

Aus der
Klinik für Allgemein- Visceral- und Transplantationschirurgie
der Medizinischen Fakultät Charité – Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

**Molekulare Kandidatenmarker und ihre Bedeutung für das
Transplantatüberleben nach allogener Organtransplantation**

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

vorgelegt der Medizinischen Fakultät
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von
Kristina Kunert
aus Donauwörth

Gutachter: 1. Priv.-Doz. Dr. med. J. Pratschke
2. Prof. Dr.med. W.O. Bechstrein
3. Prof. Dr. med. G. Otto

Datum der Promotion: 3. September 2010

Inhaltsverzeichnis

| | | |
|-----------|---|-----------|
| 1 | ZUSAMMENFASSUNG | 4 |
| 2 | EINLEITUNG UND ZIELSTELLUNG | 4 |
| 3 | STUDIENDESIGN UND METHODIK | 6 |
| 4 | ERGEBNISSE | 9 |
| 4.1 | Bedeutung der KIR/HLA Liganden Inkompatibilität | 9 |
| 4.2 | Transplantatfunktion nach Spendertherapie mit Methylprednisolon | 9 |
| 4.3 | Effekte von ATG und Alemtuzumab auf NK-Zellen | 10 |
| 5 | DISKUSSION | 11 |
| 6 | LITERATUR | 15 |
| 7 | AUSGEWÄHLTE PUBLIKATIONEN UND ANTEILSERKLÄRUNG | 19 |
| 8 | DREI PUBLIKATIONEN ALS PROMOTIONSLEISTUNG | 20 |
| 8.1 | KIR/HLA ligand incompatibility in kidney transplantation | 20 |
| 8.2 | Methylprednisolone therapy in deceased donors reduces inflammation in the donor liver and improves outcome after liver transplantation: a prospective randomized controlled trial | 27 |
| 8.3 | Targeting of natural killer cells by rabbit antithymocyte globulin and campath-1H: similar effects independent of specificity | 36 |
| 10 | LEBENS LAUF | 50 |
| 11 | VOLLSTÄNDIGE PUBLIKATIONS LISTE | 51 |
| 12 | SELBSTÄNDIGKEITSERKLÄRUNG | 53 |
| 13 | DANKSAGUNG | 54 |

1 ZUSAMMENFASSUNG

Die Adaption der Immunsuppression sowie daraus resultierende Strategien zur Toleranzinduktion im Kontext der soliden Organtransplantation fordern idealerweise non-invasive Surrogatmarker, die eine Immunalloreaktivität des Empfängers gegenüber dem Spenderorgan frühzeitig reflektieren. Zentraler Aspekt der vorliegenden Arbeiten war daher die Untersuchung definierter molekularer Kandidatenmarker und ihre Relevanz für das Transplantatüberleben. So ließ sich mittels Genotypisierung erstmals die Bedeutung der Inkompatibilität zwischen den polymorphen *killer-cell immunoglobulin-like* Rezeptoren (KIR) auf Natürlichen Killerzellen und ihren korrespondierenden HLA Liganden für das Risiko einer akuten Abstoßung nach allogener Nierentransplantation darstellen. In einer weiterführenden klinischen Untersuchung konnte durch die Analyse molekularer Inflammationsmarker der protektive Effekt einer Spendervorbehandlung mit Methylprednisolon bezüglich des Hirntod-assoziierten Ischämie/Reperfusionsschadens quantifiziert werden. Ferner wurde erstmals deutlich, dass eine Induktionstherapie mittels Anti-Thymozyten-Globulin (ATG) neben der T-Zell Depletion auch zu einem rapiden Abfall der NK-Zellen führt, woraufhin weiterführende *in vitro* Experimente konstatierten, dass eine Behandlung von NK-Zellen mit therapeutischen Antikörpern (ATG oder Alemtuzumab) zu einer Reduktion ihrer Effektorfunktionen führt und Apoptose induziert. Zusammengefasst betrachtet unterstreichen diese Arbeiten die Bedeutsamkeit einer Implementation molekularer Marker in die perioperative Diagnostik der soliden Organtransplantation.

2 EINLEITUNG UND ZIELSTELLUNG

Die solide Organtransplantation hat sich während der letzten zwei Dekaden zur Methode der Wahl bei terminaler Insuffizienz vieler Organsysteme entwickelt. Im Jahr 2008 wurden im Versorgungsgebiet von Eurotransplant 3.527 Nieren-, 1.606 Leber- und 194 Nieren-Pankreas Transplantationen durchgeführt [EUROTRANSPLANT 2008]. Trotz steigender Transplantationserfolge stellt der Verlust von Organtransplantaten nach Monaten bis Jahren weiterhin eines der herausragenden Probleme in der Transplantationsmedizin dar.

Die akute immunologische Reaktion auf Fremdgewebe (akute Abstoßung) stützt sich hauptsächlich auf ein T-zellvermitteltes Geschehen, welches meist innerhalb von Tagen bis mehreren Wochen nach Transplantation auftritt. Die initiale Fremderkennung zellulärer Oberflächenantigene erfolgt anhand von MHC Klasse II-tragenden Endothelzellen [AUSTYN 1992], sowie Dendritischen Zellen und es kommt zur Aktivierung immunkompetenter T-Lymphozyten, welche das Transplantat zusammen mit aktivierten B-Lymphozyten,

Makrophagen und Natürlichen Killerzellen (NK) infiltrieren. Durch gegenseitige Aktivierung entsteht ein *Circulus vitiosus*, der letztendlich in der Transplantatzerstörung resultiert. Es gibt zunehmend Evidenzen, dass auch das angeborene Immunsystem sowohl bei der Organabstoßung, als auch bei der Toleranzinduktion eine bedeutende Rolle spielt [SEINO et al. 2001; MCNERNEY et al. 2006]. Nach Transplantatinfektion von NK-Zellen könnte deren Aktivierung in der Frühphase für das Allotransplantat von Bedeutung sein. Humane NK-Zellen exprimieren so genannte *killer-cell immunoglobulin-like* Rezeptoren (KIRs), welche aus inhibitorischen und aktivierenden Rezeptoren bestehen [MORETTA et al. 1990]. KIR Rezeptoren erkennen MHC (HLA) Klasse I Liganden auf Antigen-präsentierenden Zellen, insbesondere gruppenspezifische HLA-C1 und HLA-C2 Allele sowie das Bw4 Motiv [GUMPERZ et al. 1995; CARRINGTON & NORMAN 2003]. Es besteht die Annahme, dass die Reaktivität der NK-Zelle durch die Balance ihrer inhibitorischen und aktivierenden Signale determiniert wird. Bisher ist nur wenig über die Mechanismen der NK-Zellaktivierung im Rahmen der soliden Organtransplantation bekannt. Die Fähigkeit der KIR Rezeptoren zwischen verschiedenen HLA Klasse I Allelen zu differenzieren, ist eine Eigenschaft der NK-Zellen, welche in diesem Kontext von besonderer Relevanz sein könnte (Publikation 1).

Die Empfänger Immunantwort wird weiterhin aufgrund des Risikofaktors Spenderhirntod durch proinflammatorische Veränderungen im Sinne eines verstärkten Ischämie/Reperfusionsschadens (I/R) intensiviert. So konnte bislang gezeigt werden, dass nach antiinflammatorischer Vorbehandlung mit Methylprednisolon die Funktion und das Überleben von Spenderorganen im Vergleich zu unbehandelten Organen deutlich verbessert waren [PRATSCHKE et al. 2001]. Es stellt sich daher die Frage, ob durch die sogenannte Spendertherapie der I/R Schaden attenuiert werden kann und sich dies frühzeitig durch definierte Kandidatenmarker quantifizieren lässt (Publikation 2).

Antikörper gegen T-Zellepitope haben sich zu einem integralen Bestandteil des immunsuppressiven Regimes entwickelt. Im Rahmen der Induktionstherapie wird Anti-Thymozyten-Globulin (ATG) effektiv bei der Nieren- und Knochenmarktransplantation eingesetzt [REMBERGER et al. 2001]. ATG ist ein polyklonaler Antikörper aus dem Kaninchen und richtet sich mit einer Vielzahl von Gamma Immunglobulinen (IgG) gegen Oberflächenantigene humaner T-Lymphozyten [GENZYME 2009]. Jüngste Untersuchungen belegen, dass neben der T-Zell Depletion auch eine Beeinflussung von Dendritischen Zellen [NAUJOKAT et al. 2007], sowie eine Induktion von regulatorischen T-Lymphozyten *in vitro* nach ATG Gabe zu beobachten ist [LOPEZ et al. 2006]. Alemtuzumab wird zunehmend als Komponente der Immunsuppression zur Steroiddosisreduktion eingesetzt. Im Gegensatz zu ATG ist Alemtuzumab ein vollständig humanisierter monoklonaler anti-CD52 Antikörper, der

hauptsächlich T-, B- und Dendritische Zellen depletiert [BUGGINS et al. 2002]. Bisherige Arbeiten belegen die immunmodulatorischen Effekte von ATG und Alemtuzumab *in vivo* sowie *in vitro* [GUTTMANN et al. 1997; BRAUWEILER et al. 2000; GALANDRINI et al. 2001]. Da NK-Zellen mit der Komplikation des *Cytokine Release Syndroms*, welches bei der Immunsuppression mit Alemtuzumab oder ATG auftreten kann, in Verbindung gebracht wird, sollte der Einfluss dieser beiden Antikörper auf NK-Zellen genauer untersucht werden (Publikation 3).

Ziel der Arbeiten war die Analyse spezifischer molekularer Biomarker, welche zur Individualisierung der Immunsuppression und Verringerung der Side Effects im Rahmen der soliden Organtransplantation führen beitragen könnten. Untersucht wurde hierzu vorrangig die Interaktion von KIR Rezeptoren auf NK-Zellen des Empfängers mit HLA Epitopen des Spenders (Publikation 1). Ferner wurden diverse Serummarker für ein Monitoring der Spendertherapie mit Methylprednisolon evaluiert (Publikation 2), sowie der Einfluss von therapeutischen Antikörpern unter besonderer Berücksichtigung von ATG und Alemtuzumab auf die Funktion der NK-Zellen untersucht (Publikation 3).

3 STUDIENDESIGN UND METHODIK

KIR Studie (Publikation 1)

In einer retrospektiven Fallkontrollstudie wurde untersucht, ob nach allogener Nierentransplantation das Risiko einer akuten oder subklinisch akuten Abstoßung durch die Interaktion zwischen Empfänger KIR Rezeptoren auf NK-Zellen und HLA Liganden des Transplantates beeinflusst wird. Die Auswertung der KIR/HLA Liganden Konstellation erfolgte auf genomischer Ebene mit konventioneller Polymerase Kettenreaktion (PCR) anhand von Blutproben und lysiertem Milzgewebe 224 nicht verwandter Empfänger/Spenderpaare. Bei 105 Patienten wurden innerhalb der ersten drei postoperativen Monate eine oder mehrere akute Abstoßungsreaktionen anhand von Feinnadelbiopsien histologisch gesichert (Klassifikation nach Banff '97), 119 Patienten zeigten eine klinisch beständige Transplantatfunktion und dienten als Kontrollgruppe.

Methylprednisolon Studie (Publikation 2)

Es wurde untersucht, ob die Hirntod-assoziierte Transplantatschädigung nach allogener Lebertransplantation durch eine antiinflammatorische Vorbehandlung des Leichenspenders mit Methylprednisolon günstig zu beeinflussen ist. Hierzu wurde eine prospektive kontrollierte klinische Studie mit 100 hirntoten Organspendern durchgeführt, bei welcher die Hälfte der Spender bis zum Zeitpunkt der Organentnahme mit Methylprednisolon behandelt wurde. Die

Konzentration löslicher Inflammationsmarker in peripherem Spenderblut wurde durchflusszytometrisch bestimmt. Unmittelbar nach der Spender-Laparotomie, im Rahmen der 6-Monats Nachsorgeuntersuchung und bei klinischen Anzeichen einer Abstoßungsreaktion wurden Leberstanzbiopsien entnommen. Daraus ließen sich die Genexpression ausgewählter Inflammationsmarker mit real-time RT-PCR quantifizieren, sowie histologisch der Abstoßungsgrad sichern.

ATG/ Alemtuzumab Studie (Publikation 3)

In einer prospektiven kontrollierten klinischen Studie wurde der Einfluss der therapeutischen Antikörper ATG und Alemtuzumab auf NK-Zellen bei der soliden Organtransplantation untersucht. Mit Hilfe von *in vivo* und *in vitro* Untersuchungen sollten verschiedene wesentliche Aspekte betrachtet werden. Für die *in vivo* Versuche erfolgte die Analyse peripheren Bluts von acht Patienten mit kombinierter Nieren-Pankreas Transplantation, die zur perioperativen Induktionstherapie ATG erhielten. Die Vergleichsgruppe wurde von neun Patienten mit allogener Nierentransplantation gebildet, welchen als Induktionstherapie zweimalig Basiliximab verabreicht wurde. In beiden Gruppen bestand die Erhaltungssimmunsuppression aus Mycophenolatmofetil, Tacrolimus und Prednison. Für die *in vitro* Experimente wurden mononukleäre Zellen aus peripherem Blut freiwilliger Spender oder Buffy Coats isoliert. Daraus wurden T-Lymphozyten und NK-Subpopulationen angereichert und anschließend mit Fc-Region, Fab-Fragment oder dem vollständigem Antikörper ATG und Alemtuzumab in steigender Konzentration inkubiert. Als Kontrolle dienten der monoklonale anti-CD3 Antikörper Orthoclone, der humanisierte anti-IL2R α Antikörper Daclizumab sowie eine polyklonale IgG Präparation aus dem Kaninchen. Die Genexpression spezieller Kandidatengene konnte unter Verwendung der real-time Reverse Transkriptase (RT) PCR quantifiziert werden.

Konventionelle PCR

Zur Genotypisierung der KIR Rezeptoren (Publikation 1) wurde genomische DNA präpariert, unter Verwendung von Sequenz-spezifischen Primern (SSP) PCR amplifiziert, anschließend elektrophoretisch aufgetrennt und über eine Ethidiumbromid Färbung sichtbar gemacht. Als interne Kontrolle diente das Somatotropin Gen. Die HLA-A, -B und -C Genotypisierung (Publikation 1) erfolgte mittels SSP-PCR und Sequenz-spezifischer Oligonukleotid (SSO) PCR.

Quantitative real-time Reverse Transkriptase PCR (TaqMan)

Die quantitative Untersuchung der Kandidatenmarker CCL19, CCL21, CD3, CD68, CD69, CD80, FasL, HLA-DRB, HO-1, ICAM-1, IFN γ , IP-10, MICA, TGF β , TLR2, TLR4 und TNF α aus peripherem Blut (Publikationen 2 und 3) erfolgte unter Verwendung der real-time RT-PCR mit einer Taqman Sonde. Als Standard wurde die Expression des Housekeeping Gens

Hypoxanthin-Guanin-Phosphoribosyl-Transferase (HPRT) gewählt. Die relative Expression der Kandidatenmarker wurde aus dem Verhältnis zwischen der Intensität von nachweisbarer messenger RNA und von HPRT berechnet.

Apoptose- und Nekroseassay

Mit Annexin V Fluorescein Isothiozyanat (FITC) und Propidium Iodid (PI) wurden die Apoptose und Nekrose der Zellen durchflusszytometrisch bestimmt (Publikation 3). Die Zellen wurden wie folgt unterschieden: intakt (Annexin V FITC-/PI-), apoptotisch (Annexin V FITC+/PI-) und nekrotisch (Annexin V FITC+/PI+).

Degranulationsassay

Die durchflusszytometrische Analyse von CD107a, einem granulären Membranprotein, ermöglichte eine direkte Aussage über die Degranulation der NK-Zellen (Publikation 3).

Zytotoxizitätsassay

Die Funktionalität der NK-Zellen wurde mit einem Viabilitäts- und Zytotoxizitätstest gegen die humane erythromyeloblastoide Leukämiezelllinie K562, welcher MHC-Klasse I- und II-Antigene fehlen, getestet (Publikation 3). Mit Hilfe der Durchflusszytometrie wurde beim Zytotoxizitätstest der Prozentsatz der durch NK-Zellen abgetöteten K562-Zellen, die DiOC₁₈(3) gefärbt sind, bestimmt.

Durchflusszytometrie

Die Quantifizierung der löslichen Inflammationsmarker IL-2R α , IL-6, IL-8 und TNF α (Publikation 2) erfolgte mit Immulite (DPC Buehlmann GmbH, Österreich). Die Serumkonzentration von IFN γ , IL-2, IL-10, IP-10 und MCP-1 (Publikation 2) wurde mit dem Cytometric Bead Array (Becton Dickinson, Deutschland) gemessen.

Statistische Analysen

Alle statistischen Auswertungen erfolgten mit der jeweils aktuellen Software von SPSS und GraphPad InStat für Windows. Für Analysen normalverteilter Datensätze wurde je nach Fragestellung der unpaired, two-tailed oder Tukey-Kramer t-Test und one Way Anova angewandt; für nicht normalverteilte Populationen der nicht-parametrische Mann-Whitney Test. Kategoriale Variablen wurden mit dem Chi² oder Fisher exakt Test analysiert. Multivariate Analysen erfolgten mit einer logistischen Regression. Es wurde ein konservatives Niveau von $p < 0,05$ als statistisch signifikant festgelegt.

4 ERGEBNISSE

4.1 Bedeutung der KIR/HLA Liganden Inkompatibilität

Es konnte gezeigt werden, dass die KIR/HLA Ligandeninkompatibilität nach allogener Nierentransplantation bei definierten Rezeptor/Liganden Interaktionen zwischen Empfänger und Transplantat mit einer akuten zellulären Abstoßung assoziiert ist. Transplantate, die homozygot den HLA-C Liganden für den inhibitorischen Rezeptor KIR2DL1 exprimieren, zeigten einen besseren postoperativen Verlauf. Bei Patienten mit akuten Abstoßungsepisoden hingegen fehlte das KIR2DL1 Gen signifikant häufiger als in der Kontrollgruppe. Es konnte insgesamt eine signifikant geringere Anzahl inhibitorischer KIR Rezeptoren für Patienten detektiert werden, die eine akute Abstoßung innerhalb der ersten drei postoperativen Monate erlitten. Die Daten demonstrieren, dass die Präsenz der Rezeptoren KIR2DL2 und KIR2DS2 mit einem stabilen früh-postoperativen Verlauf einhergeht. Die Analyse korrespondierender KIR/HLA Liganden Interaktionen belegt die Assoziation einer signifikant höheren Anzahl an Matches für die Rezeptoren KIR2DL2/DS2 sowie einer signifikant höheren Anzahl an Mismatches für den inhibitorischen Rezeptor KIR2DL3 mit einer stabilen Transplantatfunktion. Die Daten dokumentieren die Bedeutung der KIR/HLA Ligandeninkompatibilität als möglichen früh-diagnostischen Prädiktor für das Transplantatüberleben nach allogener Nierentransplantation, indem definierte Rezeptor-Liganden Interaktionen mit akuter zellulärer Abstoßung assoziiert werden konnten.

4.2 Transplantatfunktion nach Spendertherapie mit Methylprednisolon

Die gezielte antiinflammatorische Vorbehandlung des hirntoten Organspenders mit Methylprednisolon im Sinne der so genannten Spendertherapie zeigte einen günstigen Einfluss auf den I/R Schaden und den Kurzzeitverlauf nach Lebertransplantation. Im Blut der behandelten Organspender wurden unmittelbar vor der Organentnahme signifikant niedrigere Serumkonzentrationen der löslichen Inflammationsmarker IL-2, IL-2R α , IL-6, und TNF α gemessen. Im Gegenzug stieg die Serumkonzentration der Chemokine IP-10 und MCP-1 beim unbehandelten Spender zu diesem Zeitpunkt an. Im Transplantat zeigte sich eine herabgesetzte mRNA Expression ausgewählter Inflammationsmarker der Adhäsion, Antigenpräsentation, Migration, Apoptose und Lymphozyteninfiltration nach immunmodulatorischer Spendertherapie im Vergleich zur Kontrollgruppe. Ein statistisch signifikanter Effekt konnte für CD68, CD80, DRB1, FasL, ICAM-1, IL-6, IP-10 und TNF α nachgewiesen werden. Definierte Serummarker für den I/R Schaden (Amino-Aspartat-Transferase und Alanin-Amino-Transferase), die Leberfunktion (Gesamtbilirubin) und eine potentielle Gallengangsverletzung (γ -Glutamyl-Transferase und Alkalische Phosphatase) waren innerhalb der ersten 10 postoperativen Tage bei Patienten mit antiinflammatorisch

vorbehandeltem Transplantat signifikant erniedrigt. Innerhalb der ersten 6 postoperativen Monate wurden Transplantate ohne spenderorientierte Steroidtherapie im Vergleich zur Kontrollgruppe signifikant häufiger und tendenziell schwerwiegender abgestoßen. Ebenso war das Gesamtbilirubin im Serum deutlich erhöht. Anhand dieser Ergebnisse wird der günstige Einfluss einer Spendertherapie mit Methylprednisolon auf das Transplantatüberleben im Kontext der Kadaverleberspende bestätigt. Dies gelang mithilfe ausgewählter Kandidatenmarker, welche signifikant eine Reduktion sowohl der Inflammation als auch des I/R Schadens widerspiegeln.

4.3 Effekte von ATG und Alemtuzumab auf NK-Zellen

In dieser Arbeit konnte an Patienten mit einer kombinierten Nieren-Pankreas Transplantation gezeigt werden, dass eine ATG Induktionstherapie neben der T-Zell Depletion auch zu einem rapiden Abfall der CD56⁺CD3⁻ NK-Zellen führt. Im Rahmen von weiterführenden *in vitro* Experimenten wurde anschließend der Wirkmechanismus von ATG und Alemtuzumab auf NK-Zellen genauer analysiert. Es konnte eine konzentrationsabhängige Bindung von ATG und Alemtuzumab an die Oberflächenantigene CD8 und CD16 (FcγRIIIa) beobachtet werden. Die Behandlung von NK-Zellen mit ATG oder Alemtuzumab führte zu einer signifikanten Reduktion ihrer Zytotoxizität, Degranulationskapazität und zur raschen Induktion der Apoptose bei den FcγRIIIa tragenden CD56^{dim} NK-Zellen. Im Gegensatz zu den Kontrollantikörpern wurde sowohl durch ATG als auch durch Alemtuzumab die IFN γ Antwort und Expression des granulären Oberflächenproteins CD107a bereits bei geringen Konzentrationen gegenüber der humanen Leukämiezelllinie K562 gehemmt. Von besonderer klinischer Bedeutung ist die Tatsache, dass NK-Zellen 10- bis 100-fach sensitiver auf die therapeutischen Antikörper reagieren als T- und B-Lymphozyten. Die Expression der Zytokine FasL, IFN γ und TNF α erfolgt nach externer Stimulation. Nach Inkubation mit ATG oder Alemtuzumab war eine konzentrationsabhängige, starke und hoch signifikante Induktion der mRNA von FasL, IFN γ und TNF α innerhalb der ersten Stunde zu beobachten, die sich nach sechs Stunden abschwächte. Dieser Effekt konnte für IFN γ und TNF α auf Proteinebene in den Zellkulturüberständen bestätigt werden. Durch die Generierung von Fc Fragmenten von ATG und Alemtuzumab konnte demonstriert werden, dass die Bindung des Fc Teils mit dem Rezeptor FcγRIIIa, der insbesondere auf CD56^{dim} NK-Zellen exprimiert wird, als einziges Signal ausreichend ist für die massive Sekretion inflammatorischer Zytokine, sowie die Induktion der Degranulation und der Apoptose. Die Annahme, dass die Funktionalität der NK-Zellen durch ATG und Alemtuzumab vielfältig beeinflusst wird, behauptete sich somit sowohl *in vivo* als auch *in vitro*. Die gewonnenen Erkenntnisse bezüglich des Einflusses dieser therapeutischen Antikörper auf NK-Zellen implizieren, dass bei der Dosisoptimierung und Weiterentwicklung der Immunsuppressiva zukünftig ein Fokus auch auf NK-Zellen liegen sollte.

5 DISKUSSION

Bei der allogenen Nierentransplantation wird die akute zelluläre Abstoßung des Transplantats von zytotoxischen T-Lymphozyten (CTLs) dominiert, was durch den Nachweis zytotoxischer Effektormoleküle in Biopsien bestätigt wird [LIPMAN et al. 1992; LIPMAN et al. 1994; PAVLAKIS et al. 1995; VASCONCELLOS et al. 1998]. Mehrere Untersuchungen befürworten jedoch trotz fehlenden direkten Nachweises eine Teilhabe alloreaktiver NK-Zellen am Transplantatüberleben. Man vermutet entsprechend der *Missing-self* Hypothese, dass NK-Zellen bei fehlender Expression körpereigener MHC Moleküle die Alloreaktivität herbeiführen [LJUNGGREN & KARRE 1990]. Ruggeri et al. zeigten erstmalig, dass es bei Empfängern einer Knochenmarktransplantation (KMT), deren HLA-Klasse I Epitope sich von denen des Spenders unterschieden, zu einer NK-Alloreaktivität der Spenderzellen gegen den Empfänger und somit unter anderem zum Schutz vor Graft-versus-Host Reaktion (GvHD) kommt [RUGGERI et al. 2002]. Humane NK-Zellen diskriminieren zwischen allelischen Varianten von MHC-Klasse I Molekülen über KIR Rezeptoren [MORETTA et al. 1996].

Die Ergebnisse der 1. Publikation demonstrieren insbesondere die Bedeutung der genomischen KIR/HLA-C Ligandeninkompatibilität für eine zelluläre Abstoßung nach Nierentransplantation. Transplantate, die homozygot HLA-C2 Antigene auf ihren Zellen exprimieren und somit eine potenzielle Bindung des korrespondierenden KIR2DL1 Rezeptors ermöglichen, korrelierten mit einer stabilen postoperativen Transplantatfunktion, was sich bei Patienten ohne akute Abstoßungsepisoden in einer erniedrigten Anzahl an Mismatches dieser Rezeptor/Liganden Interaktion widerspiegelte. Eine Interpretation basierend auf der Annahme, dass der inhibitorische KIR2DL1 Rezeptor und HLA-C2 verglichen mit der KIR2DL2/3 - HLA-C1 Interaktion eine stärkere Bindung eingehen und es dadurch zu einer verstärkten Hemmung der NK-Zellen kommt, wäre denkbar [FAN et al. 2001]. Insgesamt wurde eine signifikant niedrigere Anzahl inhibitorischer KIR Gene bei Patienten detektiert, bei welchen eine akute Abstoßung innerhalb der ersten drei postoperativen Monate nachgewiesen werden konnte. Besonders die Präsenz des inhibitorischen Rezeptores KIR2DL2 und dessen erfolgreiche Interaktion mit dem korrespondierenden HLA-C1 Epitop ließ sich mit einem stabilen früh-postoperativen Verlauf in Verbindung bringen. Ähnliche Beobachtungen konnten jedoch auch für den aktivierenden Rezeptor KIR2DS2 gemacht werden. Diese widersprüchlichen Resultate lassen sich teilweise dadurch erklären, dass aktivierende KIR Moleküle im Gegensatz zu den inhibitorischen KIR Molekülen bekannt dafür sind, schwächere Bindungen mit HLA Antigenen einzugehen [SAULQUIN et al. 2003], was bereits in Affinitätsmessungen untersucht wurde [WINTER et al. 1998; KHAKOO et al. 2004; CARRINGTON et al. 2005; PARHAM 2005]. Möglicherweise erhöht ein Ungleichgewicht zwischen aktivierenden und inhibitorischen Rezeptoren die

Wahrscheinlichkeit akuter Rejektionsepisoden. Die Ergebnisse dieser genetischen Analyse sollten in weiterführenden Studien hinsichtlich der funktionellen Aspekte einzelner Rezeptor-Liganden Interaktionen überprüft werden, um die Bedeutung des KIR Genotyps für das Transplantatüberleben weiter zu definieren.

Die Auswirkung des Hirntods, und somit des I/R Schadens, auf das Transplantat zeichnet sich durch den Anstieg der Transaminasen im Serum, Vakuolisierung und Nekrotisierung der Hepatozyten ab, sowie durch eine sinusoidale Minderperfusion mit reduziertem Gallefluss [OKAMOTO et al. 2000; VAN DER HOEVEN et al. 2001]. Neben der direkten Organschädigung führt die Induktion von Zytokinen, endothelialen Antigenen und Adhäsionsmolekülen zu einer erhöhten Empfindlichkeit gegenüber dem I/R Schaden, der Alloreaktivität und letztendlich zur chronischen Transplantatdysfunktion [SCHUURS et al. 2004].

Im Rahmen der 2. Publikation wurde die Möglichkeit untersucht, eine Verringerung der Hirntod-assoziierten Immunantwort durch die gezielte Organspendervorbehandlung mit Methylprednisolon zu erreichen. Dieses Konzept überzeugte bereits in klinischen und tierexperimentellen Studien zur Nierentransplantation. Nach erfolgter Spendertherapie konnte seltener eine verzögerte Funktionsaufnahme des Transplantats beobachtet, und eine verbesserte Nierenfunktion durch rasch sinkende Serumkreatinin Spiegel erfasst werden. [SCHNUELLE et al. 1999 & 2004].

Gewebeständige Kupffer Zellen der Leber spielen eine entscheidende Rolle bei der Entwicklung des Reperfusionsschadens [BREMER et al. 1994]. Intravitalmikroskopische Untersuchungen nach Transplantation zeigten eine Aktivierung der Kupffer Zellen, welche unter anderem mit einer massiven Freisetzung der proinflammatorischen Mediatoren IL-1, IL-6 und TNF α korrelierte [POST et al. 1992; BREMER et al. 1994]. Die antiinflammatorische Vorbehandlung der Organspender mit Methylprednisolon resultierte in einer signifikanten Downregulierung von CD68, CD80, DRB1, FasL, ICAM-1, IL-6, IP-10 und TNF α , sowie erniedrigten Serumkonzentrationen der löslichen Inflammationsmarker IL-2, IL-2R α , IL-6 und TNF α . Die Daten bestätigen den in experimentellen Studien vermuteten günstigen Einfluss einer spenderorientierten Steroidtherapie, was sich auch im klinischen Verlauf unter anderem durch seltener auftretende Abstoßungsreaktionen zeigte. Vorrangig Empfänger marginaler Spenderlebern könnten von einer Verbesserung der Transplantatqualität durch eine Spendertherapie mit Methylprednisolon profitieren.

Obwohl die T-Zell depletierenden Eigenschaften von ATG mittlerweile gut dokumentiert sind, existieren derzeit nur unzureichende Daten über den Einfluss auf NK-Zellen. Im Rahmen der 3. Publikation konnte gezeigt werden, dass eine ATG Induktionstherapie bei Patienten nach

kombinierter Nieren-Pankreas Transplantation zu einer signifikanten Abnahme der CD56⁺CD3⁻ NK-Zellen führte. Diese negative Beeinflussung der NK-Zellen durch ATG ist klinisch bedeutsam, da NK-Zellen zur Bekämpfung von opportunistischen Virusinfektionen und Tumorerkrankungen von großer Bedeutung sind, die als Komplikationen langzeitiger Immunsuppression auftreten können [SCHEINBERG et al. 2007].

Mit Hilfe von *in vitro* Experimenten wurde die Bindung von ATG und Alemtuzumab an NK-Zell-spezifische und -unspezifische Oberflächenmarker untersucht. Dabei konnte die erstmalig von Wing et al. beschriebene konzentrationsabhängige Bindung von ATG und Alemtuzumab an den Rezeptor FcγRIIIα bestätigt werden [BONNEFOY-BERARD et al. 1991; WING et al. 1996]. In der vorliegenden Arbeit wurde nun demonstriert, dass allein die Bindung des IgG1 Fc-Fragments von ATG oder Alemtuzumab an den FcγRIIIα signifikant die Zytokinfreisetzung und Degranulation reduziert und darüber hinaus die Apoptose induziert, ohne dass hierfür ein Tumorzellkontakt nötig zu sein scheint. Im klinischen Alltag erreichen die ATG Spitzenwerte im Serum zwischen 60-100µg/ml über 5-7 Tage nach Induktionstherapie [GUTTMANN et al. 1997; REGAN et al. 2001]. Die *in vitro* Vorbehandlung von NK-Zellen mit ATG und Alemtuzumab führte bereits bei einer minimalen Konzentration von 0,1µg/ml zu einer signifikant reduzierten Aktivität gegenüber Tumorzellen bei den FcγRIIIα tragenden CD56^{dim} NK-Zellen. Dieses Ergebnis suggeriert, dass möglicherweise auch *in vivo* geringere Dosierungen als bisher für einen gezielten Angriff auf NK-Zellen ausreichend sind.

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 mitunter gekennzeichnet durch sehr hohe Serumkonzentrationen von IFNγ und TNFα, die sich wenige Stunden nach Therapiebeginn einstellen [MOREAU et al. 1996; GUTTMANN et al. 1997]. Nach der Stimulation von Vollblut mit Fc-Teilen und intakten Antikörpern war im Gegensatz zu den Analysen der isolierten NK-Zellen die Zytokininduktion von FasL, IFNγ und TNFα stark erhöht. Aufgrund dieses Ergebnisses sollte in Betracht gezogen werden, dass gegebenenfalls weitere CD16⁺ Zellpopulationen, wie beispielsweise Monozyten, durch die Fc-Teile von ATG und Alemtuzumab aktiviert werden [BELGE et al. 2002].

Zusammengefasst wurde mit den vorliegenden Arbeiten gezeigt, dass neue, definierte Kandidatenmarker ein individuelles Monitoring im Rahmen der soliden Organtransplantation erlauben. Die genomische Analyse der KIR/HLA Ligandeninkompatibilität könnte bereits präoperativ eine Evaluierung des Rejektionsrisikos unterstützen. Die Befunde dokumentieren, dass sich zur Bestimmung der Qualität marginaler Spenderorgane nach Methylprednisolontherapie ausgewählte Marker des Ischämie/Reperfusionsschadens und der

Inflammation anbieten. Außerdem implementieren die Ergebnisse, dass eine Berücksichtigung der NK-Zellen im Rahmen der immunsuppressiven Therapie mit ATG und Alemtuzumab von Bedeutung sein könnte.

6 LITERATUR

- AUSTYN JM (1992). "Antigen uptake and presentation by dendritic leukocytes." Semin Immunol **4**(4): 227-36.
- BELGE KU, DAYYANI F, HORELT A, SIEDLAR M, FRANKENBERGER M, FRANKENBERGER B, ESPEVIK T und ZIEGLER-HEITBROCK L (2002). "The proinflammatory CD14+CD16+DR++ monocytes are a major source of TNF." J Immunol **168**(7): 3536-42.
- BONNEFOY-BERARD N, VINCENT C und REVILLARD JP (1991). "Antibodies against functional leukocyte surface molecules in polyclonal antilymphocyte and antithymocyte globulins." Transplantation **51**(3): 669-73.
- BRAUWEILER A, TAMIR I, DAL PORTO J, BENSCHOP RJ, HELGASON CD, HUMPHRIES RK, FREED JH und CAMBIER JC (2000). "Differential regulation of B cell development, activation, and death by the src homology 2 domain-containing 5' inositol phosphatase (SHIP)." J Exp Med **191**(9): 1545-54.
- BREMER C, BRADFORD BU, HUNT KJ, KNECHT KT, CONNOR HD, MASON RP und THURMAN RG (1994). "Role of Kupffer cells in the pathogenesis of hepatic reperfusion injury." Am J Physiol **267**(4 Pt 1): G630-6.
- BUGGINS AG, MUFTI GJ, SALISBURY J, CODD J, WESTWOOD N, ARNO M, FISHLOCK K, PAGLIUCA A und DEVEREUX S (2002). "Peripheral blood but not tissue dendritic cells express CD52 and are depleted by treatment with alemtuzumab." Blood **100**(5): 1715-20.
- CARRINGTON und NORMAN P (2003). KIR gene cluster. National Library of Medicine (US) National Center for Biotechnology Information.
- CARRINGTON, WANG S, MARTIN MP, GAO X, SCHIFFMAN M, CHENG J, HERRERO R, RODRIGUEZ AC, KURMAN R, MORTEL R, SCHWARTZ P, GLASS A und HILDESHEIM A (2005). "Hierarchy of resistance to cervical neoplasia mediated by combinations of killer immunoglobulin-like receptor and human leukocyte antigen loci." J Exp Med **201**(7): 1069-75.
- EUROTRANSPLANT. "Annual Report 2008". Eurotransplant International Foundation. http://www.eurotransplant.nl/files/annual_report/ar_2008.pdf.
- FAN QR, LONG EO und WILEY DC (2001). "Crystal structure of the human natural killer cell inhibitory receptor KIR2DL1-HLA-Cw4 complex." Nat Immunol **2**(5): 452-60.
- GALANDRINI R, TASSI I, MORRONE S, LANFRANCONE L, PELICCI P, PICCOLI M, FRATI L und SANTONI A (2001). "The adaptor protein shc is involved in the negative regulation of NK cell-mediated cytotoxicity." Eur J Immunol **31**(7): 2016-25.

-
- GENZYME (2009). "Thymoglobulin package insert." Genzyme Corporation Cambridge, MA USA.
- GUMPERZ JE, LITWIN V, PHILLIPS JH, LANIER LL und PARHAM P (1995). "The Bw4 public epitope of HLA-B molecules confers reactivity with natural killer cell clones that express NKB1, a putative HLA receptor." J Exp Med **181**(3): 1133-44.
- GUTTMANN RD, CAUDRELIER P, ALBERICI G und TOURAINE JL (1997). "Pharmacokinetics, foreign protein immune response, cytokine release, and lymphocyte subsets in patients receiving thymoglobuline and immunosuppression." Transplant Proc **29**(7A): 24S-26S.
- KHAKOO SI, THIO CL, MARTIN MP, BROOKS CR, GAO X, ASTEMBORSKI J, CHENG J, GOEDERT JJ, VLAHOV D, HILGARTNER M, COX S, LITTLE AM, ALEXANDER GJ, CRAMP ME, O'BRIEN SJ, ROSENBERG WM, THOMAS DL und CARRINGTON M (2004). "HLA and NK cell inhibitory receptor genes in resolving hepatitis C virus infection." Science **305**(5685): 872-4.
- LIPMAN ML, STEVENS AC, BLEACKLEY RC, HELDERMAN JH, MCCUNE TR, HARMON WE, SHAPIRO ME, ROSEN S und STROM TB (1992). "The strong correlation of cytotoxic T lymphocyte-specific serine protease gene transcripts with renal allograft rejection." Transplantation **53**(1): 73-9.
- LIPMAN ML, STEVENS AC und STROM TB (1994). "Heightened intragraft CTL gene expression in acutely rejecting renal allografts." J Immunol **152**(10): 5120-7.
- LJUNGGREN HG und KARRE K (1990). "In search of the 'missing self': MHC molecules and NK cell recognition." Immunol Today **11**(7): 237-44.
- LOPEZ M, CLARKSON MR, ALBIN M, SAYEGH MH und NAJAFIAN N (2006). "A novel mechanism of action for anti-thymocyte globulin: induction of CD4+CD25+Foxp3+ regulatory T cells." J Am Soc Nephrol **17**(10): 2844-53.
- MCNERNEY ME, LEE KM, ZHOU P, MOLINERO L, MASHAYEKHI M, GUZIOR D, SATTAR H, KUPPIREDDI S, WANG CR, KUMAR V und ALEGRE ML (2006). "Role of natural killer cell subsets in cardiac allograft rejection." Am J Transplant **6**(3): 505-13.
- MOREAU T, COLES A, WING M, THORPE J, MILLER D, MOSELEY I, ISSACS J, HALE G, CLAYTON D, SCOLDING N, WALDMANN H und COMPSTON A (1996). "CAMPATH-IH in multiple sclerosis." Mult Scler **1**(6): 357-65.
- MORETTA A, BOTTINO C, PENDE D, TRIPODI G, TAMBUSI G, VIALE O, ORENTO A, BARBARESI M, MERLI A, CICCONE E und ET AL. (1990). "Identification of four subsets of human CD3-CD16+ natural killer (NK) cells by the expression of clonally distributed functional surface molecules: correlation between subset assignment of NK clones and ability to mediate specific alloantigen recognition." J Exp Med **172**(6): 1589-98.

-
- MORETTA A, BOTTINO C, VITALE M, PENDE D, BIASSONI R, MINGARI MC und MORETTA L (1996). "Receptors for HLA class-I molecules in human natural killer cells." Annu Rev Immunol **14**: 619-48.
- NAUJOKAT C, BERGES C, FUCHS D, SADEGHI M, OPELZ G und DANIEL V (2007). "Antithymocyte globulins suppress dendritic cell function by multiple mechanisms." Transplantation **83**(4): 485-97.
- OKAMOTO S, CORSO CO, LEIDERER R, RASCHER W, YAMAMOTO Y, YAMAOKA Y und MESSMER K (2000). "Role of hypotension in brain-death associated impairment of liver microcirculation and viability." Transpl Int **13**(6): 428-35.
- PARHAM P (2005). "MHC class I molecules and KIRs in human history, health and survival." Nat Rev Immunol **5**(3): 201-14.
- PAVLAKIS M, LIPMAN ML und STROM TB (1995). "Intragraft T cell receptor transcript expression in human renal allografts." J Am Soc Nephrol **6**(2): 281-5.
- POST S, GONZALEZ AP, PALMA P, RENTSCH M, STIEHL A und MENGER MD (1992). "Assessment of hepatic phagocytic activity by in vivo microscopy after liver transplantation in the rat." Hepatology **16**(3): 803-9.
- PRATSCHKE J, WILHELM MJ, LASKOWSKI I, KUSAKA M, PAZ D, TULLIUS SG, NEUHAUS P, HANCOCK WW und TILNEY NL (2001). "The influence of donor brain death on long-term function of renal allotransplants in rats." Transplant Proc **33**(1-2): 693-4.
- REGAN JF, LYONNAIS C, CAMPBELL K, SMITH LV und BUELOW R (2001). "Total and active thymoglobulin levels: effects of dose and sensitization on serum concentrations." Transpl Immunol **9**(1): 29-36.
- REMBERGER M, ASCHAN J, BARKHOLT L, TOLLEMAR J und RINGDEN O (2001). "Treatment of severe acute graft-versus-host disease with anti-thymocyte globulin." Clin Transplant **15**(3): 147-53.
- RUGGERI L, CAPANNI M, URBANI E, PERRUCCIO K, SHLOMCHIK WD, TOSTI A, POSATI S, ROGAIA D, FRASSONI F, AVERSA F, MARTELLI MF und VELARDI A (2002). "Effectiveness of donor natural killer cell alloreactivity in mismatched hematopoietic transplants." Science **295**(5562): 2097-100.
- SAULQUIN X, GASTINEL LN und VIVIER E (2003). "Crystal structure of the human natural killer cell activating receptor KIR2DS2 (CD158j)." J Exp Med **197**(7): 933-8.
- SCHEINBERG P, FISCHER SH, LI L, NUNEZ O, WU CO, SLOAND EM, COHEN JI, YOUNG NS und JOHN BARRETT A (2007). "Distinct EBV and CMV reactivation patterns following antibody-based immunosuppressive regimens in patients with severe aplastic anemia." Blood **109**(8): 3219-24.

-
- SCHNUELLE P, LORENZ D, MUELLER A, TREDE M und VAN DER WOUDE FJ (1999). "Donor catecholamine use reduces acute allograft rejection and improves graft survival after cadaveric renal transplantation." Kidney Int **56**(2): 738-46.
- SCHNUELLE P, YARD BA, BRAUN C, DOMINGUEZ-FERNANDEZ E, SCHAUB M, BIRCK R, STURM J, POST S und VAN DER WOUDE FJ (2004). "Impact of donor dopamine on immediate graft function after kidney transplantation." Am J Transplant **4**(3): 419-26.
- SCHUURS TA, GERBENS F, VAN DER HOEVEN JA, OTTENS PJ, KOOI KA, LEUVENINK HG, HOFSTRA RM und PLOEG RJ (2004). "Distinct transcriptional changes in donor kidneys upon brain death induction in rats: insights in the processes of brain death." Am J Transplant **4**(12): 1972-81.
- SEINO KI, FUKAO K, MURAMOTO K, YANAGISAWA K, TAKADA Y, KAKUTA S, IWAKURA Y, VAN KAER L, TAKEDA K, NAKAYAMA T, TANIGUCHI M, BASHUDA H, YAGITA H und OKUMURA K (2001). "Requirement for natural killer T (NKT) cells in the induction of allograft tolerance." Proc Natl Acad Sci U S A **98**(5): 2577-81.
- VAN DER HOEVEN JA, LINDELL S, VAN SCHILFGAARDE R, MOLEMA G, TER HORST GJ, SOUTHARD JH und PLOEG RJ (2001). "Donor brain death reduces survival after transplantation in rat livers preserved for 20 hr." Transplantation **72**(10): 1632-6.
- VASCONCELLOS LM, SCHACHTER AD, ZHENG XX, VASCONCELLOS LH, SHAPIRO M, HARMON WE und STROM TB (1998). "Cytotoxic lymphocyte gene expression in peripheral blood leukocytes correlates with rejecting renal allografts." Transplantation **66**(5): 562-6.
- WING MG, MOREAU T, GREENWOOD J, SMITH RM, HALE G, ISAACS J, WALDMANN H, LACHMANN PJ und COMPSTON A (1996). "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 **98**(12): 2819-26.
- WINTER CC, GUMPERZ JE, PARHAM P, LONG EO und WAGTMANN N (1998). "Direct binding and functional transfer of NK cell inhibitory receptors reveal novel patterns of HLA-C allotype recognition." J Immunol **161**(2): 571-7.

7 AUSGEWÄHLTE PUBLIKATIONEN UND ANTEILSERKLÄRUNG

Frau Kristina Kunert hat ihre experimentelle kumulative Doktorarbeit mit dem Thema "Molekulare Kandidatenmarker und ihre Bedeutung für das Transplantatüberleben nach allogener Organtransplantation" angefertigt. Grundlage für die kumulative Promotion sind folgende drei Publikationen:

Publikation 1

KUNERT K, SEILER M, MASHREGHI MF, KLIPPERT K, SCHONEMANN C, NEUMANN K, PRATSCHKE J, REINKE P, VOLK HD and KOTSCH K (2007). "KIR/HLA ligand incompatibility in kidney transplantation." *Transplantation* 84(11): 1527-33.

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

Publikation 2

KOTSCH K, ULRICH F, REUTZEL-SELKE A, PASCHER A, FABER W, WARNICK P, HOFFMAN S, FRANCUSKI M, KUNERT K, KUECUEK O, SCHUMACHER G, WESSLAU C, LUN A, KOHLER S, WEISS S, TULLIUS SG, NEUHAUS P and PRATSCHKE J (2008). "Methylprednisolone therapy in deceased donors reduces inflammation in the donor liver and improves outcome after liver transplantation: a prospective randomized controlled trial." *Ann Surg* 248(6): 1042-50.

Frau Kunert führte einen großen Teil der RT-PCR Analysen für die Publikation durch. Beitrag: 15%

Publikation 3

STAUCH D, DERNIER A, SARMIENTO MARCHESE E, KUNERT K, VOLK HD, PRATSCHKE J and KOTSCH K (2009). "Targeting of natural killer cells by rabbit antithymocyte globulin and campath-1H: similar effects independent of specificity." *PLoS One* 4(3): e4709.

Frau Kunert trug einige Experimente zur Publikation bei und beteiligte sich maßgeblich an der Diskussion bei der Entstehung der Publikation. Beitrag: 10%

8 DREI PUBLIKATIONEN ALS PROMOTIONSLEISTUNG

Publikation 1

KUNERT K, SEILER M, MASHREGHI MF, KLIPPERT K, SCHONEMANN C, NEUMANN K, PRATSCHKE J, REINKE P, VOLK HD and KOTSCH K (2007). "KIR/HLA ligand incompatibility in kidney transplantation." *Transplantation* 84(11): 1527-33.

Publikation 2

KOTSCH K, ULRICH F, REUTZEL-SELKE A, PASCHER A, FABER W, WARNICK P, HOFFMAN S, FRANCUSKI M, KUNERT K, KUECUEK O, SCHUMACHER G, WESSLAU C, LUN A, KOHLER S, WEISS S, TULLIUS SG, NEUHAUS P and PRATSCHKE J (2008). "Methylprednisolone therapy in deceased donors reduces inflammation in the donor liver and improves outcome after liver transplantation: a prospective randomized controlled trial." Ann Surg 248(6): 1042-50.

Publikation 3

STAUCH D, DERNIER A, SARMIENTO MARCHESI E, KUNERT K, VOLK HD, PRATSCHKE J and KOTSCH K (2009). "Targeting of natural killer cells by rabbit antithymocyte globulin and campath-1H: similar effects independent of specificity." PLoS One 4(3): e4709.

9 LEBENSLAUF

Der Lebenslauf ist in der Online-Version aus Gründen des Datenschutzes nicht enthalten.

10 VOLLSTÄNDIGE PUBLIKATIONSLISTE

Originalarbeiten

STAUCH D, DERNIER A, SARMIENTO MARCHESE E, KUNERT K, VOLK HD, PRATSCHKE J and KOTSCH K (2009). "Targeting of natural killer cells by rabbit antithymocyte globulin and campath-1H: similar effects independent of specificity." *PLoS One* 4(3): e4709.

KOTSCH K, ULRICH F, REUTZEL-SELKE A, PASCHER A, FABER W, WARNICK P, HOFFMAN S, FRANCUSKI M, KUNERT K, KUECUEK O, SCHUMACHER G, WESSLAU C, LUN A, KOHLER S, WEISS S, TULLIUS SG, NEUHAUS P and PRATSCHKE J (2008). "Methylprednisolone therapy in deceased donors reduces inflammation in the donor liver and improves outcome after liver transplantation: a prospective randomized controlled trial." *Ann Surg* 248(6): 1042-50.

KUNERT K, SEILER M, MASHREGHI MF, KLIPPERT K, SCHONEMANN C, NEUMANN K, PRATSCHKE J, REINKE P, VOLK HD and KOTSCH K (2007). "KIR/HLA ligand incompatibility in kidney transplantation." *Transplantation* 84(11): 1527-33.

Tagungsbeiträge

2007

KOTSCH K, MERCK V, KUNERT K, REUTZEL-SELKE A, PASCHER A, VOLK H, NEUHAUS P and PRATSCHKE J. "Identification of molecular candidate marker in zero kidney biopsies are indicative for graft quality." *37. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Immunologie* (05.-08.09.2007), Heidelberg.

KOTSCH K, REUTZEL-SELKE A, PASCHER A, MERCK V, KUNERT K, VOLK H, NEUHAUS P and PRATSCHKE J. "Gene expression of zero hour kidney biopsies might indicate graft quality." *13th Congress of the European Society for Organ Transplantation* (30.09.-03.10.2007), Prag.

KLIPPERT K, HRIBOVA P, BRABCOVA I, SLAVCEV A, BARTOSOVA K, VIKLICK Y, KUNERT K, VOLK H and KOTSCH K. "Monitoring of Killer-Cell Immunoglobulin-Like Receptor Expression Following Renal Transplantation." *13th Congress of the European Society for Organ Transplantation* (30.09.-03.10.2007), Prag.

KOTSCH K, KUNERT K, SCHÖNEMANN C, VOLK H, NEUHAUS R, JONAS S, PASCHER A, WENZEL C, NEUHAUS P and PRATSCHKE J. "The Impact of KIR/HLA Ligand Incompatibility on Acute Rejection Episodes After Liver Transplantation." *13th Congress of the European Society for Organ Transplantation* (30.09.-03.10.2007), Prag.

2006

KUNERT K, SCHOENEMANN C, SEILER M, NEUHAUS R, NEUHAUS P, VOLK H, PRATSCHKE J and KOTSCH K. "Untersuchungen zum Einfluss des KIR-Polymorphismus auf die solide Organtransplantation." *15. Jahrestagung der Deutschen Transplantationsgesellschaft* (19.-21.10.2006), München.

KUNERT K, SCHOENEMANN C, SEILER M, NEUHAUS R, NEUHAUS P, VOLK H, PRATSCHKE J und KOTSCH K (2006). "Analysis of KIR/HLA incompatibility during acute rejection following orthotopic liver transplantation". *32nd Annual Meeting of the American Society for Histocompatibility and Immunogenetics* (16.-20.10.2006), San Diego, Human Immunology.67 (Suppl 1):99.

KUNERT K, SCHOENEMANN C, SEILER M, NEUHAUS R, NEUHAUS P, VOLK H, PRATSCHKE J und KOTSCH K. "Einfluss des KIR/HLA Mismatches auf die akute Abstoßungsreaktion nach solider Organtransplantation". *17. Tagung der Deutschen Gesellschaft für Immunogenetik* (11.-14.10.2006), Innsbruck.

KUNERT K, SCHOENEMANN C, SEILER M, NEUHAUS R, NEUHAUS P, VOLK H, PRATSCHKE J und KOTSCH K. "The Impact of KIR/HLA Ligand Incompatibility on Acute Rejection Episodes Following Liver Transplantation". *17th European Students' Conference* (08.-12.10.2006), Berlin.

11 SELBSTÄNDIGKEITSERKLÄRUNG

Hiermit erkläre ich, Kristina Kunert, an Eides Statt, dass diese Dissertation von mir selbst und ohne die unzulässige Hilfe Dritter verfasst wurde, dass die Dissertation auch in Teilen keine Kopie anderer Arbeiten darstellt und die benutzten Hilfsmittel sowie die Literatur vollständig an entsprechender Stelle in der Arbeit angegeben sind.

Datum

Unterschrift

12 DANKSAGUNG

Mein Dank gilt Herrn Univ.-Prof. Dr. Johann Pratschke, Direktor der Universitätsklinik für Visceral-, Transplantations- und Thoraxchirurgie in Innsbruck. Ich danke Ihnen für die umfassende Betreuung beim Verfassen dieser Arbeit, besonders jedoch für die zahlreichen Gespräche, die mich persönlich sehr bereichert haben.

Von Herzen bedanke ich mich bei meiner wunderbaren Betreuerin Frau Prof. Dr. Katja Kotsch, Leiterin der AG Transplantationsimmunologie am Institut für Medizinische Immunologie der Charité – Universitätsmedizin Berlin. Du warst mir von Anfang an ein Vorbild und eine ehrliche Beraterin. Vielen Dank für deine bedingungslose Unterstützung!

Ich danke meiner Arbeitsgruppe: Diana Stauch, Katrin Göldner, Jens Dinter, Cam-Tien Le und Annelie Dernier für die intensiven Jahre im Labor, die herzliche Atmosphäre und die fachliche Kompetenz. Insbesondere dir, Anne, danke ich für die Stunden in Sankt Petersburg, Moskau und Paris.

Frau Dr. Constanze Schönemann, Leiterin des Labors für Gewebetypisierung am Institut für Transfusionsmedizin der Charité – Universitätsmedizin Berlin und allen technischen Assistentinnen danke ich für die geduldige Hilfe bei der HLA-Typisierung und die Bereitstellung sämtlicher Materialien.

Unaussprechlicher Dank gebührt meiner Familie, besonders meiner Schwester Alexandra. Ihr seid mein zu Hause.