliegenden Arbeit gezeigt wird [17,80,81]. Ferner berichtete eine Gruppe, welche die Auswirkungen von ATG auf leukämische Blasten untersuchte, von stark variierenden Ergebnissen bezüglich der CDC und CIC. Auch in der vorliegenden Arbeit variierten die Apoptoseraten nach rATG Inkubation teilweise erheblich (siehe Abschnitt 4.5 und Abbildung 13 und 14).

Zur Charakterisierung des genauen Apoptosemechanismus von rATG in humanen Thymusstromazellen wurde eine Untersuchung der durch ATLG und ATG ausgelösten Zellschädigung unter der Zugabe des Pan-Caspaseinhibitors QVD untersucht (siehe Abschnitt 4.6). Caspasen vermitteln sowohl die durch den extrinsischen Weg (Bindung eines Fas-Liganden an den Fas-Rezeptor CD95 [86]), als auch die durch den intrinsischen Weg (Freisetzung von Cytochrom c und anderen pro-apoptotischen Faktoren aus den Mitochondrien [87,88]) ausgelöste Apoptose. Die hier gezeigte Zytotoxizität durch ATLG und ATG konnte nicht durch die Zugabe von QVD inhibiert werden. Dies steht potentiell im Widerspruch zu den hier gezeigten Ergebnissen, welche eine rATG-induzierte Apoptose mithilfe der Annexin V und LIVE/DEAD® Färbung zeigen (siehe Abbildung 12, 13 und 14). Annexin V ist ein rekombinantes Bindungsprotein, welches stark und spezifisch mit Phosphatidylserin interagiert, welches durch den Vorgang der Apoptose an die extrazelluläre Membranoberfläche gelangt und somit zur zuverlässigen Detektion apoptotischer Zellen dient [89]. Der Fluoreszenzfarbstoff LIVE/DEAD® reagiert lediglich mit intrazellulären Proteinen und färbt diese an, kann jedoch die intakte Zellmembran lebender Zellen nicht überwinden. Daher bietet LIVE/DEAD® eine zuverlässige Möglichkeit, lebende Zellen von toten, vor allem nekrotischen Zellen zu unterscheiden. Da wie oben dargelegt sowohl die extrinsische als auch die intrinsische Apoptose caspaseabhängig sind, weicht der hier dargestellte Zelltodmechanismus von der klassischen Apoptose ab. Da die doppelt positiven, Annexin V⁺/LIVE/DEAD®⁺ Zellen nur einen sehr geringen Anteil an allen Annexin⁺ Zellen darstellten, ist ein nekrotischer bzw. nekroptotischer Zelltod durch rATG unwahrscheinlich. Interessanterweise wurde eine solche caspaseunabhängige mit Phosphatidylserin-Externalisierung verbundene Apoptose bereits an anderer Stelle

beschrieben [90]. Auch hier konnten die Autoren die in primären T Zellen durch verschiedene Medikamente hervorgerufene und durch Annexin V Färbung dargestellte Apoptose nicht mittels Caspaseinhibition hemmen. Jedoch ließ sich eine durch die gleichen Medikamente herbeigeführte Desoxyribonukleinsäure (DNS) - Fragmentierung durch die Caspaseinhibition verhindern. Dieser ungewöhnliche Mechanismus konnte allerdings nicht in aktivierten T Zelllinien wie der Jurkat Zelllinie bestätigt werden, sondern war lediglich in primären T Zellen zu finden. Überdies zeigten zwei weitere Arbeiten eine durch rATG induzierte, nicht-klassische und caspaseunabhängige Apoptose [81,83]. Um diesen ungewöhnlichen Apoptosemechanismus genauer zu beschreiben, müssten weitere Experimente folgen. So wäre es beispielsweise sinnvoll, die DNS-Fragmentierung in TSZ nach der Behandlung mit rATG zu untersuchen sowie deren mögliche Hemmung durch den Caspaseinhibitor QVD zu überprüfen. Auch wäre ein Vergleich zwischen den hier verwendeten primären TSZ und kommerziell erhältlichen Thymusepithel-Zelllinien interessant.

5.3 Bewertungen der rATG-induzierten Zytotoxizität unter Beachtung klinisch relevanter Konzentrationen

Die hier präsentierten Ergebnisse, welche eine Zytotoxizität beider rATG Präparate zeigen, sollten unter Beachtung der klinisch relevanten Dosierungen beurteilt werden. Um klinisch relevante Serumkonzentrationen beider Medikamente abzudecken, wurde eine Konzentrationsspanne zwischen 1 $\mu\text{g/ml}$ und 1000 $\mu\text{g/ml}$ gewählt. Allerdings herrscht bezüglich der klinischen Anwendung nach wie vor Uneinigkeit über den optimalen Applikationszeitpunkt sowie die Dosierungen und damit auch über die erreichten Serumkonzentrationen von beiden rATG Präparaten. Einige Studien beschäftigen sich jedoch mit der Ermittlung der optimalen Dosierungen in verschiedenen alloHSZT Settings. Die meisten dieser Arbeiten untersuchen ATG [19,20,91-96]. Trotz der Vielzahl an Studien zu ATG bleibt eine definitive Aussage über die *in vivo* erreichten Serumlevel schwierig, da die Studien sehr heterogene Patientengruppen sowie unterschiedliche rATG-Dosierungen untersuchen. Es finden sich Serumkonzentrationen von ca. 1 $\mu\text{g/ml}$, [95], über 10 $\mu\text{g/ml}$ [19,91], 40 $\mu\text{g/ml}$ [94], 70 $\mu\text{g/ml}$ [20] oder gar 180 $\mu\text{g/ml}$ [93], je nach verabreichter Kumulativdosis und

Patientenkollektiv. So variieren die verabreichten rATG Dosen beispielsweise je nach Stammzellquelle, Patientenalter und HLA-Kompatibilität. Weiterhin muss beachtet werden, dass einige Autoren bei der Untersuchung der rATG Serumkonzentration zwischen totalem und aktivem rATG unterscheiden, andere nicht. Nur eine Studie untersuchte die erreichte Serumkonzentration von ATLG im Rahmen einer alloHSZT [97]: Eiermann *et al.* bestimmten 1999 eine Serumkonzentration von $>900 \mu\text{g/ml}$ bei einer kumulativen Dosis von 90 mg/kg. Die Hersteller von ATLG empfehlen allerdings aktuell eine Dosis von jeweils 20 mg/kg/Tag über die Tage -3 bis -1 vor Transplantation [98]. Darüber hinaus untersuchten einige neuere Studien die Effektivität und Zytotoxizität von weitaus geringeren ATLG und ATG Dosierungen als bislang im Rahmen einer GvHD Prophylaxe üblich [25,39,99-102]. Eine pädiatrische Studie konnte die Effektivität von ATLG bei einer kumulativen Dosis von 15 mg/kg zeigen. Diese niedrigere Dosierung war einer Dosis von 30 mg/kg bezüglich des 5-Jahres Gesamtüberleben signifikant überlegen [99]. In einer weiteren Arbeit, welche ebenfalls 15 mg/kg mit 30 mg/kg ATLG als Bestandteil der myeloablativen Konditionierung von erwachsenen AML Patienten bei HLA-identer Familienspende verglich, konnte zwar keine Unterschiede bezüglich des Gesamtüberlebens feststellen. Allerdings konnte bei einer Dosis von 30 mg/kg ATLG neben einer stärkeren Reduktion der cGvHD auch eine signifikant erhöhte Infektanfälligkeit verzeichnet werden [39]. Hierbei sollte zusätzlich bedacht werden, dass 30 mg/kg Körpergewicht bereits eine Reduktion um 50% gegenüber der vom Hersteller empfohlenen Kumulativdosis darstellen. Des Weiteren werden in kürzlich veröffentlichten Beobachtungsstudien auch niedrige ATG Dosierungen in ihrer Effektivität untersucht. Mehrere Arbeiten bestätigten die T-Zell depletierende Aktivität sowie eine suffiziente GvHD Prophylaxe bei kumulativen Thymoglobulin Dosierungen von 2 mg/kg bis 5 mg/kg [100-102]. Folglich kann angenommen werden, dass in Anbetracht der besprochenen und potentiell noch folgender Studien zur Dosisfindung beider rATG Präparate die bisher angewandten Kumulativdosen gegebenenfalls nach unten korrigiert werden.

Um eine Analyse der hier gezeigten Ergebnisse mit klinisch relevanten Serumkonzentrationen vorzunehmen, müssten dementsprechend die zytotoxische Aktivität von ATG bei einer Konzentration von $10 \mu\text{g/ml}$ mit der von ATLG bei einer

Konzentration von 100 $\mu\text{g/ml}$ verglichen werden. Trotz eines deutlichen Trends zu einer stärkeren Zytotoxizität durch ATLG bleibt dieser jedoch nicht signifikant.

Weiterhin sollte bedacht werden, dass neben der Dosistitrierung mithilfe des Körpergewichts des Patienten auch eine Dosisanpassung mittels absoluter Lymphozytenzahlen (*absolute lymphocyte count* = ALC) vor der Transplantation diskutiert wird, um die individuelle Pharmakokinetik von rATG stärker zu berücksichtigen [103-106]. Durch eine solche Dosisanpassung, welche gegebenenfalls zu einer Reduktion der verabreichten rATG Kumulativedosis führen könnte, könnte auch die Toxizität auf den Gesamtorganismus inklusive des Thymus gesenkt werden.

5.4 Beurteilung der Ausgangshypothese und immunphänotypische Charakterisierung von Jurkatzellen, frischen Thymozyten und kultivierten humanen Thymusstromazellen

Die ursprüngliche Hypothese, dass ATG aufgrund seiner Herstellungsweise mithilfe von humanen Thymozyten eine stärkere Toxizität auf humane Thymusstromzellen aufweise, konnte aufgrund der hier dargestellten Ergebnisse nicht bestätigt werden. Tatsächlich konnten keine signifikanten Unterschiede bezüglich der durch ATG oder ATLG ausgelösten CIC oder CDC in humanen Thymusstromazellen beobachtet werden. Um zu eruieren, weshalb ATLG trotz seines durch die Produktion mit Jurkatzellen auf aktivierte T-Zellen ausgerichteten Antigenprofils humane Thymusstromazellen schädigt, wurde die Expression verschiedener Oberflächenmarker auf den drei benannten Zellgruppen untersucht. Die unter Abschnitt 4.7 gezeigten Ergebnisse bestätigen mehrere Antigene, welche auf Jurkatzellen und kultivierten Thymusstromazellen bzw. auf humanen Thymozyten und kultivierten Thymusstromazellen exprimiert werden. So konnte beispielsweise das Oberflächenmolekül CD31 (PECAM-1) auf etwa 85% der Jurkatzellen, etwa 31% der humanen Thymozyten und etwa 13% der Thymusstromazellen gefunden werden. CD31 ist zwar weithin bekannt als Endothelzellmarker, es scheint jedoch auch eine bedeutsame Rolle bei der Integration von Adhäsions- und Signalvorgängen zwischen Endothel und Immunzellen, insbesondere T-Zellen, zu spielen [107]. Demnach ist es

nicht verwunderlich, dass CD31 auf einem großen Anteil der Thymozyten und Jurkatzellen exprimiert wird, wobei letztere Eigenschaften ähnlich denen von aktivierten T-Zellen aufweisen. Auch CD90 (Thy-1) ist ein Oberflächenmolekül, welches u.a. auf der Oberfläche von T-Zellen und Endothelzellen gefunden wird und bei verschiedenen Vorgängen wie beispielsweise der T-Zell Aktivierung [108], jedoch auch bei der Adhäsion von Thymozyten an Thymusepithel [109] von Bedeutung ist. CD90 wurde zu ca. 85% von Jurkatzellen und zu ca. 80% von Thymusstromazellen exprimiert. Interessanterweise konnte keine CD90 Expression auf humanen Thymozyten beobachtet werden, obwohl diese in der Literatur beschrieben ist [110]. Auch das MHC-Molekül der Klasse II HLA-DR ist auf allen drei Zellgruppen zu finden. Dieses als T-Zell-Rezeptorligand fungierende Oberflächenmolekül ist als Teil der MHC Klasse II Moleküle auf sämtlichen Antigen-präsentierenden Zellen zu finden. Daher ist es naheliegend, dass auch Thymusepithelzellen, welche im Thymus reifenden T-Zellprogenitoren Selbstantigene präsentieren, dieses Antigen tragen. HLA-DR wird auch von etwa 20% der Jurkatzellen und von etwa 17% der Thymozyten exprimiert. Dies ist konkordant mit einer Arbeit, in welcher MHC Klasse II Moleküle auf aktivierten T-Zellen beschrieben wurden [111]. In der Zusammenschau dieser Ergebnisse lässt sich sagen, dass über die Expression gemeinsamer Antigene durch kultivierte Thymusstromazellen und Jurkatzellen, welche zur Herstellung von ATLG genutzt werden, eine Erklärung für die unerwünschten Nebeneffekte des Medikaments gegenüber humanem Thymusgewebe gefunden werden konnte.

Entgegen der anfänglichen Hypothese, dass die in ATLG enthaltenen Antikörper spezifischer gegen T-Zellen gerichtet sind als die des Medikaments ATG, konnte eine vergleichbare Toxizität der beiden rATG Präparate auf humanes Thymusstroma, insbesondere auf humane Thymusepithelzellen, festgestellt werden.

5.5 Schlussfolgerung

Zusammenfassend zeigen die hier dargestellten Ergebnisse, dass die beiden weithin angewandten rATG Präparate ATLG und ATG einen zytotoxischen Effekt auf humane Thymusstromazellen ausüben, welcher hauptsächlich Komplement-unabhängig vermittelt wird. Infolgedessen ist anzunehmen, dass die rATG Gabe im Rahmen einer alloHSZT den durch Konditionierungstherapien und thymische GvHD gegebenenfalls

bereits vorgeschädigten Thymus [53,112,113] zusätzlich beeinträchtigt und damit die T-Zell Rekonstitution nach einer Transplantation negativ beeinflusst. Weitere experimentelle Untersuchungen bezüglich des genauen Apoptosemechanismus durch rATG wären sinnvoll, um die Wirkungsweise des Medikaments besser nachvollziehen zu können und so z.B. adäquate thymusregenerative Strategien in das Konditionierungsregime mitaufzunehmen. Es werden bereits einige Substanzen untersucht, welche den Thymus im Rahmen einer alloHSZT und den damit assoziierten pharmakologischen Interventionen schützen können. Dazu gehören Interleukin-7 (IL-7), Keratinozyten Wachstumsfaktor (*keratinocyte growth factor* = KGF) sowie die Inhibition von Sexualsteroidhormonen [114-117]. Die thymusanregende Eigenschaft von IL-7 konnte in präklinischen Studien gezeigt werden [118,119]. Ebenso wurde die Fähigkeit von KGF, Thymusepithelzellen vor Schäden durch Radio- und Chemotherapien sowie autologer und allogener hämatopoetischer Stammzelltransplantation zu schützen, im Maus- und Rhesusaffenmodell gezeigt. Auch wird aktuell die Kombinationstherapie aus KGF und dem GnRH-Analogen Leuprorelin innerhalb einer klinischen Phase II Studie untersucht (NCT01746849).

Schlussfolgernd lässt sich feststellen, dass kontrollierte, randomisierte Studien zur vergleichenden Untersuchung der beiden rATG Präparate sowie zu der Effektivität möglicher thymusprotektiver Therapien in Kombination mit einer rATG Therapie in diesem Kontext sinnvoll und interessant wären.

6. Literaturverzeichnis

1. Cornelissen JJ, Gratwohl A, Schlenk RF, Sierra J, Bornhauser M, Juliusson G, Racil Z, Rowe JM, Russell N, Mohty M, Lowenberg B, Socie G, Niederwieser D, Ossenkoppele GJ. The European LeukemiaNet AML Working Party consensus statement on allogeneic HSCT for patients with AML in remission: an integrated-risk adapted approach. *Nat Rev Clin Oncol*. 2012;9(10):579-590.
2. Juric MK, Ghimire S, Ogonek J, Weissinger EM, Holler E, van Rood JJ, Oudshoorn M, Dickinson A, Greinix HT. Milestones of Hematopoietic Stem Cell Transplantation - From First Human Studies to Current Developments. *Front Immunol*. 2016;7:470.
3. Furst D, Muller C, Vucinic V, Bunjes D, Herr W, Gramatzki M, Schwerdtfeger R, Arnold R, Einsele H, Wulf G, Pfreundschuh M, Glass B, Schrezenmeier H, Schwarz K, Mytilineos J. High-resolution HLA matching in hematopoietic stem cell transplantation: a retrospective collaborative analysis. *Blood*. 2013;122(18):3220-3229.
4. Ferrara JL, Levine JE, Reddy P, Holler E. Graft-versus-host disease. *Lancet*. 2009;373(9674):1550-1561.
5. Lee SJ, Vogelsang G, Flowers ME. Chronic graft-versus-host disease. *Biol Blood Marrow Transplant*. 2003;9(4):215-233.
6. Kroger N, Zabelina T, de Wreede L, Berger J, Alchalby H, van Biezen A, Milpied N, Volin L, Mohty M, Leblond V, Blaise D, Finke J, Schaap N, Robin M, de Witte T, Blood MDSsotCLWPotEGf, Marrow T. Allogeneic stem cell transplantation for older advanced MDS patients: improved survival with young unrelated donor in comparison with HLA-identical siblings. *Leukemia*. 2013;27(3):604-609.
7. Zhang MJ, Davies SM, Camitta BM, Logan B, Tiedemann K, Eapen M, Thiel EL. Comparison of outcomes after HLA-matched sibling and unrelated donor transplantation for children with high-risk acute lymphoblastic leukemia. *Biol Blood Marrow Transplant*. 2012;18(8):1204-1210.
8. Petersdorf EW, Gooley T, Malkki M, Horowitz M, International Histocompatibility Working Group in Hematopoietic Cell T. Clinical significance of donor-recipient HLA matching on survival after myeloablative hematopoietic cell transplantation from unrelated donors. *Tissue Antigens*. 2007;69 Suppl 1:25-30.
9. Arai S, Arora M, Wang T, Spellman SR, He W, Couriel DR, Urbano-Ispizua A, Cutler CS, Bacigalupo AA, Battiwalla M, Flowers ME, Juckett MB, Lee SJ, Loren AW, Klumpp TR, Prockup SE, Ringden OT, Savani BN, Socie G, Schultz KR, Spitzer T, Teshima T, Bredeson CN, Jacobsohn DA, Hayashi RJ, Drobyski WR, Frangoul HA, Akpek G, Ho VT, Lewis VA, Gale RP, Koreth J, Chao NJ, Aljurf MD, Cooper BW, Laughlin MJ, Hsu JW, Hematti P, Verdonck LF, Solh MM, Norkin M, Reddy V, Martino R, Gadalla S, Goldberg JD, McCarthy PL, Perez-Simon JA, Khera N, Lewis ID, Atsuta Y, Olsson RF, Saber W, Waller EK, Blaise D, Pidala JA, Martin PJ, Satwani P, Bornhauser M, Inamoto Y, Weisdorf DJ, Horowitz MM, Pavletic SZ, Graft-vs-Host Disease Working Committee of the C. Increasing incidence of chronic graft-versus-host disease in allogeneic transplantation: a report from the Center for International Blood and Marrow Transplant Research. *Biol Blood Marrow Transplant*. 2015;21(2):266-274.
10. Yuan J, Pei R, Su W, Cao J, Lu Y. Meta-analysis of the actions of antithymocyte globulin in patients undergoing allogeneic hematopoietic cell transplantation. *Oncotarget*. 2017;8(7):10871-10882.

11. Kroger N, Solano C, Wolschke C, Bandini G, Patriarca F, Pini M, Nagler A, Selleri C, Risitano A, Messina G, Bethge W, Perez de Oteiza J, Duarte R, Carella AM, Cimminiello M, Guidi S, Finke J, Mordini N, Ferra C, Sierra J, Russo D, Petrini M, Milone G, Benedetti F, Heinzelmann M, Pastore D, Jurado M, Terruzzi E, Narni F, Volp A, Ayuk F, Ruutu T, Bonifazi F. Antilymphocyte Globulin for Prevention of Chronic Graft-versus-Host Disease. *N Engl J Med.* 2016;374(1):43-53.
12. Kuriyama K, Fuji S, Inamoto Y, Tajima K, Tanaka T, Inoue Y, Ito R, Hayashi Y, Ito A, Kurosawa S, Kim SW, Yamashita T, Fukuda T. Impact of low-dose rabbit anti-thymocyte globulin in unrelated hematopoietic stem cell transplantation. *Int J Hematol.* 2016;103(4):453-460.
13. Bacigalupo A, Lamparelli T, Milone G, Sormani MP, Ciceri F, Peccatori J, Locasciulli A, Majolino I, Di Bartolomeo P, Mazza F, Sacchi N, Pollicheni S, Pinto V, Van Lint MT, Gruppo Italiano Trapianto Midollo O. Pre-emptive treatment of acute GVHD: a randomized multicenter trial of rabbit anti-thymocyte globulin, given on day+7 after alternative donor transplants. *Bone Marrow Transplant.* 2010;45(2):385-391.
14. Finke J, Bethge WA, Schmoor C, Ottinger HD, Stelljes M, Zander AR, Volin L, Ruutu T, Heim DA, Schwerdtfeger R, Kolbe K, Mayer J, Maertens JA, Linkesch W, Holler E, Koza V, Bornhauser M, Einsele H, Kolb HJ, Bertz H, Egger M, Grishina O, Socie G, Group AT-FT. Standard graft-versus-host disease prophylaxis with or without anti-T-cell globulin in haematopoietic cell transplantation from matched unrelated donors: a randomised, open-label, multicentre phase 3 trial. *Lancet Oncol.* 2009;10(9):855-864.
15. 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.
16. Michallet MC, Saltel F, Preville X, Flacher M, Revillard JP, Genestier L. Cathepsin-B-dependent apoptosis triggered by antithymocyte globulins: a novel mechanism of T-cell depletion. *Blood.* 2003;102(10):3719-3726.
17. Grulich C, Ziegler C, Finke J. Rabbit anti T-lymphocyte globulin induces apoptosis in peripheral blood mononuclear cell compartments and leukemia cells, while hematopoietic stem cells are apoptosis resistant. *Biol Blood Marrow Transplant.* 2009;15(2):173-182.
18. Naujokat C, Berges C, Fuchs D, Sadeghi M, Opelz G, Daniel V. Antithymocyte globulins suppress dendritic cell function by multiple mechanisms. *Transplantation.* 2007;83(4):485-497.
19. Waller EK, Langston AA, Lonial S, Cherry J, Somani J, Allen AJ, Rosenthal H, Redei I. Pharmacokinetics and pharmacodynamics of anti-thymocyte globulin in recipients of partially HLA-matched blood hematopoietic progenitor cell transplantation. *Biol Blood Marrow Transplant.* 2003;9(7):460-471.
20. Remberger M, Sundberg B. Rabbit-immunoglobulin G levels in patients receiving thymoglobulin as part of conditioning before unrelated donor stem cell transplantation. *Haematologica.* 2005;90(7):931-938.
21. Bacigalupo A, Lamparelli T, Bruzzi P, Guidi S, Alessandrino PE, di Bartolomeo P, Oneto R, Bruno B, Barbanti M, Sacchi N, Van Lint MT, Bosi A. Antithymocyte globulin for graft-versus-host disease prophylaxis in transplants from unrelated donors: 2 randomized studies from Gruppo Italiano Trapianti Midollo Osseo (GITMO). *Blood.* 2001;98(10):2942-2947.

22. Socie G, Schmoor C, Bethge WA, Ottinger HD, Stelljes M, Zander AR, Volin L, Ruutu T, Heim DA, Schwerdtfeger R, Kolbe K, Mayer J, Maertens JA, Linkesch W, Holler E, Koza V, Bornhauser M, Einsele H, Kolb HJ, Bertz H, Egger M, Grishina O, Finke J, Group AT-FT. Chronic graft-versus-host disease: long-term results from a randomized trial on graft-versus-host disease prophylaxis with or without anti-T-cell globulin ATG-Fresenius. *Blood*. 2011;117(23):6375-6382.
23. Wang Y, Fu HX, Liu DH, Xu LP, Zhang XH, Chang YJ, Chen YH, Wang FR, Sun YQ, Tang FF, Liu KY, Huang XJ. Influence of two different doses of antithymocyte globulin in patients with standard-risk disease following haploidentical transplantation: a randomized trial. *Bone Marrow Transplant*. 2014;49(3):426-433.
24. Hamadani M, Blum W, Phillips G, Elder P, Andritsos L, Hofmeister C, O'Donnell L, Klisovic R, Penza S, Garzon R, Krugh D, Lin T, Bechtel T, Benson DM, Byrd JC, Marcucci G, Devine SM. Improved nonrelapse mortality and infection rate with lower dose of antithymocyte globulin in patients undergoing reduced-intensity conditioning allogeneic transplantation for hematologic malignancies. *Biol Blood Marrow Transplant*. 2009;15(11):1422-1430.
25. Boga C, Yeral M, Gereklioglu C, Asma S, Maytalmann E, Aytan P, Kozanoglu I, Sariturk C, Ozdogu H. Effects of two doses of anti-T lymphocyte globulin-Fresenius given after full-match sibling stem cell transplantation in acute myeloblastic leukemia patients who underwent myeloablative fludarabine/busulfan conditioning. *Hematol Oncol Stem Cell Ther*. 2018.
26. Crocchiolo R, Esterni B, Castagna L, Furst S, El-Cheikh J, Devillier R, Granata A, Oudin C, Calmels B, Chabannon C, Bouabdallah R, Vey N, Blaise D. Two days of antithymocyte globulin are associated with a reduced incidence of acute and chronic graft-versus-host disease in reduced-intensity conditioning transplantation for hematologic diseases. *Cancer*. 2013;119(5):986-992.
27. Remberger M, Ringden O, Hagglund H, Svahn BM, Ljungman P, Uhlin M, Mattsson J. A high antithymocyte globulin dose increases the risk of relapse after reduced intensity conditioning HSCT with unrelated donors. *Clin Transplant*. 2013;27(4):E368-374.
28. Remberger M, Svahn BM, Mattsson J, Ringden O. Dose study of thymoglobulin during conditioning for unrelated donor allogeneic stem-cell transplantation. *Transplantation*. 2004;78(1):122-127.
29. Storb R, Gyurkocza B, Storer BE, Sorrow ML, Blume K, Niederwieser D, Chauncey TR, Pulsipher MA, Petersen FB, Sahebi F, Agura ED, Hari P, Bruno B, McSweeney PA, Maris MB, Maziarz RT, Langston AA, Bethge W, Vindelov L, Franke GN, Laport GG, Yeager AM, Hubel K, Deeg HJ, Georges GE, Flowers ME, Martin PJ, Mielcarek M, Woolfrey AE, Maloney DG, Sandmaier BM. Graft-versus-host disease and graft-versus-tumor effects after allogeneic hematopoietic cell transplantation. *J Clin Oncol*. 2013;31(12):1530-1538.
30. Horowitz MM, Gale RP, Sondel PM, Goldman JM, Kersey J, Kolb HJ, Rimm AA, Ringden O, Rozman C, Speck B, et al. Graft-versus-leukemia reactions after bone marrow transplantation. *Blood*. 1990;75(3):555-562.
31. Baron F, Labopin M, Niederwieser D, Vigouroux S, Cornelissen JJ, Malm C, Vindelov LL, Blaise D, Janssen JJ, Petersen E, Socie G, Nagler A, Rocha V, Mohty M. Impact of graft-versus-host disease after reduced-intensity conditioning allogeneic stem cell transplantation for acute myeloid leukemia: a report from the Acute Leukemia Working

-
- Party of the European group for blood and marrow transplantation. *Leukemia*. 2012;26(12):2462-2468.
32. Storek J, Mohty M, Boelens JJ. Rabbit anti-T cell globulin in allogeneic hematopoietic cell transplantation. *Biol Blood Marrow Transplant*. 2015;21(6):959-970.
 33. Soiffer RJ, Lerademacher J, Ho V, Kan F, Artz A, Champlin RE, Devine S, Isola L, Lazarus HM, Marks DI, Porter DL, Waller EK, Horowitz MM, Eapen M. Impact of immune modulation with anti-T-cell antibodies on the outcome of reduced-intensity allogeneic hematopoietic stem cell transplantation for hematologic malignancies. *Blood*. 2011;117(25):6963-6970.
 34. Ayuk F, Diyachenko G, Zabelina T, Panse J, Wolschke C, Eiermann T, Binder T, Fehse B, Erttmann R, Kabisch H, Bacher U, Kroger N, Zander AR. Anti-thymocyte globulin overcomes the negative impact of HLA mismatching in transplantation from unrelated donors. *Exp Hematol*. 2008;36(8):1047-1054.
 35. Na IK, Wittenbecher F, Dziubianau M, Herholz A, Mensen A, Kunkel D, Blau O, Blau I, Thiel E, Uharek L, Scheibenbogen C, Rieger K, Thiel A. Rabbit antithymocyte globulin (thymoglobulin) impairs the thymic output of both conventional and regulatory CD4+ T cells after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation in adult patients. *Haematologica*. 2013;98(1):23-30.
 36. Popow I, Leitner J, Majdic O, Kovarik JJ, Saemann MD, Zlabinger GJ, Steinberger P. Assessment of batch to batch variation in polyclonal antithymocyte globulin preparations. *Transplantation*. 2012;93(1):32-40.
 37. Huang W, Zhao X, Tian Y, Cao T, Li Y, Liu Z, Jing Y, Wang S, Gao C, Yu L. Outcomes of peripheral blood stem cell transplantation patients from HLA-mismatched unrelated donor with antithymocyte globulin (ATG)-Thymoglobulin versus ATG-Fresenius: a single-center study. *Med Oncol*. 2015;32(2):465.
 38. Basara N, Baurmann H, Kolbe K, Yaman A, Labopin M, Burchardt A, Huber C, Fauser AA, Schwerdtfeger R. Antithymocyte globulin for the prevention of graft-versus-host disease after unrelated hematopoietic stem cell transplantation for acute myeloid leukemia: results from the multicenter German cooperative study group. *Bone Marrow Transplant*. 2005;35(10):1011-1018.
 39. Polverelli N, Malagola M, Turra A, Skert C, Perucca S, Chiarini M, Cattina F, Rambaldi B, Cancelli V, Morello E, Schieppati F, Bernardi S, Zanaglio C, Sottini A, Giustini V, Imberti L, Montanelli A, Russo D. Comparative study on ATG-thymoglobulin versus ATG-fresenius for the graft-versus-host disease (GVHD) prophylaxis in allogeneic stem cell transplantation from matched unrelated donor: a single-centre experience over the contemporary years. *Leuk Lymphoma*. 2018:1-6.
 40. Paiano S, Roosnek E, Tirefort Y, Nagy-Hulliger M, Masouridi S, Levrat E, Bernimoulin M, Huguet S, Casini A, Matthes T, Samii K, Passweg JR, Chalandon Y. Comparing Two Types of Rabbit ATG prior to Reduced Intensity Conditioning Allogeneic Hematopoietic SCT for Hematologic Malignancies. *Bone Marrow Res*. 2015;2015:980924.
 41. Remberger M, Svahn BM, Hentschke P, Lofgren C, Ringden O. Effect on cytokine release and graft-versus-host disease of different anti-T cell antibodies during conditioning for unrelated haematopoietic stem cell transplantation. *Bone Marrow Transplant*. 1999;24(8):823-830.

42. Mensen A, Na IK, Hafer R, Meerbach A, Schlecht M, Pietschmann ML, Gruhn B. Comparison of different rabbit ATG preparation effects on early lymphocyte subset recovery after allogeneic HSCT and its association with EBV-mediated PTLD. *J Cancer Res Clin Oncol*. 2014;140(11):1971-1980.
43. Admiraal R, Lindemans CA, van Kesteren C, Bierings MB, Versluijs AB, Nierkens S, Boelens JJ. Excellent T-cell reconstitution and survival depend on low ATG exposure after pediatric cord blood transplantation. *Blood*. 2016;128(23):2734-2741.
44. Rodewald HR. Thymus organogenesis. *Annu Rev Immunol*. 2008;26:355-388.
45. Surh CD, Sprent J. T-cell apoptosis detected in situ during positive and negative selection in the thymus. *Nature*. 1994;372(6501):100-103.
46. Radtke F, Fasnacht N, Macdonald HR. Notch signaling in the immune system. *Immunity*. 2010;32(1):14-27.
47. van Ewijk W, Hollander G, Terhorst C, Wang B. Stepwise development of thymic microenvironments in vivo is regulated by thymocyte subsets. *Development*. 2000;127(8):1583-1591.
48. Markert ML, Boeck A, Hale LP, Kloster AL, McLaughlin TM, Batchvarova MN, Douek DC, Koup RA, Kostyu DD, Ward FE, Rice HE, Mahaffey SM, Schiff SE, Buckley RH, Haynes BF. Transplantation of thymus tissue in complete DiGeorge syndrome. *N Engl J Med*. 1999;341(16):1180-1189.
49. Brearley S, Gentle TA, Baynham MI, Roberts KD, Abrams LD, Thompson RA. Immunodeficiency following neonatal thymectomy in man. *Clin Exp Immunol*. 1987;70(2):322-327.
50. Sauce D, Larsen M, Fastenackels S, Duperrier A, Keller M, Grubeck-Loebenstein B, Ferrand C, Debre P, Sidi D, Appay V. Evidence of premature immune aging in patients thymectomized during early childhood. *J Clin Invest*. 2009;119(10):3070-3078.
51. Prelog M, Keller M, Geiger R, Brandstatter A, Wurzner R, Schweigmann U, Zlamy M, Zimmerhackl LB, Grubeck-Loebenstein B. Thymectomy in early childhood: significant alterations of the CD4(+)CD45RA(+)CD62L(+) T cell compartment in later life. *Clin Immunol*. 2009;130(2):123-132.
52. 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-lymphocyte regeneration after intensive chemotherapy. *N Engl J Med*. 1995;332(3):143-149.
53. Krenger W, Blazar BR, Hollander GA. Thymic T-cell development in allogeneic stem cell transplantation. *Blood*. 2011;117(25):6768-6776.
54. Roux E, Dumont-Girard F, Starobinski M, Siegrist CA, Helg C, Chapuis B, Roosnek E. Recovery of immune reactivity after T-cell-depleted bone marrow transplantation depends on thymic activity. *Blood*. 2000;96(6):2299-2303.
55. Storek J, Zhao Z, Lin E, Berger T, McSweeney PA, Nash RA, Akatsuka Y, Metcalf MD, Lu H, Kalina T, Reindl M, Storb R, Hansen JA, Sullivan KM, Kraft GH, Furst DE, Maloney DG. Recovery from and consequences of severe iatrogenic lymphopenia (induced to treat autoimmune diseases). *Clin Immunol*. 2004;113(3):285-298.
56. Seggewiss R, Einsele H. Immune reconstitution after allogeneic transplantation and expanding options for immunomodulation: an update. *Blood*. 2010;115(19):3861-3868.

57. Toubert A, Glauzy S, Douay C, Clave E. Thymus and immune reconstitution after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation in humans: never say never again. *Tissue Antigens*. 2012;79(2):83-89.
58. Douek DC, Vescio RA, Betts MR, Brenchley JM, Hill BJ, Zhang L, Berenson JR, Collins RH, Koup RA. Assessment of thymic output in adults after haematopoietic stem-cell transplantation and prediction of T-cell reconstitution. *Lancet*. 2000;355(9218):1875-1881.
59. Heitger A, Neu N, Kern H, Panzer-Grumayer ER, Greinix H, Nachbaur D, Niederwieser D, Fink FM. Essential role of the thymus to reconstitute naive (CD45RA+) T-helper cells after human allogeneic bone marrow transplantation. *Blood*. 1997;90(2):850-857.
60. Dumont-Girard F, Roux E, van Lier RA, Hale G, Helg C, Chapuis B, Starobinski M, Roosnek E. Reconstitution of the T-cell compartment after bone marrow transplantation: restoration of the repertoire by thymic emigrants. *Blood*. 1998;92(11):4464-4471.
61. Weinberg K, Annett G, Kashyap A, Lenarsky C, Forman SJ, Parkman R. The effect of thymic function on immunocompetence following bone marrow transplantation. *Biol Blood Marrow Transplant*. 1995;1(1):18-23.
62. Masson D, Nabholz M, Estrade C, Tschopp J. Granules of cytolytic T-lymphocytes contain two serine esterases. *EMBO J*. 1986;5(7):1595-1600.
63. Gray D, Abramson J, Benoist C, Mathis D. Proliferative arrest and rapid turnover of thymic epithelial cells expressing Aire. *J Exp Med*. 2007;204(11):2521-2528.
64. Hauri-Hohl MM, Keller MP, Gill J, Hafen K, Pachlatko E, Boulay T, Peter A, Hollander GA, Krenger W. Donor T-cell alloreactivity against host thymic epithelium limits T-cell development after bone marrow transplantation. *Blood*. 2007;109(9):4080-4088.
65. Guillemot JC, Naspetti M, Malergue F, Montcourrier P, Galland F, Naquet P. Ep-CAM transfection in thymic epithelial cell lines triggers the formation of dynamic actin-rich protrusions involved in the organization of epithelial cell layers. *Histochem Cell Biol*. 2001;116(4):371-378.
66. Berrih S, Arenzana-Seisdedos F, Cohen S, Devos R, Charron D, Virelizier JL. Interferon-gamma modulates HLA class II antigen expression on cultured human thymic epithelial cells. *J Immunol*. 1985;135(2):1165-1171.
67. Ropke C, Van Soest P, Platenburg PP, Van Ewijk W. A common stem cell for murine cortical and medullary thymic epithelial cells? *Dev Immunol*. 1995;4(2):149-156.
68. Skogberg G, Lundberg V, Berglund M, Gudmundsdottir J, Telemo E, Lindgren S, Ekwall O. Human thymic epithelial primary cells produce exosomes carrying tissue-restricted antigens. *Immunol Cell Biol*. 2015;93(8):727-734.
69. Schreiber L, Eshel I, Meilin A, Sharabi Y, Shoham J. Analysis of thymic stromal cell subpopulations grown in vitro on extracellular matrix in defined medium. III. Growth conditions of human thymic epithelial cells and immunomodulatory activities in their culture supernatant. *Immunology*. 1991;74(4):621-629.
70. Sato G, Zaroff L, Mills SE. Tissue Culture Populations and Their Relation to the Tissue of Origin. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1960;46(7):963-972.
71. Herrmann H, Bar H, Kreplak L, Strelkov SV, Aebi U. Intermediate filaments: from cell architecture to nanomechanics. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2007;8(7):562-573.

72. Litvinov SV, Velders MP, Bakker HA, Fleuren GJ, Warnaar SO. Ep-CAM: a human epithelial antigen is a homophilic cell-cell adhesion molecule. *J Cell Biol.* 1994;125(2):437-446.
73. Rebellato LM, Gross U, Verbanac KM, Thomas JM. A comprehensive definition of the major antibody specificities in polyclonal rabbit antithymocyte globulin. *Transplantation.* 1994;57(5):685-694.
74. Bonnefoy-Berard N, Vincent C, Revillard JP. Antibodies against functional leukocyte surface molecules in polyclonal antilymphocyte and antithymocyte globulins. *Transplantation.* 1991;51(3):669-673.
75. Raefsky EL, Gascon P, Gratwohl A, Speck B, Young NS. Biological and immunological characterization of ATG and ALG. *Blood.* 1986;68(3):712-719.
76. Zand MS, Vo T, Pellegrin T, Felgar R, Liesveld JL, Ifthikharuddin JJ, Abboud CN, Sanz I, Huggins J. Apoptosis and complement-mediated lysis of myeloma cells by polyclonal rabbit antithymocyte globulin. *Blood.* 2006;107(7):2895-2903.
77. Genestier L, Fournel S, Flacher M, Assossou O, Revillard JP, Bonnefoy-Berard N. Induction of Fas (Apo-1, CD95)-mediated apoptosis of activated lymphocytes by polyclonal antithymocyte globulins. *Blood.* 1998;91(7):2360-2368.
78. Dubey S, Nityanand S. Involvement of Fas and TNF pathways in the induction of apoptosis of T cells by antithymocyte globulin. *Ann Hematol.* 2003;82(8):496-499.
79. Liu H, Qin Y, Wang X, Xie K, Yang Y, Zhu J, Zhao C, Wang C. Polyclonal rabbit antithymocyte globulin induces apoptosis and has cytotoxic effects on human leukemic cells. *Clin Lymphoma Myeloma Leuk.* 2012;12(5):345-354.
80. Dabas R, Lee R, Servito MT, Dharmani-Khan P, Modi M, van Slyke T, Luider J, Durand C, Larratt L, Brandwein J, Morris D, Daly A, Khan FM, Storek J. Antithymocyte Globulin at Clinically Relevant Concentrations Kills Leukemic Blasts. *Biol Blood Marrow Transplant.* 2016;22(5):815-824.
81. Ayuk FA, Atassi N, Schuch G, Mina S, Fang L, Bokemeyer C, Fehse B, Zander AR, Kroger N. Complement-dependent and complement-independent cytotoxicity of polyclonal antithymocyte globulins in chronic lymphocytic leukemia. *Leuk Res.* 2008;32(8):1200-1206.
82. Bourdage JS, Hamlin DM. Comparative polyclonal antithymocyte globulin and antilymphocyte/antilymphoblast globulin anti-CD antigen analysis by flow cytometry. *Transplantation.* 1995;59(8):1194-1200.
83. Ziegler C, Finke J, Grulich C. Features of cell death, mitochondrial activation and caspase dependence of rabbit anti-T-lymphocyte globulin signaling in lymphoblastic Jurkat cells are distinct from classical apoptosis signaling of CD95. *Leuk Lymphoma.* 2016;57(1):177-182.
84. Schieferdecker A, Shoshani O, Westner B, Zipori D, Fehse B, Kroger N, Ayuk F. Potent in vitro and in vivo effects of polyclonal anti-human-myeloma globulins. *Oncotarget.* 2016;7(41):67061-67070.
85. Ayuk FA, Fang L, Fehse B, Zander AR, Kroger N. Antithymocyte globulin induces complement-dependent cell lysis and caspase-dependent apoptosis in myeloma cells. *Exp Hematol.* 2005;33(12):1531-1536.

-
86. Locksley RM, Killeen N, Lenardo MJ. The TNF and TNF receptor superfamilies: integrating mammalian biology. *Cell*. 2001;104(4):487-501.
 87. Du C, Fang M, Li Y, Li L, Wang X. Smac, a mitochondrial protein that promotes cytochrome c-dependent caspase activation by eliminating IAP inhibition. *Cell*. 2000;102(1):33-42.
 88. Saelens X, Festjens N, Vande Walle L, van Gurp M, van Loo G, Vandenabeele P. Toxic proteins released from mitochondria in cell death. *Oncogene*. 2004;23(16):2861-2874.
 89. Bratton DL, Fadok VA, Richter DA, Kailey JM, Guthrie LA, Henson PM. Appearance of phosphatidylserine on apoptotic cells requires calcium-mediated nonspecific flip-flop and is enhanced by loss of the aminophospholipid translocase. *J Biol Chem*. 1997;272(42):26159-26165.
 90. Ferraro-Peyret C, Quemeneur L, Flacher M, Revillard JP, Genestier L. Caspase-independent phosphatidylserine exposure during apoptosis of primary T lymphocytes. *J Immunol*. 2002;169(9):4805-4810.
 91. Preville X, Nicolas L, Flacher M, Revillard J. A quantitative flow cytometry assay for the preclinical testing and pharmacological monitoring of rabbit antilymphocyte globulins (rATG). *J Immunol Methods*. 2000;245(1-2):45-54.
 92. Call SK, Kasow KA, Barfield R, Madden R, Leung W, Horwitz E, Woodard P, Panetta JC, Baker S, Handgretinger R, Rodman J, Hale GA. Total and active rabbit antithymocyte globulin (rATG;Thymoglobulin) pharmacokinetics in pediatric patients undergoing unrelated donor bone marrow transplantation. *Biol Blood Marrow Transplant*. 2009;15(2):274-278.
 93. Regan JF, Lyonais C, Campbell K, Smith LV, Buelow R, Group USTM-CS. Total and active thymoglobulin levels: effects of dose and sensitization on serum concentrations. *Transpl Immunol*. 2001;9(1):29-36.
 94. Kakhniashvili I, Filicko J, Kraft WK, Flomenberg N. Heterogeneous clearance of antithymocyte globulin after CD34+-selected allogeneic hematopoietic progenitor cell transplantation. *Biol Blood Marrow Transplant*. 2005;11(8):609-618.
 95. Podgorny PJ, Ugarte-Torres A, Liu Y, Williamson TS, Russell JA, Storek J. High rabbit-antihuman thymocyte globulin levels are associated with low likelihood of graft-vs-host disease and high likelihood of posttransplant lymphoproliferative disorder. *Biol Blood Marrow Transplant*. 2010;16(7):915-926.
 96. Chawla S, Dharmani-Khan P, Liu Y, Prokopishyn N, Amlish Munir M, Griffiths C, Khan FM, Stewart DA, Russell JA, Daly A, Storek J. High serum level of antithymocyte globulin immediately before graft infusion is associated with a low likelihood of chronic, but not acute, graft-versus-host disease. *Biol Blood Marrow Transplant*. 2014;20(8):1156-1162.
 97. Eiermann TH, Lambrecht P, Zander AR. Monitoring anti-thymocyte globulin (ATG) in bone marrow recipients. *Bone Marrow Transplant*. 1999;23(8):779-781.
 98. Neovii Biotech GmbH. Fachinformation: Grafalon 20 mg/ml Konzentrat zur Herstellung einer Infusionslösung, 10ml. 2017; https://www.gelbe-liste.de/produkte/Grafalon-20-mg-ml-Konzentrat-zur-Herstellung-einer-Infusionsloesung-10ml_914119/fachinformation. Accessed May 3, 2018.
 99. Locatelli F, Bernardo ME, Bertaina A, Rognoni C, Comoli P, Rovelli A, Pession A, Fagioli F, Favre C, Lanino E, Giorgiani G, Merli P, Pagliara D, Prete A, Zecca M.

- Efficacy of two different doses of rabbit anti-T-lymphocyte globulin to prevent graft-versus-host disease in children with haematological malignancies transplanted from an unrelated donor: a multicentre, randomised, open-label, phase 3 trial. *Lancet Oncol.* 2017;18(8):1126-1136.
100. Shiratori S, Kosugi-Kanaya M, Hayase E, Okada K, Goto H, Sugita J, Onozawa M, Nakagawa M, Kahata K, Hashimoto D, Endo T, Kondo T, Teshima T. T-cell depletion effects of low-dose antithymocyte globulin for GVHD prophylaxis in HLA-matched allogeneic peripheral blood stem cell transplantation. *Transpl Immunol.* 2018;46:21-22.
 101. Bryant A, Mallick R, Huebsch L, Allan D, Atkins H, Anstee G, Sabloff M, Scrivens N, Maze D, Bredeson C, Kekre N. Low-Dose Antithymocyte Globulin for Graft-versus-Host-Disease Prophylaxis in Matched Unrelated Allogeneic Hematopoietic Stem Cell Transplantation. *Biol Blood Marrow Transplant.* 2017;23(12):2096-2101.
 102. Sakellari I, Batsis I, Bousiou Z, Mallouri D, Constantinou V, Gavriilaki E, Smias C, Yannaki E, Kaloyannidis P, Papaioannou G, Stavroyianni N, Syrigou A, Sotiropoulos D, Fylaktou A, Tsompanakou A, Saloum R, Anagnostopoulos A. The Role of Low-dose Anti-thymocyte Globulin as Standard Prophylaxis in Mismatched and Matched Unrelated Hematopoietic Peripheral Stem Cell Transplantation for Hematologic Malignancies. *Clin Lymphoma Myeloma Leuk.* 2017;17(10):658-666.
 103. Kennedy VE, Chen H, Savani BN, Greer J, Kassim AA, Engelhardt BG, Goodman S, Sengsayadeth S, Chinratanalab W, Jagasia M. Optimizing Antithymocyte Globulin Dosing for Unrelated Donor Allogeneic Hematopoietic Cell Transplantation Based on Recipient Absolute Lymphocyte Count. *Biol Blood Marrow Transplant.* 2017.
 104. Soiffer RJ, Kim HT, McGuirk J, Horwitz ME, Johnston L, Patnaik MM, Rybka W, Artz A, Porter DL, Shea TC, Boyer MW, Maziarz RT, Shaughnessy PJ, Gergis U, Safah H, Reshef R, DiPersio JF, Stiff PJ, Vusirikala M, Szer J, Holter J, Levine JD, Martin PJ, Pidala JA, Lewis ID, Ho VT, Alyea EP, Ritz J, Glavin F, Westervelt P, Jagasia MH, Chen YB. Prospective, Randomized, Double-Blind, Phase III Clinical Trial of Anti-T-Lymphocyte Globulin to Assess Impact on Chronic Graft-Versus-Host Disease-Free Survival in Patients Undergoing HLA-Matched Unrelated Myeloablative Hematopoietic Cell Transplantation. *J Clin Oncol.* 2017;35(36):4003-4011.
 105. Admiraal R, Nierkens S, de Witte MA, Petersen EJ, Fleurke GJ, Verrest L, Belitser SV, Bredius RGM, Raymakers RAP, Knibbe CAJ, Minnema MC, van Kesteren C, Kuball J, Boelens JJ. Association between anti-thymocyte globulin exposure and survival outcomes in adult unrelated haemopoietic cell transplantation: a multicentre, retrospective, pharmacodynamic cohort analysis. *Lancet Haematol.* 2017;4(4):e183-e191.
 106. Kennedy VE, Chen H, Savani BN, Greer J, Kassim AA, Engelhardt BG, Goodman S, Sengsayadeth S, Chinratanalab W, Jagasia M. Optimizing Antithymocyte Globulin Dosing for Unrelated Donor Allogeneic Hematopoietic Cell Transplantation Based on Recipient Absolute Lymphocyte Count. *Biol Blood Marrow Transplant.* 2018;24(1):150-155.
 107. Marelli-Berg FM, Clement M, Mauro C, Caligiuri G. An immunologist's guide to CD31 function in T-cells. *J Cell Sci.* 2013;126(Pt 11):2343-2352.
 108. Haeryfar SM, Hoskin DW. Thy-1: more than a mouse pan-T cell marker. *J Immunol.* 2004;173(6):3581-3588.

-
109. Rege TA, Hagood JS. Thy-1 as a regulator of cell-cell and cell-matrix interactions in axon regeneration, apoptosis, adhesion, migration, cancer, and fibrosis. *FASEB J*. 2006;20(8):1045-1054.
 110. Craig W, Kay R, Cutler RL, Lansdorp PM. Expression of Thy-1 on human hematopoietic progenitor cells. *J Exp Med*. 1993;177(5):1331-1342.
 111. Holling TM, van der Stoep N, Quinten E, van den Elsen PJ. Activated human T cells accomplish MHC class II expression through T cell-specific occupation of class II transactivator promoter III. *J Immunol*. 2002;168(2):763-770.
 112. Storek J, Geddes M, Khan F, Huard B, Helg C, Chalandon Y, Passweg J, Roosnek E. Reconstitution of the immune system after hematopoietic stem cell transplantation in humans. *Semin Immunopathol*. 2008;30(4):425-437.
 113. Na IK, Lu SX, Yim NL, Goldberg GL, Tsai J, Rao U, Smith OM, King CG, Suh D, Hirschhorn-Cymerman D, Palomba L, Penack O, Holland AM, Jenq RR, Ghosh A, Tran H, Merghoub T, Liu C, Sempowski GD, Ventevogel M, Beauchemin N, van den Brink MR. The cytolytic molecules Fas ligand and TRAIL are required for murine thymic graft-versus-host disease. *J Clin Invest*. 2010;120(1):343-356.
 114. Chaudhry MS, Velardi E, Malard F, van den Brink MR. Immune Reconstitution after Allogeneic Hematopoietic Stem Cell Transplantation: Time To T Up the Thymus. *J Immunol*. 2017;198(1):40-46.
 115. Rossi S, Blazar BR, Farrell CL, Danilenko DM, Lacey DL, Weinberg KI, Krenger W, Hollander GA. Keratinocyte growth factor preserves normal thymopoiesis and thymic microenvironment during experimental graft-versus-host disease. *Blood*. 2002;100(2):682-691.
 116. Min D, Taylor PA, Panoskaltis-Mortari A, Chung B, Danilenko DM, Farrell C, Lacey DL, Blazar BR, Weinberg KI. Protection from thymic epithelial cell injury by keratinocyte growth factor: a new approach to improve thymic and peripheral T-cell reconstitution after bone marrow transplantation. *Blood*. 2002;99(12):4592-4600.
 117. Wils EJ, Aerts-Kaya FS, Rombouts EJ, van Mourik I, Rijken-Schelen A, Visser TP, Braakman E, Wagemaker G, Cornelissen JJ. Keratinocyte growth factor and stem cell factor to improve thymopoiesis after autologous CD34+ cell transplantation in rhesus macaques. *Biol Blood Marrow Transplant*. 2012;18(1):55-65.
 118. van Lent AU, Dontje W, Nagasawa M, Siamari R, Bakker AQ, Pouw SM, Maijor KA, Weijer K, Cornelissen JJ, Blom B, Di Santo JP, Spits H, Legrand N. IL-7 enhances thymic human T cell development in "human immune system" Rag2^{-/-}IL-2R^{gammac}^{-/-} mice without affecting peripheral T cell homeostasis. *J Immunol*. 2009;183(12):7645-7655.
 119. Alpdogan O, van den Brink MR. IL-7 and IL-15: therapeutic cytokines for immunodeficiency. *Trends Immunol*. 2005;26(1):56-64.

Eidesstattliche Erklärung

„Ich, Eva Marianne Käbisch, versichere an Eides statt durch meine eigenhändige Unterschrift, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema „*Zytotoxische Effekte von zwei Antithymozytenglobulin Präparaten auf primäre humane Thymusstromazellen*“ selbstständig und ohne nicht offengelegte Hilfe Dritter verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel genutzt habe.

Alle Stellen, die wörtlich oder dem Sinne nach auf Publikationen oder Vorträgen anderer Autoren beruhen, sind als solche in korrekter Zitierung (siehe „Uniform Requirements for Manuscripts (URM)“ des ICMJE -www.icmje.org) kenntlich gemacht. Die Abschnitte zu Methodik (insbesondere praktische Arbeiten, Laborbestimmungen, statistische Aufarbeitung) und Resultaten (insbesondere Abbildungen, Graphiken und Tabellen) entsprechen den URM (s.o.) und werden von mir verantwortet.

Meine Anteile an etwaigen Publikationen zu dieser Dissertation entsprechen denen, die in der untenstehenden gemeinsamen Erklärung mit der Betreuerin, angegeben sind. Sämtliche Publikationen, die aus dieser Dissertation hervorgegangen sind und bei denen ich Autor bin, entsprechen den URM (s.o.) und werden von mir verantwortet.

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

Datum

Unterschrift

Lebenslauf

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

Publikationsliste

Kaebisch, EM, M.Y. Cho, Y.S. Oh, L.I. Olfe, M. Szyska, S.C. Becker, P. Reinke, H.D. Volk, B. Gillissen, L. Bullinger, A. Thiel, I.K. Na. *Cytotoxic Effects of Rabbit Anti-Thymocyte Globulin preparations on Primary Human Thymic Epithelial Cells*. Transplantation 2019.

Kaebisch, E, S.C. Becker, M. Skyszka, A. Mensen, C. Scheibenbogen, B. Dörken, A. Thiel, M. Y. Cho, I.K. Na. *ATG effects on human thymic epithelial cells*. Poster präsentiert auf dem *4th International Congress on Stem Cell Transplantation and Cellular Therapies (COSTEM)*, 26.-29. Oktober 2017, Berlin, Deutschland.

Kaebisch, E., T.L. Fuss, L.A. Vandergrift, K. Toews, P. Habbel, L.L. Cheng. *Applications of high-resolution magic angle spinning MRS in biomedical studies I-cell line and animal models*. NMR Biomed, 2017. **30**(6).

Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Frau Univ.-Prof. Dr. med. Il-Kang Na für die Überlassung des Themas, die stets kollegiale und freundschaftliche Betreuung sowie für die zahlreichen anregenden Diskussionen.

Bei Frau Mi-Young Cho und dem gesamten Team der Klinik für Chirurgie angeborener Herzfehler und Kinderherzchirurgie des Deutschen Herzzentrums Berlin möchte ich mich ganz herzlich für das Engagement bei der Bereitstellung des Thymusgewebes bedanken.

Ebenso möchte ich ausdrücklich den Eltern der am DHZB operierten Kinder danken, ohne deren Bereitschaft zur Spende des Thymusgewebes die Arbeit in dieser Form nicht möglich gewesen wäre.

Frau Prof. Dr. med. Carmen Scheibenbogen danke ich für die Überlassung des Arbeitsplatzes. Für ihre große Hilfsbereitschaft möchte ich Frau Sandra Bauer danken.