

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

DISSERTATION

**Wirkmechanismen therapeutischer Antikörper auf
Natürliche Killerzellen in der soliden Organtransplantation**

zur Erlangung des akademischen Grades
Doctor rerum medicarum (Dr. rer. medic.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von Diana Stauch

aus Würzburg

Gutachter/in: 1. Prof. Dr. med. Hans-Dieter Volk
 2. Prof. Dr. rer. biol. hum. Roland Jacobs
 3. Prof. Dr. med. Klemens Budde

Datum der Promotion: 29.01.2010

Vorwort

Diese Dissertation fasst meine Untersuchungen zum Thema „Wirkmechanismen therapeutischer Antikörper auf Natürliche Killerzellen in der soliden Organtransplantation“ kumulativ zusammen. Ergebnisse meiner Dissertation wurden in folgenden Publikationen veröffentlicht.

1. Publikation

Stauch D, Dernier A, Kunert K, Volk HD, Sarmiento E, Pratschke J and Kotsch K. Targeting of Natural Killer cells by rabbit antithymocyte globulin and Campath-1H: similar effects independent of specificity. PLoS ONE 2009;4(3):e4709.

2. Publikation

Wieczorek G, Asemissen A, Model F, Turbachova I, Floess S, Liebenberg V, Baron U, **Stauch D**, Kotsch K, Pratschke J, Hamann A, Loddenkemper C, Stein H, Volk HD, Hoffmüller U, Grützkau A, Mustea A, Huehn J, Scheibenbogen C, Olek S. Quantitative DNA methylation analysis of FOXP3 as a new method for counting regulatory T cells in peripheral blood and solid tissue. Cancer Res 2009;69(2):599-608.

3. Publikation

Collazo MM, Wood D, Paraiso KH, Lund E, Engelman RW, Le CT, **Stauch D**, Kotsch K, Kerr WG. SHIP limits immunoregulatory capacity in the T cell compartment. Blood 2009;113(13):2934-2944.

Inhaltsverzeichnis

Vorwort	III
Inhaltsverzeichnis	IV
1 Abstract	1
2 Einleitung	2
3 Ziel	2
4 Material und Methoden	3
4.1 Patienten und gesunde Spender	3
4.2 Anreicherung verschiedener Lymphozytensubpopulationen	4
4.3 Antikörper und Reagenzien	4
4.4 Funktionelle Charakterisierung der NK-Zellen	4
4.5 Quantitative real-time RT-PCR	4
4.6 (De-)Methylierungsanalyse von natürlichen regulatorischen T-Zellen	5
4.7 Statistik	5
5 Ergebnisse	5
5.1 Einfluss von ATG und Alemtuzumab auf NK-Zellen – Publikation (1)	5
5.1.1 <i>In vivo</i> Depletion von NK-Zellen nach ATG-Therapie	5
5.1.2 ATG und Alemtuzumab binden an CD16 auf NK-Zellen	6
5.1.3 Beeinflussung der Effektorfunktionen von NK-Zellen	6
5.1.4 Induktion der Apoptose in NK-Zellen	7
5.1.5 Induktion von FasL, TNF α und IFN γ	7
5.1.6 Der Fc-Teil ist ausreichend für eine Induktion der Zytokinproduktion, der Apoptose und der Degranulation	7
5.2 <i>In vivo</i> Depletion regulatorischer T-Zellen – Publikation (2)	8
5.3 Fc γ RIII α und Fc γ RIIb (CD32b) auf T-Lymphozyten – Publikation (3)	8
6 Diskussion	9
6.1 Einfluss von ATG und Alemtuzumab auf NK-Zellen – Publikation (1)	9
6.2 <i>In vivo</i> Depletion regulatorischer T-Zellen – Publikation (2)	11
6.3 Fc γ RIII α und Fc γ RIIb (CD32b) auf T-Lymphozyten – Publikation (3)	12
7 Literatur	13
8 Anteilserklärung	16
9 Ausgewählte Publikationen	17
10 Lebenslauf & vollständige Publikationsliste	53
11 Selbständigkeitserklärung	57
12 Danksagung	58

1 Abstract

In der soliden Organtransplantation sind T-Zell-depletierende Strategien ein wesentlicher Bestandteil der immunsuppressiven Therapie. Obwohl bekannt ist, dass die depletierenden therapeutischen Antikörper wie das polyklonale anti-Thymozytenglobulin aus dem Kaninchen (ATG) oder der monoklonale anti-CD52 Antikörper Alemtuzumab eine Lymphopenie induzieren, ist der Einfluss auf Natürliche Killerzellen (NK-Zellen) im Detail weitgehend unerforscht. In dieser Arbeit konnte an Patienten mit einer kombinierten Niere-Pankreas-Transplantation gezeigt werden, dass eine ATG-Induktionstherapie neben der T-Zell-Depletion auch zu einem rapiden Abfall der NK-Zellen führt. Daher wurde im Rahmen von weiterführenden *in vitro* Experimenten der Wirkmechanismus von ATG und Alemtuzumab auf NK-Zellen genauer analysiert. Die Behandlung von NK-Zellen mit ATG oder Alemtuzumab führte zu einer Reduktion ihrer Effektorfunktionen und zur Induktion von Apoptose. Von besonderer klinischer Bedeutung ist die Tatsache, dass NK-Zellen 10- bis 100-fach sensitiver auf die therapeutischen Antikörper reagieren als T- und B-Zellen. Durch die Generierung von Fc-Fragmenten von ATG und Alemtuzumab konnte demonstriert werden, dass die Ligation des Fc-Fragmentes mit dem Rezeptor FcγRIIIα (CD16), der insbesondere auf CD56^{dim} NK-Zellen exprimiert wird, als einziges Signal ausreichend ist für die Induktion der Apoptose, der Degranulation und der massiven Sekretion inflammatorischer Zytokine. Die generierten Daten implementieren folglich, dass NK-Zellen wichtige Mediatoren des klinisch beobachteten Cytokine-Release-Syndroms sind. Da sie darüber hinaus durch ihre antivirale und tumorsuppressive Wirkung eine fundamentale Rolle bei der Bekämpfung von Komplikationen einer Langzeit-Immunsuppression spielen, sollte bei der Entwicklung neuer therapeutischer Antikörper und der Definition einer optimalen Behandlungsdosis zukünftig ein Fokus auf NK-Zellen gelegt werden. Weiterführend wurde der Einfluss von ATG auf eine weitere Lymphozytenpopulation, die im Zusammenhang mit einem verminderten Risiko einer Rejektion diskutiert wird, analysiert. So konnte an Patienten nach einer ATG-Induktionstherapie durch eine spezifische und quantitative Analyse des Methylierungsstatus des Transkriptionsfaktors FOXP3 eine Depletion der regulatorischen T-Zellen nachgewiesen werden. Erstmals konnte an murinen regulatorischen T-Zellen in einem SHIP-defizienten Mausmodell gezeigt werden, dass diese Zellen Fcγ-Rezeptoren exprimieren und somit eine direkte Reaktion von T-Zellen auf Antikörper oder opsonierte Zellen möglich ist.

2 Einleitung

Antikörper gegen T-Zellepitope werden zur Behandlung von Komplikationen wie Graft versus Host Disease (GvHD) oder Steroid-resistenter Organabstoßung bei der hämatopoetischen Stammzell- und der soliden Organtransplantation eingesetzt. Das polyklonale anti-Thymozytenglobulin aus dem Kaninchen (ATG) enthält Antikörper, die gegen eine Vielzahl von Antigenen gerichtet sind, welche in die Immunantwort involviert sind (1). Der Hauptwirkmechanismus von ATG ist die T-Zell-Depletion, die durch eine Komplement-abhängige Lyse und durch Induktion von Apoptose ausgelöst wird (2). Jüngste Untersuchungen belegen, dass neben der T-Zell-Depletion auch eine Beeinflussung von Dendritischen Zellen (3) sowie eine Induktion von regulatorischen T-Zellen *in vitro* nach ATG Gabe zu beobachten ist (4). Im Gegensatz zu ATG ist Alemtuzumab ein vollständig humanisierter monoklonaler anti-CD52 Antikörper, der hauptsächlich T-, B- und Dendritische Zellen depletiert (5). Obwohl ATG und Alemtuzumab regelmäßig in der Klinik eingesetzt werden und umfangreiche Arbeiten über die Effekte auf T-Zellen existieren, stehen nur sehr limitierte Informationen über die Einflüsse auf NK-Zellen zur Verfügung. Die antivirale Wirkung der NK-Zellen ist in der Transplantationsmedizin von grundlegender Bedeutung, da Infektionen z.B. mit dem Epstein-Barr Virus (EBV) oder dem Cytomegalie Virus (CMV) eine häufige Komplikation bei langzeitiger Immunsuppression darstellen (6). Sowohl Alemtuzumab als auch ATG werden mit dem Auftreten einer EBV- oder CMV-Reaktivierung bzw. Erkrankung assoziiert (7,8). Des Weiteren fanden sich bei Patienten, welche mit ATG oder Alemtuzumab behandelt wurden, erhöhte Mengen an $\text{TNF}\alpha$, $\text{IFN}\gamma$ oder IL-6 im Serum (9,10). Diese klinische Komplikation wird als so genanntes „Cytokine-Release-Syndrom“ bezeichnet. Insbesondere für Alemtuzumab konnte gezeigt werden, dass die Zytokinfreisetzung eine Folge einer IgG1-abhängigen Bindung an den aktivierenden Rezeptor $\text{Fc}\gamma\text{RIII}\alpha$ auf Lymphozyten ist (11).

3 Ziel

Ziel dieser Arbeit ist es, den Einfluss von therapeutischen Antikörpern unter besonderer Berücksichtigung von ATG und Alemtuzumab auf NK-Zellen in der soliden Organtransplantation zu untersuchen. Mit Hilfe von *in vivo* und *in vitro* Untersuchungen sollen verschiedene wesentliche Aspekte betrachtet werden.

1. Anhand von *in vivo* Analysen bei Patienten, die nach einer soliden Organtransplantation ATG als Induktionstherapie erhielten, soll der Einfluss des therapeutischen Antikörpers auf

verschiedene Lymphozytenpopulationen untersucht werden. Dabei liegt der Fokus des Interesses auf NK-Zellen und regulatorischen T-Zellen.

2. Im nächsten Schritt wird *in vitro* die Wirkung von ATG und Alemtuzumab auf die Funktionalität und Vitalität der NK-Zellen getestet.
3. Weiterführend soll der Wirkmechanismus und somit die Interaktion von ATG und Alemtuzumab mit den in Frage kommenden Rezeptoren auf NK-Zellen, insbesondere den Fc γ -Rezeptoren, untersucht werden.
4. Abschließend soll die Frage geklärt werden, ob Fc γ -Rezeptoren, die für die NK-Zellen eine substantielle Bedeutung besitzen, auch auf T-Zellen exprimiert werden und somit eine Interaktion der T-Zellen mit Antikörpern vermitteln können.

4 Material und Methoden

4.1 Patienten und gesunde Spender

Zwischen Oktober 2007 und Mai 2008 wurden insgesamt 17 Patienten mit einer soliden Organtransplantation aus der Klinik für Allgemein-, Visceral- und Transplantationschirurgie, Charité - Universitätsmedizin Berlin, in die prospektive beobachtende Studie eingeschlossen. Diese Patienten erhielten ein nicht-HLA-identisches Allotransplantat aus einer Hirntodspende. Bei acht Patienten wurde eine kombinierte Niere- und Pankreastransplantation durchgeführt. Diese Patienten erhielten eine perioperative immunsuppressive Induktionstherapie mit ATG (Thymoglobulin[®], Genzyme GmbH, Neu Isenburg, Deutschland) in einer Dosierung von 1,5mg/kg Körpergewicht i.v.. Zusätzlich erfolgte die Applikation in der gleichen Dosierung an den vier darauf folgenden Tagen. Die Vergleichsgruppe wurde von neun Patienten mit einer allogenen Nierentransplantation gebildet, die zweimalig Basiliximab (Simulect[®], Novartis Pharma AG, Basel, Schweiz) als Induktionstherapie erhielten. Es wurden 20 mg Basiliximab i.v. zwei Stunden vor der Reperfusion der Niere und die gleiche Dosis am Tag vier nach der Operation appliziert. Die Erhaltungsimmunsuppression bestand in beiden Gruppen aus der Gabe von Tacrolimus, Mycophenolatmofetil und Prednison. Für die *in vitro* Versuche wurden humane Leukozyten entweder aus frisch entnommenem Vollblut von freiwilligen Spendern oder aus Buffy-Coats, die über den DRK Blutspendedienst Wannsee (Berlin, Deutschland) bezogen wurden, isoliert. Die Experimente mit humanen Materialproben waren zuvor durch das lokale Ethikkomitee der Medizinischen Fakultät der Charité – Universitätsmedizin Berlin genehmigt worden und die Patienten hatten ihr Einverständnis zur Teilnahme an der Studie abgegeben.

4.2 Anreicherung verschiedener Lymphozytensubpopulationen

Aus dem Blut von gesunden Spendern und transplantierten Patienten wurden mononukleäre Zellen des peripheren Blutes (PBMCs) durch Ficoll-Dichte-Zentrifugation (Bicoll, Biochrom AG, Berlin, Deutschland) isoliert. CD4⁺ T-Zellen oder CD56⁺CD3⁻ NK-Zellen wurden durch eine negative MACS-Selektion (*engl.* Magnetic Activated Cell Sorting) angereichert (Miltenyi Biotec GmbH, Bergisch Gladbach, Deutschland). Die NK-Zell-Subpopulationen CD56^{dim}CD16⁺ und CD56^{bright}CD16⁻ wurden durchflusszytometrisch sortiert (FACS Aria™, Becton, Dickinson and Company, NJ, USA). Details siehe Publikation (1), Seite 3.

4.3 Antikörper und Reagenzien

Für die Testung des Einflusses therapeutischer Antikörper auf NK-Zellen wurden das polykonale ATG aus dem Kaninchen (Thymoglobulin[®], Genzyme GmbH, Neu Isenburg, Deutschland) und der humanisierte anti-CD52 Antikörper Alemtuzumab (Campath-1H, MedacSchering Onkologie GmbH, München, Deutschland) verwendet. Als Kontrollen dienten der murine monoklonale anti-CD3 Antikörper Orthoclone OKT3[®] (Janssen-Cilag BV, Tillburg, Niederlande), der humanisierte anti-IL2R α Antikörper Daclizumab (Zenapax[®], Hoffman La Roche AG, Basel, Schweiz) und eine polyklonale IgG Präparation aus dem Kaninchen (rIgG, Bethyl Laboratories Inc., Montgomery, Texas, USA). Durch Papain-Verdau wurden ATG, Alemtuzumab und ein anti-CD16 Antikörper (Klon 3G8, Dr. Ofer Mandelboim, The Hebrew University of Jerusalem, Israel) in Fab-Fragmente und Fc-Teile gespalten. Details siehe Publikation (1), Seiten 2 bis 3.

4.4 Funktionelle Charakterisierung der NK-Zellen

Die Funktionalität der NK-Zellen wurde mit Hilfe eines Zytotoxizitätstests und eines Degranulationstests gegen die humane erythromyeloblastoide Leukämiezelllinie K562, welcher MHC-Klasse I- und II-Antigene fehlen, getestet. Mit Hilfe der Durchflusszytometrie wurde beim Zytotoxizitätstest der Prozentsatz der durch NK-Zellen abgetöteten K562-Zellen, die DiOC₁₈(3) (Invitrogen GmbH, Karlsruhe, Deutschland) gefärbt sind, bestimmt. Die durchflusszytometrische Analyse von CD107a (Becton, Dickinson and Company, NJ, USA), einem granulären Membranprotein, ermöglichte eine direkte Aussage über die Degranulation der NK-Zellen. Details siehe Publikation (1), Seite 3.

4.5 Quantitative real-time RT-PCR

Die gesamte RNA wurde durch den RNeasy[®] Mini Kit (Qiagen GmbH, Hilden, Deutschland) aus den Zellysaten isoliert. Die cDNA wurde mit dem Enzym Reverse Transkriptase und Oligo-

dT-Nukleotiden als Primer hergestellt. Für eine quantitative Genexpressionsanalyse spezieller Kandidatengene (INF γ , TNF α , FasL und HPRT) wurde eine real-time Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction (RT-PCR) mit dem ABI PRISM 7500 Sequence Detection System (TaqMan™, Applied Biosystems Deutschland GmbH, Darmstadt, Deutschland) durchgeführt. Details siehe Publikation (1), Seite 3.

4.6 (De-)Methylierungsanalyse von regulatorischen T-Zellen

Die Quantifizierung der natürlichen regulatorischen T-Zellen erfolgte über eine Methylierungsanalyse der TSDR (*engl.* Treg-specific demethylated region) innerhalb des FOXP3 Gens. Es wurde DNA aus PBMCs von Patienten mit dem DNeasy® blood and tissue kit (Qiagen GmbH, Hilden, Deutschland) gewonnen. Das Methylierungsmuster der DNA wurde analysiert, indem durch eine Bisulfitbehandlung die nicht-methylierte Base Cytosin in Uracil konvertiert wurde und methyliertes Cytosin unverändert blieb. Das Reaktionsprodukt wurde anschließend mittels PCR vervielfältigt. Real-time PCR mit Methylierungs- und Nicht-Methylierungs-spezifischen Forward und Reverse Primern erfolgte mit dem Roche LightCycler 480 Probes Master (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Deutschland). Details siehe Publikation (2), Seite 601.

4.7 Statistik

Die Daten der *in vitro* Experimente und der Patienten wurden als Mittelwerte mit Standardabweichung dargestellt. Statistische Analysen wurden mit der GraphPad InStat™ for Windows (version 3.06) Software (GraphPad Software Inc., La Jolla, USA) berechnet. Es wurde eine Varianzanalyse (ANOVA, *engl.* analysis of variance) durchgeführt. Bis auf die real-time RT-PCR Daten wurden für alle statistischen Analysen Rohdaten verwendet. Die real-time RT-PCR Daten wurden log(10) transformiert um die Varianzen der normalverteilten Daten zu stabilisieren. Gruppen, deren p-Wert kleiner oder gleich 0,05 war, wurden als signifikant unterschiedlich betrachtet.

5 Ergebnisse

5.1 Einfluss von ATG und Alemtuzumab auf NK-Zellen – Publikation (1)

5.1.1 *In vivo* Depletion von NK-Zellen nach ATG-Therapie

Eine Induktionstherapie mit ATG führte bei Patienten nach einer kombinierten Niere-Pankreas-Transplantation zu einer signifikanten Abnahme der CD56⁺CD3⁻ NK-Zellen. Der Anteil der

NK-Zellen fiel von $13,4 \pm 10,6\%$ prä-transplant auf $2,0 \pm 2,1\%$ am Tag 1 nach Transplantation. Hingegen konnte bei der Vergleichsgruppe, die Basiliximab als Induktions-Therapie erhielt, nur ein marginaler und nicht signifikanter Rückgang der NK-Zell-Frequenzen festgestellt werden. Innerhalb der Beobachtungszeit von 20 Tagen konnte in beiden Gruppen zwar eine Erholung der NK-Zell-Frequenzen beobachtet werden, jedoch wurde das Ausgangsniveau vor Transplantation nicht erreicht.

5.1.2 ATG und Alemtuzumab binden an CD16 auf NK-Zellen

Es wurde durchflusszytometrisch die Bindung von ATG und Alemtuzumab an eine große Anzahl von NK-Zell-spezifischen und -unspezifischen Oberflächenmarkern untersucht. Dabei wurde keine Bindung von ATG und Alemtuzumab an die aktivierenden Rezeptoren NKp46, NKp44 und NKp30 sowie an die Familie der KIRs (*engl.* killer-cell immunoglobulin-like receptors) festgestellt. Jedoch wurde eine konzentrationsabhängige Bindung von ATG an die Oberflächenantigene CD8 und CD16 beobachtet. Der monoklonale anti-CD52 Antikörper Alemtuzumab wurde ebenfalls an CD16 konzentrationsabhängig gebunden.

5.1.3 Beeinflussung der Effektorfunktionen von NK-Zellen

Die Funktionalität der NK-Zellen wurde mit einem Zytotoxizitätstest und einem Degranulationstest gegen die humane Leukämiezelllinie K562 getestet. Eine Vorbehandlung IL-2 aktivierter NK-Zellen mit ATG und Alemtuzumab führte zu einer signifikanten Reduktion der Zytotoxizität der NK-Zellen. Die Kontrollantikörper Daclizumab und rIgG übten erst in sehr hohen Konzentrationen ($>50\mu\text{g/ml}$) einen Einfluss auf die Zytotoxizität der NK-Zellen aus. NK-Zellen werden aufgrund ihrer Expressionsdichte von CD56 (NCAM1) auf der Zelloberfläche in CD56^{dim} und $\text{CD56}^{\text{bright}}$ NK-Zellen unterschieden. Über 90% der CD56^{dim} NK-Zellen sind CD16 positiv, während die $\text{CD56}^{\text{bright}}$ Zellen keine oder nur eine sehr geringe CD16 Expression aufweisen. Es wurde untersucht, inwiefern ein negativer Einfluss der Antikörper auf die $\text{IFN}\gamma$ -Antwort der NK-Zellen nach Tumorzellkontakt bestand. Dabei wurde kein signifikant negativer Einfluss auf die $\text{IFN}\gamma$ -Produktion der $\text{CD56}^{\text{bright}}$ NK-Zellen festgestellt. Hingegen wurden die CD16 tragenden CD56^{dim} NK-Zellen sowohl durch ATG als auch Alemtuzumab bei geringen Konzentrationen von $0,1\mu\text{g/ml}$ signifikant in ihrer Zytokinproduktion gehemmt. Bei den Kontrollantikörpern war ein negativer Einfluss erst ab $50\mu\text{g/ml}$ signifikant messbar. Die Degranulationskapazität der NK-Zellen wurde mit Hilfe einer durchflusszytometrischen Analyse des granulären Proteins CD107a untersucht. Vergleichbar mit den Ergebnissen der $\text{IFN}\gamma$ -Produktion konnte auch bei der Analyse der Degranulation ein signifikant negativer Einfluss von

ATG und Alemtuzumab nur bei den CD56^{dim} NK-Zellen festgestellt werden. Erstmals konnte in dieser Arbeit der Nachweis erbracht werden, dass eine Stimulation mit ATG und Alemtuzumab zu einer Tumorzell-unabhängigen Degranulation führt.

5.1.4 Induktion der Apoptose in NK-Zellen

Innerhalb einer Stunde lösten geringe Konzentrationen (0,1µg/ml) von Alemtuzumab und ATG den programmierten Zelltod (Apoptose) in NK-Zellkulturen aus. Im Gegensatz dazu führten Daclizumab und rIgG erst bei hohen Konzentrationen zu einer minimalen Induktion der Apoptose. Für NK-Zellen waren im Gegensatz zu T- und B-Zellen schon geringste Mengen an ATG ausreichend für die Induktion des programmierten Zelltod. Um den Einfluss von ATG auf die CD56^{dim}CD16⁺ und CD56^{bright}CD16⁻ NK-Zell-Subpopulationen zu untersuchen, wurden NK-Zellen durchflusszytometrisch in beide Subpopulationen sortiert und getrennt mit ATG kultiviert. Im Gegensatz zu der CD56^{bright} NK-Zell-Fraktion zeigten die CD56^{dim} NK-Zellen eine starke Induktion von Apoptose und Nekrose nach einer ATG-Behandlung.

5.1.5 Induktion von FasL, TNFα und IFNγ

NK-Zellen exprimieren ohne externe Stimulation kein FasL, IFNγ und TNFα. Hingegen war nach Inkubation mit ATG oder Alemtuzumab eine konzentrationsabhängige, starke und hoch signifikante Induktion der mRNA von FasL, IFNγ und TNFα innerhalb der ersten Stunde zu beobachten, die sich nach sechs Stunden abschwächte. Die Expression von IFNγ war am stärksten, gefolgt von TNFα und FasL. Daclizumab und rIgG zeigten bei hohen Konzentrationen (10-50µg/ml) ebenfalls eine leichte Induktion von IFNγ, TNFα und FasL. Die durch ATG und Alemtuzumab ausgelöste Induktion von IFNγ und TNFα konnte auf Proteinebene in den Zellkulturüberständen bestätigt werden.

5.1.6 Der Fc-Teil ist ausreichend für eine Induktion der Zytokinproduktion, der Apoptose und der Degranulation

Durch Blockade des FcγRIIIα mit Fab-Fragmenten des anti-CD16 Antikörpers konnte gezeigt werden, dass die Bindung von ATG an den FcγRIIIα für die Induktion der Zytokinproduktion unbedingt notwendig ist. ATG löste bei NK-Zellen mit blockiertem CD16 keine Induktion von FasL, TNFα und IFNγ aus. Bei nicht blockiertem CD16 lösten die Fab-Fragmente von ATG oder Alemtuzumab keine Zytokinproduktion aus. In einem weiteren Schritt konnte demonstriert werden, dass die Bindung der Fc-Teile von ATG und Alemtuzumab an den FcγRIIIα für eine Zytokin-Induktion ausreichend ist. Das Expressionsniveau war bei Testung der Fc-Teile

vergleichbar mit dem, welches bei Verwendung des kompletten Antikörpers erreicht wurde. Auch für die durch ATG und Alemtuzumab ausgelöste Apoptose und Degranulation konnte gezeigt werden, dass diese allein durch den Fc-Teil und nicht durch die Fab-Fragmente der Antikörper induziert werden konnten. Um sicher zu stellen, dass hohe Konzentrationen von Immunglobulinen im Serum die beobachteten Effekte nicht blockierten, wurden Vollblut-Stimulationen durchgeführt. Fc-Teile von ATG und Alemtuzumab führten ebenso wie die vollständigen Antikörper im Vollblut zu einer Induktion von $\text{IFN}\gamma$, $\text{TNF}\alpha$ und FasL. Im Gegensatz zu den Experimenten mit isolierten NK-Zellen war in den Vollblutstimulationen die Expression von $\text{TNF}\alpha$ höher als die von $\text{IFN}\gamma$.

5.2 *In vivo* Depletion regulatorischer T-Zellen – Publikation (2)

Regulatorische $\text{CD4}^+\text{CD25}^+\text{FOXP3}^+$ T-Zellen sind potente negative Immunregulatoren, die in der Transplantationsmedizin im Zusammenhang mit einem verringerten Risiko einer Abstoßung diskutiert werden. Sie werden über die Expression des Transkriptionsfaktors FOXP3 charakterisiert, der wichtige Funktionen bei der Entstehung und Aufrechterhaltung des suppressorischen Phänotyps besitzt (12). Ein wesentliches Problem der Analyse regulatorischer T-Zellen durch die Messung der FOXP3 mRNA oder Proteinexpression ist die Tatsache, dass auch aktivierte Effektor-T-Zellen transient FOXP3 exprimieren können (13). Regulatorische T-Zellen unterscheiden sich auf epigenetischer Ebene von aktivierten T-Zellen; so sind ausschließlich regulatorische T-Zellen in der konservierten FOXP3-TSDR demethyliert (14). Mit der Analyse des Methylierungsstatus der FOXP3-TSDR konnte eine quantitative Analyse der regulatorischen T-Zellen bei solider Organtransplantation durchgeführt werden. Es wurde die Demethylierung der FOXP3-TSDR vor und nach ATG-Gabe bestimmt. Dabei zeigte sich, dass die Expression der regulatorischen T-Zellen nach ATG-Therapie bei allen Patienten reduziert war. Vor der Antikörper-Therapie konnten 0,6% - 7,6% regulatorische T-Zellen detektiert werden. Im Gegensatz dazu fiel der Anteil nach Induktionstherapie auf unter 0,25%. Interessanterweise führte die Induktionstherapie mit Basiliximab zu einem vergleichbaren Ergebnis. Der Anteil der regulatorischen T-Zellen fiel von durchschnittlich 1,6% vor der Transplantation auf durchschnittlich 0,66% nach Basiliximab-Therapie.

5.3 $\text{Fc}\gamma\text{RIIIa}$ und $\text{Fc}\gamma\text{RIIb}$ (CD32b) auf T-Lymphozyten – Publikation (3)

Die Bedeutung der Fc-Rezeptoren (FcR), insbesondere des $\text{Fc}\gamma\text{RIIIa}$, konnte für die NK-Zellen im Zusammenhang mit therapeutischen Antikörpern gezeigt werden. FcR können potente Aktivatoren (z.B. $\text{Fc}\epsilon\text{RI}$ und $\text{Fc}\gamma\text{RIIIa}$) aber auch negative Regulatoren (z.B. $\text{Fc}\gamma\text{RIIb}$) der

Immunantwort sein (15). FcR sind in der Regel paarweise zu finden, so dass auf einer Zelle sowohl inhibierende als auch aktivierende Rezeptoren gleichzeitig exprimiert werden (16). Mit Analysen der SH2 domain-containing inositol 5-phosphatase (SHIP) kann die Balance dieser aktivierenden und inhibierenden Signale untersucht werden. SHIP ist mit dem inhibitorischen FcγRIIb verknüpft und kann dadurch die Signaltransduktion verschiedener Immunrezeptoren negativ beeinflussen (15). Im Mausmodell konnte gezeigt werden, dass eine SH2 domain-containing inositol 5-phosphatase (SHIP)-Defizienz zu einer erhöhten Frequenz von CD4⁺CD25⁺FOXP3⁺ regulatorischen und CD4⁺CD25⁻FOXP3⁺ naiven T-Zellen führt. In der Peripherie, den Lymphknoten und der Milz zeigten diese T-Zellen in den SHIP defizienten Tieren eine erhöhte Frequenz an CD103, GITR, OX40, FcγRIIb bzw. FcγRIIIα. Bisher wurden Fcγ-Rezeptoren auf T-Zellen weder in der Maus noch beim Menschen gefunden.

6. Diskussion

6.1 Einfluss von ATG und Alemtuzumab auf NK-Zellen – Publikation (1)

Obwohl die T-Zell-depletierenden Eigenschaften von ATG mittlerweile gut dokumentiert sind, existieren derzeit nur unzureichende Informationen über den Einfluss auf NK-Zellen. Im Rahmen dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass eine ATG-Induktionstherapie bei Patienten nach einer kombinierten Niere-Pankreas-Transplantation zu einer signifikanten Abnahme der CD56⁺CD3⁻ NK-Zellen führte. Nach 10 Tagen trat eine Erholung der NK-Zell-Frequenzen auf, ohne dass im Beobachtungszeitraum von 20 Tagen das Ausgangsniveau erreicht wurde.

Diese negative Beeinflussung der NK-Zellen durch ATG ist von großer klinischer Bedeutung, da NK-Zellen einen bedeutsamen Anteil an der Bekämpfung von Virusinfektionen und Tumorerkrankungen haben, die als Komplikationen langzeitiger Immunsuppression auftreten können (6). Um den Einfluss von ATG und Alemtuzumab auf NK-Zellen analysieren zu können, wurde mit Hilfe von *in vitro* Experimenten die Bindung von ATG und Alemtuzumab an NK-Zell-spezifische und -unspezifische Oberflächenmarker untersucht. Dabei konnte die konzentrationsabhängige Bindung von ATG und Alemtuzumab an den FcγRIIIα (CD16) bestätigt werden (1,11). Des Weiteren führte eine Vorbehandlung von NK-Zellen mit geringsten Ausgangsmengen an ATG und Alemtuzumab zu einer verminderten Antwort gegen Tumorzellen. Dieser negative Effekt war auf eine Subpopulation der NK-Zellen, die FcγRIIIα exprimierenden CD56^{dim} NK-Zellen, beschränkt. Außerdem wurde durch die Bindung der beiden Antikörper eine Degranulation der CD56^{dim}CD16⁺ NK-Zellen ausgelöst, ohne dass ein

Tumorzellkontakt notwendig war. Diese Ergebnisse stehen im Widerspruch zu publizierten Daten von Penack et al. (17). Dort wird nach Inkubation von PBMCs mit Alemtuzumab ohne Tumorzellen keine verstärkte CD107a Expression bzw. Degranulation nachgewiesen. Hinsichtlich einer Apoptose und Nekrose auslösenden Wirkung von ATG konnten die Arbeiten von Penack et al. hingegen bestätigt werden (18). Im Rahmen dieser Arbeit konnte erstmalig gezeigt werden, dass die Induktion der Apoptose und Nekrose durch ATG auf die CD56^{dim}CD16⁺ NK-Zellen beschränkt ist. Im Vergleich mit T- und B-Zellen waren hierfür deutlich geringere Konzentrationen notwendig.

NK-Zellen werden mit der Komplikation des Cytokine-Release-Syndroms, welches bei der Immunsuppression mit Alemtuzumab oder ATG auftreten kann, in Verbindung gebracht. Es ist gekennzeichnet durch sehr hohe Serumkonzentrationen von unter anderem TNF α und IFN γ , die wenige Stunden nach Therapiebeginn auftreten (10,19). Für Alemtuzumab wurde aufgrund von Experimenten mit PBMCs schon vor mehr als einer Dekade die Hypothese formuliert, dass die massive Zytokin-Ausschüttung die Folge einer IgG1-abhängigen CD16-Ligation dieser Lymphozyten ist (11). In dieser Arbeit konnte erstmalig anhand von isolierten NK-Zellen eine Beteiligung dieser Lymphozytenpopulation am Cytokine-Release-Syndrom gezeigt werden, da es zu einer signifikanten Ausschüttung von TNF α und IFN γ nach einer Stunde ATG- oder Alemtuzumab-Behandlung kam. Außerdem kam es zu einer verstärkten Ausschüttung von FasL, welches zu einer Fas/FasL-induzierten Apoptose führen kann. So zeigte Eischen et al. (20), dass eine CD16-Ligation auf NK-Zellen zu einer Freisetzung von FasL führt und dies eine autokrine Apoptose auslösen kann. Die durch ATG und Alemtuzumab ausgelöste Freisetzung von FasL kann daher als ein autokriner Faktor bei der Induktion der Apoptose betrachtet werden.

Die Relevanz des Fc γ RIII α für die beobachteten Effekte von ATG und Alemtuzumab auf NK-Zellen wurde bereits durch die Arbeit von Wing et al. (11) verdeutlicht. Es konnte dort durch Testung des intakten Antikörpers Alemtuzumab und dessen Fab-Fragmenten gezeigt werden, dass sowohl die Spezifität als auch der Isotyp des Antikörpers für die Zytokinausschüttung relevant sind. In der vorliegenden Arbeit wurde nun demonstriert, dass allein die Bindung des IgG1 Fc-Fragments von ATG bzw. Alemtuzumab an den Fc γ RIII α die Zytokinfreisetzung, die Degranulation und die Apoptose induziert. Um den eventuell blockierenden Einfluss autologer Immunglobuline im Blut auf die durch die therapeutischen Antikörper ausgelösten Effekte zu analysieren, wurden Stimulationen von Vollblut mit Fc-Teilen und intaktem Antikörper durchgeführt. In den Vollblut Experimenten war im Gegensatz zu den Analysen der isolierten

NK-Zellen der Anteil an induziertem TNF α in Relation zu IFN γ stark erhöht. Dieses Ergebnis legt die Hypothese nahe, dass weitere CD16⁺ Zellpopulationen, wie beispielsweise Monozyten, durch die Fc-Teile von ATG und Alemtuzumab aktiviert werden. Diese Annahme wird durch eine Arbeit von Belge et al. (21) unterstützt, in welcher CD14⁺CD16⁺DR⁺⁺ Monozyten als wichtige Mediatoren für die TNF α -Sekretion beschrieben werden.

Die durch die Ligandierung der therapeutischen Antikörper mit dem Fc γ RIII α ausgelösten Effekte zeigten unterschiedlich starke Ausprägungen. Der humanisierte Antikörper Alemtuzumab hat im Vergleich zu ATG aus dem Kaninchen eine höhere Affinität für den humanen Fc γ RIII α auf NK-Zellen, obwohl beide Antikörper IgG1-Isotypen sind. Diese Affinitätsunterschiede können auf die Sequenzunterschiede in der konstanten Region von humanen und kaninen γ -Ketten zurückgeführt werden, da die Sequenzhomologie nur 60-80% beträgt (22). Die Kontrollantikörper Daclizumab, OKT3 und die IgG-Präparation aus dem Kaninchen (rIgG) zeigten eine sehr geringe Wirkung auf NK-Zellen. Das IgG-Kontrollserum aus dem Kaninchen besteht im Vergleich zur aufgereinigten IgG1-Fraktion des ATG aus mehreren IgG1-Subklassen (IgG1-4) und zeigte daher eine verminderter Affinität an CD16. Wie schon Chesla et al. (23) zeigte, haben murine IgG2a Fc-Fragmente eine sehr geringe Affinität für den humanen Fc γ RIII α . Auch in dieser Arbeit konnte für den murinen IgG2a Antikörper OKT3 keine Interaktion mit CD16 nachgewiesen werden. Für eine optimale Effektorfunktion von Antikörpern ist ein adäquates Glykosylierungsmuster des Fc-Fragments eine wichtige Voraussetzung (24). Abweichungen in der Glykosylierung könnten eine Erklärung für die Unterschiede zwischen den Fc-Fragmenten der vollständig humanisierten IgG1 Antikörper Daclizumab und Alemtuzumab sein. Eine genaue Analyse des Glykosylierungsmuster von Daclizumab wurde bereits von Stadlmann et al. (25) vorgelegt. In wiefern Unterschiede zu dem Glykosylierungsmuster von Alemtuzumab existieren, muss in weiteren Studien untersucht werden, da es keine entsprechenden Analysen bezüglich Alemtuzumab gibt.

6.2 *In vivo* Depletion regulatorischer T-Zellen – Publikation (2)

Mit der Analyse des Methylierungsstatus der FOXP3-TSDR konnte erstmals eine quantitative Analyse natürlicher regulatorischer T-Zellen bei der soliden Organtransplantation durchgeführt werden. Die Frequenz der regulatorischen T-Zellen war nach ATG- und Basiliximab-Therapie bei allen Patienten reduziert. Die beobachtete starke Depletion der regulatorischen T-Zellen nach ATG-Therapie ist konform mit der schon beschriebenen T-Zell-depletierenden Wirkung (1). Es konnte die von Sewgobind et al. (26) beschriebene Depletion der CD4⁺CD25⁺FOXP3⁺ T-Zellen

nach ATG-Therapie, die mit durchflusszytometrischen Methoden bestimmt wurde, durch die quantitative Analyse des Methylierungsstatus der FOXP3-TSDR bestätigt werden. Jedoch konnte die von Lopez et al. (4) *in vitro* gezeigte Induktion regulatorischer T-Zellen nach ATG-Behandlung von PBMCs nicht durch unsere *in vivo* Untersuchungen verifiziert werden.

Die Reduktion regulatorischer T-Zellen konnte auch bei den mit Basiliximab behandelten Patienten beobachtet werden. Dieses Ergebnis steht im Widerspruch zu dem bisher in der Literatur beschriebenen Wirkmechanismus von Basiliximab; dort führt eine Blockade des IL-2 α -Rezeptors (CD25) nicht zu einer Depletion der CD25⁺ T-Zellen (27,28). Inwieweit die parallele Erhaltungssimmunsuppression mit Tacrolimus, Mycophenolatmofetil und Prednison oder auch eine durch NK-Zellen vermittelte Antikörper-abhängige Zytotoxizität einen Einfluss auf die Depletion der regulatorischen T-Zellen hat, muss in weiteren Studien geklärt werden.

6.3 Fc γ RIII α und Fc γ RIIb (CD32b) auf T-Lymphozyten – Publikation (3)

Kerr et al. (29) beschreibt, dass sowohl eine induzierbare als auch eine Keimbahn-Defizienz von SH2 domain-containing inositol 5-phosphatase (SHIP) im Empfänger einer Knochenmarkspende die Komplikation einer GvHD vermindert. Es konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass im Mausmodell eine SHIP-Defizienz zu einer erhöhten Frequenz von CD4⁺CD25⁺FOXP3⁺ regulatorischen und CD4⁺CD25⁻FOXP3⁺ naiven T-Zellen führt. SHIP kann Signale, die vom inhibitorischen Fc γ RIIb oder vom aktivierenden Fc γ RIII α weitergeleitet werden, regulieren (30,15). Fc γ -Rezeptoren finden sich auf den häufigsten hämatopoetischen Zelltypen. Die Frage nach Fc γ -Rezeptoren auf T-Zellen wird in der Literatur kontrovers diskutiert; so wurde beispielsweise Fc γ RIIb bisher weder auf humanen noch murinen T-Zellen nachgewiesen (16). Es konnte hier erstmalig der Nachweis erbracht werden, dass in SHIP-defizienten Tieren auf der Oberfläche von CD25⁻ T-Zellen und CD25⁺ regulatorischen T-Zellen eine hohe Expression von Fc γ RIIb bzw. Fc γ RIII α vorliegt. SHIP-defiziente CD4⁺ T-Zellen könnten somit auf Antikörper, Immunkomplexe oder opsonierte Zellen reagieren, da SHIP normalerweise die Fc-Rezeptor vermittelten Signale limitiert (15,16). Diese Hypothese wird auch durch die erhöhten Serum-Level an spezifischen IgG-Isotypen in SHIP^{-/-}-Mäusen unterstützt (31), die als Liganden für die deregulierten Fc γ -Rezeptoren auf den CD4⁺ T-Zellen in den SHIP^{-/-}-Mäusen dienen können. Weitere Analysen sind notwendig, um den Einfluss der Fc-Rezeptor vermittelten Signale, die in diesem Modell nicht durch SHIP vermindert werden, auf eine mögliche Expansion der CD25⁻ FOXP3⁺ T-Zellen und der CD25⁺FOXP3⁺ regulatorischen T-Zellen zu klären.

7 Literatur

1. Bonefoy-Berard N, Vincent C, Revillard JP. Antibodies against functional leukocyte surface molecules in polyclonal antilymphocyte and antithymocyte globulins. *Transplantation* 1991;51:669-673.
2. Zand MS, Vo T, Pellegrin T, et al. Apoptosis and complement-mediated lysis of myeloma cells by polyclonal rabbit antithymocyte globulin. *Blood* 2006;107:2895-2903.
3. Naujokat C, Berges C, Fuchs D, et al. Antithymocyte globulins suppress dendritic cell function by multiple mechanisms. *Transplantation* 2007;83:485-497.
4. Lopez M, Clarkson MR, Albin M, Sayegh MH, Najafian NA. Novel mechanism of action for anti-thymocyte globulin: induction of CD4+CD25+Foxp3+ regulatory T cells. *J Am Soc Nephrol* 2006;17:2844-2853.
5. Buggins AG, Mufti GJ, Salisbury J, et al. Peripheral blood but not tissue dendritic cells express CD52 and are depleted by treatment with alemtuzumab. *Blood* 2002;100:1715-1720.
6. Scheinberg P, Fischer SH, Li L, et al. Distinct EBV and CMV reactivation patterns following antibody-based immunosuppressive regimens in patients with severe aplastic anemia. *Blood* 2007;109:3219-3224.
7. Chakrabarti S, Mackinnon S, Chopra R, et al. High incidence of cytomegalovirus infection after nonmyeloablative stem cell transplantation: potential role of Campath-1H in delaying immune reconstitution. *Blood* 2002;99:4357-4363.
8. Calistri E, Tiribelli M, Battista M, et al. Epstein-Barr virus reactivation in a patient treated with anti-thymocyte globulin for severe aplastic anemia. *Am J Hematol* 2006;81:355-357
9. Guttman RD, Caudrelier P, Alberici G, Touraine JL. Pharmacokinetics, foreign protein immune response, cytokine release, and lymphocyte subsets in patients receiving thymoglobuline and immunosuppression. *Transplant Proc* 1997;29:24S-26S.
10. Moreau T, Coles A, Wing MG, et al. CAMPATH-IH in multiple sclerosis. *Mult Scler* 1996;1:357-365.

-
11. Wing MG, Moreau T, Greenwood J, et al. Mechanism of first-dose cytokine-release syndrome by CAMPATH 1-H: involvement of CD16 (FcγRIII) and CD11a/CD18 (LFA-1) on NK cells. *J Clin Invest* 1996;98:2819-2826.
 12. Zheng Y, Rudensky AY. Foxp3 in control of the regulatory T cell lineage. *Nat Immunol*. 2007;8(5):457-462. Review.
 13. Gavin MA, Torgerson TR, Houston E, et al. Single-cell analysis of normal and FOXP3-mutant human T cells: FOXP3 expression without regulatory T cell development. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2006;103(17):6659-6664.
 14. Floess S, Freyer J, Siewert C, et al. Epigenetic control of the foxp3 locus in regulatory T cells. *PLoS Biol*. 2007;5(2):e38.
 15. Ono M, Bolland S, Tempst P, Ravetch JV. Role of the inositol phosphatase SHIP in negative regulation of the immune system by the receptor Fc(γ)RIIB. *Nature* 1996;19;383(6597):263-266.
 16. Nimmerjahn F, Jeffrey V, Ravetch JV. Fcγ Receptors: Old Friends and New Family Members. *Immunity* 2006;24:Issue1,19-28.
 17. Fischer L, Penack O, Gentilini C, et al. The anti-lymphoma effect of antibody-mediated immunotherapy is based on an increased degranulation of peripheral blood natural killer (NK) cells. *Exp Hematol* 2006;34:753-759.
 18. Penack O, Fischer L, Gentilini C, et al. The type of ATG matters - natural killer cells are influenced differentially by Thymoglobulin, Lymphoglobulin and ATG-Fresenius. *Transpl Immunol* 2007;18:85-87.
 19. Guttman RD, Caudrelier P, Alberici G, Touraine JL. Pharmacokinetics, foreign protein immune response, cytokine release, and lymphocyte subsets in patients receiving thymoglobuline and immunosuppression. *Transplant Proc* 1997;29:24S-26S.
 20. Eischen CM, Schilling JD, Lynch DH, Krammer PH, and Leibson PJ. Fc receptor-induced expression of Fas ligand on activated NK cells facilitates cell-mediated cytotoxicity and subsequent autocrine NK cell apoptosis. *J Immunol* 1996;156:2693-2699.
 21. Belge KU, Dayyani F, Horelt A, et al. The proinflammatory CD14+CD16+DR++ monocytes are a major source of TNF. *J Immunol* 2002;168:3536-3542.

-
22. Appella E, Chersi A, Mage RG, Dubiski S. Structural basis of the A14 and A15 allotypic specificities in rabbit immunoglobulin G. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1971;68(6):1341-1345.
 23. Chesla SE, Li P, Nagarajan S, Selvaraj P, Zhu C. The membrane anchor influences ligand binding two-dimensional kinetic rates and three-dimensional affinity of Fcγ₃ (CD16). *J Biol Chem.* 2000;275(14):10235-10246.
 24. Nimmerjahn F, Ravetch JV. Divergent immunoglobulin g subclass activity through selective Fc receptor binding. *Science* 2005;310(5753):1510-1512.
 25. Stadlmann J, Pabst M, Kolarich D, Kunert R, Altmann F. Analysis of immunoglobulin glycosylation by LC-ESI-MS of glycopeptides and oligosaccharides. *Proteomics.* 2008;8(14):2858-2871.
 26. Sewgobind V, Kho M, van der Laan L, et al. The effect of rabbit anti-thymocyte globulin induction therapy on regulatory T cells in kidney transplant patients. *Nephrology Dialysis Transplantation* 2009; doi:10.1093/ndt/gfn778.
 27. Game DS, Hernandez-Fuentes MP, Lechler RI. Everolimus and basiliximab permit suppression by human CD4⁺CD25⁺ cells in vitro. *Am J Transplant* 2005;5(3):454-464.
 28. Tkaczuk J, Yu CL, Baksh S, et al. Effect of anti-IL-2Rα antibody on IL-2-induced Jak/STAT signaling. *Am J Transplant* 2002;2(1):31-40.
 29. Kerr WG. A role for SHIP in stem cell biology and transplantation. *Curr Stem Cell Res Ther* 2008:99-106. Review.
 30. Galandrini R, Tassi I, Morrone S, et al. The adaptor protein shc is involved in the negative regulation of NK cell-mediated cytotoxicity. *Eur J Immunol* 2001;31(7):2016-2025.
 31. Brauweiler A, Tamir I, Porto JD, et al. Differential Regulation of B Cell Development, Activation, and Death by the Src Homology 2 Domain-containing 5' Inositol Phosphatase (SHIP). *J Exp Med* 2000;191:1545-1554.

8 Anteilserklärung

Frau Diana Stauch hat ihre experimentelle kumulative Doktorarbeit mit dem Thema “Wirkmechanismen therapeutischer Antikörper auf Natürliche Killerzellen in der soliden Organtransplantation“ angefertigt. Grundlage für die kumulative Promotion sind folgende drei Publikationen:

1. Publikation

Stauch D, Dernier A, Kunert K, Volk HD, Sarmiento E, Pratschke J and Kotsch K. Targeting of Natural Killer cells by rabbit antithymocyte globulin and Campath-1H: similar effects independent of specificity. PLoS ONE 2009;4(3):e4709.

Frau Stauch war für das Design und die Durchführung der praktischen Experimente dieser Publikation überwiegend selbständig verantwortlich. Die Analysen führte sie vollständig unabhängig durch. Ferner trug sie maßgeblich zur Manuskripterstellung bei. Beitrag: 90%

2. Publikation

Wieczorek G, Asemissen A, Model F, Turbachova I, Floess S, Liebenberg V, Baron U, **Stauch D**, Kotsch K, Pratschke J, Hamann A, Loddenkemper C, Stein H, Volk HD, Hoffmüller U, Grützkau A, Mustea A, Huehn J, Scheibenbogen C, Olek S. Quantitative DNA methylation analysis of FOXP3 as a new method for counting regulatory T cells in peripheral blood and solid tissue. Cancer Res 2009;69(2):599-608.

Frau Stauch trug ein wichtiges Experiment zur Publikation bei (FoxP3 Demethylierungsanalyse von mit rATG und Basiliximab behandelten Transplantationspatienten) und beteiligte sich maßgeblich an der Diskussion bei der Entstehung der Publikation. Beitrag: 5%

3. Publikation

Collazo MM, Wood D, Paraiso KH, Lund E, Engelman RW, Le CT, **Stauch D**, Kotsch K, Kerr WG. SHIP limits immunoregulatory capacity in the T cell compartment. Blood 2009;113(13):2934-2944.

Frau Stauch trug ein wichtiges Experiment zur Publikation (Nachweis der FcγR-Expression in SHIP-defizienten Mäusen) bei und beteiligte sich maßgeblich an der Diskussion bei der Entstehung der Publikation. Beitrag: 10%

9 Ausgewählte Publikationen

Die Seiten 18 bis 52 umfassen folgende Originalartikel:

1. Publikation:

Stauch D, Dernier A, Kunert K, Volk HD, Sarmiento E, Pratschke J and Kotsch K. Targeting of Natural Killer cells by rabbit antithymocyte globulin and Campath-1H: similar effects independent of specificity. PLoS ONE 2009;4(3):e4709.

Impact Factor: noch nicht benannt

2. Publikation:

Wieczorek G, Asemissen A, Model F, Turbachova I, Floess S, Liebenberg V, Baron U, **Stauch D**, Kotsch K, Pratschke J, Hamann A, Loddenkemper C, Stein H, Volk HD, Hoffmüller U, Grützkau A, Mustea A, Huehn J, Scheibenbogen C, Olek S. Quantitative DNA methylation analysis of FOXP3 as a new method for counting regulatory T cells in peripheral blood and solid tissue. Cancer Res 2009;69(2):599-608.

Impact Factor: 7.672

3. Publikation:

Collazo MM, Wood D, Paraiso KH, Lund E, Engelman RW, Le CT, **Stauch D**, Kotsch K, Kerr WG. SHIP limits immunoregulatory capacity in the T cell compartment. Blood 2009;113(13):2934-2944.

Impact Factor: 10.896

10 Lebenslauf

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

Publikationen

Wieczorek G, Asemissen A, Model F, Turbachova I, Floess S, Liebenberg V, Baron U, **Stauch D**, Kotsch K, Pratschke J, Hamann A, Loddenkemper C, Stein H, Volk HD, Hoffmüller U, Grützkau A, Mustea A, Huehn J, Scheibenbogen C, Olek S. Quantitative DNA methylation analysis of FOXP3 as a new method for counting regulatory T cells in peripheral blood and solid tissue. *Cancer Res* 2009;69(2):599-608.

Impact Factor: 7.672

Collazo MM, Wood D, Paraiso KH, Lund E, Engelman RW, Le CT, **Stauch D**, Kotsch K, Kerr WG. SHIP limits immunoregulatory capacity in the T cell compartment. *Blood* 2009;113(13):2934-2944.

Impact Factor: 10.896

Stauch D, Dernier A, Kunert K, Volk HD, Sarmiento E, Pratschke J and Kotsch K. Targeting of Natural Killer cells by rabbit antithymocyte globulin and Campath-1H: similar effects independent of specificity. *PLoS ONE* 2009;4(3):e4709.

Impact Factor: noch nicht benannt

Pratschke J, **Stauch D**, and Kotsch K. Role of NK and NKT cells in solid organ transplantation. *Transpl Int.* 2009 Apr 21: Epub ahead of print.

Impact Factor: 2,300

Vorträge

Stauch D, Dernier A, Volk HD, Pratschke J and Kotsch K. Targeting of natural killer cells by rATG and Campath-1H: similar effects independent of specificity". Deutsche Transplantations Gesellschaft, Bochum 2008.

Stauch D, Dernier A, Volk HD, Pratschke J and Kotsch K. Targeting of natural killer cells by rATG and Campath-1H: similar effects independent of specificity. Deutsche Gesellschaft für Immunogenetik, Düsseldorf 2008.

Stauch D, Dernier A, Volk HD, Pratschke J and Kotsch K. Influence of ATG on natural killer cells. European Society for Organ Transplantation, Prag 2007.

Stauch D, Dürkopp N, Thoma S, Bosse R und Schulz G. Herstellung von Chondrozyten für die autologe Chondrozyten Transplantation. Deutsche Gesellschaft für Unfallchirurgie, Berlin 2002.

Poster

Stauch D, Dernier A, Volk HD, Pratschke J and Kotsch K. Targeting of NK cells by rATG and Campath-1H: similar effects independent of specificity. American Transplant Congress, Toronto 2008.

Stauch D, Dernier A, Volk HD, Pratschke J and Kotsch K. Effects of Thymoglobulin on Natural Killer Cells. 10th Meeting of the Society for Natural Immunity, Cambridge 2007.

Stauch D, Dernier A, Volk HD, Pratschke J and Kotsch K. Effects of Thymoglobulin on Natural Killer cells. American Transplant Congress, San Francisco 2007.

Stauch D, Dürkopp N, Thoma S and Bosse R. Serum-free GMP Production of Human Articular Chondrocytes for Autolous Chondrocyte Implementation. European Tissue Engineering Society, Geneva 2003.

Stauch D, Dürkopp N, Thoma S and Bosse R. GMP-Production of Human Articular Chondrocytes under Serum-Free Conditions. International Cartilage Repair Society, Toronto 2003.

11 Selbständigkeitserklärung

“Ich, Diana Stauch, erkläre, dass ich die vorgelegte Dissertationsschrift mit dem Thema “Wirkmechanismen therapeutischer Antikörper auf Natürliche Killerzellen in der soliden Organtransplantation“ selbst verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt, ohne die (unzulässige) Hilfe Dritter verfasst und auch in Teilen keine Kopien anderer Arbeiten dargestellt habe.“

.....

Datum

.....

Unterschrift

12 Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Prof. Dr. med. Hans-Dieter Volk, Direktor des Institutes für Medizinische Immunologie der Charité, Universitätsmedizin Berlin, für die bereitwillige Übernahme der Betreuung meiner Promotion und die Unterstützung, die er mir die gesamte Zeit über gewährte.

Mein größter Dank gilt PD Dr. rer. nat. Katja Kotsch für die Überlassung der interessanten Fragestellung, ihre Unterstützung, ihr Vertrauen und für alle Freiheiten. Sie war mir jederzeit eine kompetente, hilfsbereite und freundschaftliche Ansprechpartnerin, die mir durch fruchtbare Diskussionen immer wieder zum roten Faden verholfen hat.

Ein besonderer Dank gilt Annelie Dernier; sie unterstützte mich intensiv bei den PCR-Analysen und sorgte so für eine gleich bleibend hohe Qualität. Ebenso möchte ich meinen Kollegen Katrin Göldner, Cam-Tien Le, Cornelia Fabritius, Kristina Kunert, Anja Berger, Jens Dinter, Mustafa Solmaz, Arne Fuldner, Götz Melloh und Roman Klemz für die gute Zusammenarbeit und schöne Zeit im Labor danken. Ein herzliches Dankeschön für ihre immerwährende Blutspende-Bereitschaft.

Den Mitarbeitern des Institutes für Biochemie der Charité, Universitätsmedizin Berlin, insbesondere Dana Reinhardt und Dr. rer. nat. Christa Scholz, danke ich für die Hilfe bei der Generierung der verschiedenen Antikörper Fragmente.

Ein besondere Dank gilt auch PD Dr. med. Johann Pratschke, Klinik für Allgemein-, Viszeral- und Transplantationschirurgie der Charité, Universitätsmedizin Berlin, und seinen Kollegen für die gute und fruchtbare Zusammenarbeit.

Ganz herzlich möchte ich mich bei meiner ganzen Familie bedanken. Meinen Eltern, die mir das Studium erst ermöglichten und mich jederzeit mit Rat und Tat unterstützten. Meinen Schwiegereltern, die mir durch die liebevolle Betreuung unserer Tochter Julie Zeit für arbeitsintensive Phasen und für die Teilnahme an Kongressen gaben. Mein allergrößter Dank gilt meinem Mann Henning Samwer, der mich mit seinem Verständnis, seinem praktischen und theoretischen Wissen und seiner Liebe stets unterstützte.