

Aus der Klinik für Allgemein-, Viszeral- und Transplantationschirurgie  
und dem Institut für Medizinische Immunologie  
der Medizinischen Fakultät Charité – Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

Untersuchungen zum Einfluss von Thymoglobulin auf  
Lymphozyten-Populationen nach solider Organtransplantation

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

vorgelegt der Medizinischen Fakultät  
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Götz-Christian Melloh

aus Hannover

Gutachter: 1. Prof. Dr. med. J. Pratschke  
2. Prof. Dr. med. T. Mittlmeier  
3. Prof. Dr. med. B. Watschinger

Datum der Promotion: 03.09.2010

# Abkürzungsverzeichnis

$\Delta$	delta
$\mu\text{g}$	Mikrogramm
$\mu\text{l}$	Mikroliter
Abb.	Abbildung
ADCC	Antibody-Dependent Cell-mediated Cytotoxicity
ALG	Anti-Lymphozyten-Globulin
ALS	Anti-Lymphozyten-Serum
APC	antigenpräsentierende Zelle
aR	akute Rejektion
ATG	Anti-Thymozyten-Globulin
bzw.	beziehungsweise
CBA	cytometric bead array
CD	cluster of differentiation
cDNA	complementary DNA
CMV	Cytomegalie-Virus
CNI	Calcineurin-Inhibitor
Ct	cycle of treshold
CTLA-4	cytotoxic T-lymphocyte antigen-4
Ct	cycle of threshold
CTL	zytotoxische T-Zelle
DDTx	Dünndarm-Transplantation
dest.	destilliert
DGF	delayed graft function
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxy-Ribonukleosidtriphosphat
DSO	Deutsche Stiftung Organtransplantation
EBV	Epstein-Barr-Virus
FACS	fluorescence-activated cell sorter
FCS	fetales Kälberserum
FITC	Fluoresceinisothiocyanat

---

FoxP3	forkhead box P3
FSC	forwardscatter
g	Erdbeschleunigung ( $g=9,81\text{m/s}^2$ )
GFR	glomeruläre Filtrationsrate
GITR	glucocorticoid-induced tumor necrosis factor receptor
GvHD	Graft-versus-Host-Disease
h	Stunde
HLA	Humanes-Leukozyten-Antigen
HPRT	Hypoxanthin-Guanin Phosphoribosyl Transferase
HWI	Harnwegsinfektion
ICAM-1	intercellular adhesion molecule-1
Ig	Immunglobulin
IFN	Interferon
IL	Interleukin
i.v.	intravenös
kDa	Kilodalton
KIZ	kalte Ischämiezeit
LFA-1	leukocyte function-associated antigen-1
m	männlich
mAb	monoklonale Antikörper
MACS	magnetic-activated cell sorting
mg	Milligramm
MHC	Major-Histokompatibilitätskomplex
min	Minute
ml	Milliliter
MLR	mixed lymphocyte reaction
MMF	Mycophenolat-Mofetil
mRNA	messenger RNA
NK-Zelle	natürliche Killerzelle
NTx	Nierentransplantation
OP	Operation
PBMCs	periphal blood mononuclear cells
PBS	phosphate buffered saline
PCR	Polymerase chain reaction

---

PE	Phycoerythrin
pg	Pikogramm
P/NTx	kombinierte Pankreas-Nieren Transplantation
p.o.	per os
PRA	panel-reaktive Antikörper
RT-PCR	real-time polymerase change reaction
p.T.	post Transplantation
PTLD	posttransplantation lymphoproliferative disorder
PTx	Pankreastransplantation
RNA	ribonucleic acid
RT	Raumtemperatur
RT-PCR	real-time polymerase-chain-reaction
Rx	Rejektion
SD	Standardabweichung
sec	Sekunde
SEM	standard error of mean
SSC	sidescatter
Tab.	Tabelle
Taq	Thermus aquaticus
TCR	T-Zell-Rezeptor
TNF	Tumornekrosefaktor
TGF	Transforming growth factor
Treg	regulatorische T-Zelle
VCAM-1	vascular cell adhesion molecule-1
w	weiblich

# Inhaltsverzeichnis

<b>1. Einleitung .....</b>	<b>9</b>
1.1 Transplantationen im Überblick.....	9
1.2 Abstoßungsreaktionen .....	11
1.2.1 Immunologische Risikofaktoren für Abstoßungsreaktionen.....	11
1.2.2 Abstoßungsreaktionen .....	13
1.2.3 Abstoßungsdiagnostik .....	14
1.3 (Basis-)Immunsuppressiva .....	17
1.3.1 Glukokortikoide .....	17
1.3.2 Calcineurin-Inhibitoren .....	18
1.3.3 Mycophenolat-Mofetil .....	19
1.4 Monoklonale Antikörper .....	20
1.4.1 Basiliximab (Anti CD25) .....	20
1.4.2 Campath (Anti CD52) .....	20
1.4.3 OKT3 (Anti CD3) .....	21
1.5 Polyklonale Antikörper (ATG) .....	21
1.6 T-Zell-Entwicklung und T-Zell Funktion .....	25
1.7 T-Zellen mit regulatorischer Eigenschaft.....	29
1.8 ATG und regulatorische T-Zellen .....	32
<b>2. Fragestellung .....</b>	<b>33</b>
<b>3. Material und Methoden.....</b>	<b>34</b>
3.1 Material .....	34
3.1.1 Geräte/ Software.....	34
3.1.2 Verbrauchsmaterial .....	35
3.1.3 Kits .....	35
3.1.4 Reagenzien .....	35
3.1.5 Antikörper (FACS).....	36

3.2	Patienten-Kollektiv.....	37
3.3	Immunsuppressive Medikation .....	39
3.4	Probenakquisition und Aufbereitung .....	40
3.5	„Magnetic-activated cell sorting“ (MACS).....	41
3.5.1	Grundlagen .....	41
3.5.2	Durchführung .....	41
3.6	Zellkultivierung mit Thymoglobulin.....	42
3.7	Durchflusszytometrie (FACS).....	42
3.7.1	Grundlagen .....	42
3.7.2	Durchführung .....	44
3.8	Zytokin-Analyse, CBA-Kit .....	45
3.9	Real-time RT-PCR .....	46
3.9.1	Grundlagen .....	46
3.9.2	Durchführung .....	47
3.10	Statistische Auswertung .....	49
<b>4. Ergebnisse .....</b>		<b>50</b>
4.1	Verlaufsbeobachtung der T-, B- und NK-Zellen nach immunsuppressiver Therapie mit Thymoglobulin .....	50
4.1.1	Exemplarische Darstellung der Lymphozytenverläufe Thymoglobulin-behandelter Patienten nach solider Organtransplantation.....	54
4.2	Verlaufsbeobachtung der T-, B- und NK-Zellen nach immunsuppressiver Standard-Therapie.....	57
4.2.1	Entwicklung der Lymphozyten-Populationen eines organtransplantierter Patienten unter Standard-Immunsuppression.....	59
4.3	Expansion von CD4+CD25+FoxP3+ T-Zellen nach Inkubation mit .....	61
	Thymoglobulin <i>in vitro</i> .....	61

4.4	Entwicklung der CD25+ T-Zellpopulation nach immunsuppressiver	62
	Therapie <i>in vivo</i> .....	62
4.4.1	Die CD25-Expression auf CD3+CD4+ T-Zellen nach Therapie mit	
	Thymoglobulin und Standard-Immunsuppression .....	62
4.4.2	Die Entwicklung von CD3+CD4+CD25+ <sup>high</sup> T-Zellen nach immunsuppressiver	
	Therapie am Beispiel ausgewählter Patienten.....	64
4.4.3	CD25 <sup>high</sup> und CD127 <sup>low</sup> T-Zellen expandieren nach der Administration von	
	Thymoglobulin .....	67
4.5	FoxP3-Expression in der real-time RT-PCR.....	72
4.6	IL-10 Level nach Administration von Thymoglobulin .....	73
<b>5. Diskussion.....</b>		<b>74</b>
5.1	Die Wirkung von Thymoglobulin <i>in vitro</i> .....	75
5.2	Die Wirkung von Thymoglobulin <i>in vivo</i> .....	75
5.3	Herkunft der regulatorischen T-Zellen.....	80
5.4	Die Dosierung von Thymoglobulin und dessen Zell-depletierender Effekt .....	84
5.5	Nebenwirkungsprofil polyklonaler Antikörper .....	86
5.6	Der Einfluss von Thymoglobulin auf das Langzeitüberleben – durch Induktion	
	regulatorischer T-Zellen.....	87
<b>6. Zusammenfassung .....</b>		<b>91</b>
<b>7. Literaturverzeichnis .....</b>		<b>92</b>
<b>8. Anhang .....</b>		<b>104</b>
8.1	Tabellen- und Abbildungsverzeichnis.....	104
8.2	Curriculum vitae.....	106
8.3	Publikationsliste .....	107
8.4	Selbstständigkeitserklärung.....	108
8.5	Danksagung.....	109

# 1. Einleitung

Der Gedanke der Organersatztherapie hat eine lange Tradition. Bereits im 17. Jahrhundert wurden Versuche unternommen, fremde Organe - oder Teile davon - auf andere Individuen zu übertragen. Allerdings waren diese Experimente anfänglich auf Transplantieren von Haut beschränkt. 1902 berichtete der Wiener Chirurg Emerich Ullmann über die erste erfolgreiche tierexperimentelle Nierentransplantation am Hund [1]. 1954 transplantierte Joseph E. Murray erstmals eine Niere zwischen eineiigen Zwillingen, gefolgt von der Nierentransplantation nach Lebendspende zwischen genetisch nicht identischen Brüdern [2, 3]. Mit der klinischen Einführung des Immunsuppressivums Azathioprin waren die Grundlagen für die Allotransplantation gelegt. Fortschritte in der immunsuppressiven Therapie durch Erlangen der Marktreife der Substanz Cyclosporin A, ließen Ende der 1970er Transplantationen zunehmend erfolgreicher verlaufen. Die Ergänzung immunsuppressiver Regime durch polyklonale Antikörper (ATG) konnte in den vergangenen zwei Jahrzehnten das akute Abstoßungsrisiko nach Transplantation zusätzlich verringern. Auch führte dies zu einer Verlängerung des Transplantatüberlebens, so dass die Indikation zur Transplantation heutzutage zunehmend weiter gefasst werden kann.

## 1.1 Transplantationen im Überblick

Nachdem im Jahr 1963 zum ersten Mal in Deutschland eine Nieren-Allotransplantation durch Wilhelm Brosig und Reinhard Nagel realisiert wurde [4], konnte bereits wenige Jahre später die weltweit erste erfolgreiche Pankreastransplantation beim Menschen von Kelly und Lillehei durchgeführt werden [5]. Die Entwicklung ging so weit, dass 20 Jahre später die Transplantation eines Dünndarms erfolgte. Der steigenden Anzahl durchgeführter solider Organtransplantationen steht jedoch ein weitaus größerer, nicht gedeckter Bedarf an Organen gegenüber. Nach Angaben der Deutschen Stiftung Organtransplantation (DSO) wurden im Jahre 2007 allein in Deutschland 4.885 Transplantationen durchgeführt. Der Großteil entfiel hierbei auf allogene Leichenspenden (4.251). Darunter befanden sich u.a. 2.340 Nieren-, 139 Pankreas- und kombinierte Pankreas-/Nieren- sowie fünf Dünndarmtransplantationen [6]. Dank der Verbesserung immunsuppressiver Strategien ist die Prognose für solide Organtransplantationen günstig. Dabei zeichnen sich erfolgreiche Transplantationen durch eine Zunahme an Lebensqualität bei gleichzeitiger Abnahme der Mortalität des Patienten aus.

Bei einer prinzipiell irreversiblen, terminalen Niereninsuffizienz gilt die Nierentransplantation (NTx) als Behandlungsmethode der Wahl. Die Dialysepflicht eines Patienten kann unterschiedlich begründet sein. Die häufigsten Ursachen für eine Niereninsuffizienz sind nach Angaben der „European Dialysis and Transplant Association“ in Tabelle 1 dargestellt.

Häufigste Ursachen der Niereninsuffizienz	in Prozent (%)
Glomerulonephritis	28
Pyelonephritis und andere interstitielle Krankheiten	17
Diabetische Nephropathien	10
Zystische Nierenerkrankungen	9
Renovaskuläre Erkrankungen	8
Systemische Erkrankungen	5

**Tab. 1: Häufigste Ursachen der Niereninsuffizienz [1]**

Die terminale Niereninsuffizienz kann u.a. durch die Grunderkrankung des Diabetes mellitus bedingt sein. Der Diabetes mellitus Typ1 ist eine sich meist im juvenilen Alter manifestierende Erkrankung. Der Insulinmangel und die daraus resultierenden Hyperglykämien führen langfristig zu diabetischen Mikro- und Makroangiopathien. Schädigungen zeigen sich in Form der diabetischen Nephro- und Retinopathie sowie der koronaren Herzkrankheit. Die kurative Therapie des Diabetes mellitus Typ1 kann durch die Pankreastransplantation (PTx) erfolgen. Nach Angabe des internationalen Pankreastransplantationsregisters ist bei dialysepflichtigen Patienten mit Diabetes mellitus Typ1 die simultane Pankreas-/Nierentransplantation (P/NTx) mit 78% die am häufigsten durchgeführte Art der PTx. Wesentlich seltener wird die PTx nach NTx registriert (16%), gefolgt von der alleinigen PTx mit 7% [7].

Eine Vielzahl von Darmerkrankungen, wie z.B. intestinale Fehlbildungen, Ganglionosen, Morbus Crohn oder Mesenterialinfarkte, erfordern im Therapieverlauf anteilige Dünndarmresektionen. Diese Resektionen können durch die Verminderung der Resorptionsoberfläche zu einem Kurzdarmsyndrom führen. Bei endgültigem funktionellem intestinalem Versagen erfordert dies eine lebenslängliche total parenterale Ernährung. Die langfristige Ernährung über die Vene führt aber unweigerlich zu Katheterinfektion bis hin zu Sepsis, Thrombosierung und Entwicklung von

---

Leberversagen [8]. Die Dünndarmtransplantation (DDTx) stellt die einzige kausale Therapie des Kurzdarmsyndroms dar [9].

Als Ausschlusskriterien für eine solide Organtransplantation gelten im Allgemeinen:

- maligne Erkrankungen
- schwere psychiatrische Störungen
- akute Infektionen
- fehlende Bereitschaft des Patienten zur Mitarbeit

Die Besonderheit bei Kandidaten für eine P/NTx ist, dass die Folgen der Makroangiopathie vor der Transplantation evaluiert werden müssen. Eine intensive kardiologische Diagnostik muss vor der Transplantation erfolgen. Eine periphere arterielle Verschlusskrankheit im Bereich der Beinarterien sowie stenotische Veränderungen im Bereich der Karotiden müssen ausgeschlossen werden.

Trotz Bemühens für jeden Empfänger ein geeignetes Spenderorgan zu finden, stellt sich die Frage nach den Grenzen heutiger moderner immunologischer Regime, die auch für Hoch-Risiko-Patienten eine erfolgsversprechende Transplantation gewährleisten können.

## **1.2 Abstoßungsreaktionen**

### **1.2.1 Immunologische Risikofaktoren für Abstoßungsreaktionen**

Die Risikofaktoren lassen sich in die Gruppe der antigenabhängigen – und antigenunabhängigen Faktoren einteilen. Der Einfluss von antigenabhängigen Faktoren führt zu Transplantatveränderungen, die durch die fortdauernde Konfrontation des Empfängerimmunsystems mit den Spender-Antigenen bedingt sind. Zu den die Transplantatfunktion und das -überleben beeinflussenden antigenabhängigen Faktoren zählen die Kompatibilität der Humanen-Leukozyten-Antigene (HLA-System), sowie die in Abhängigkeit von diesen auftretenden Rejektionsepisoden. Das HLA-System des Menschen umfasst ein komplexes System von Gewebeantigenen, die auf der Oberfläche aller kernhaltigen Körperzellen exprimiert werden. Eine sich auf dem kurzen Arm des Chromosoms 6 befindende Gruppe von Genen ist für die

Kodierung des HLA-Systems, auch Major-Histokompatibilitätskomplex (MHC) genannt, verantwortlich. Man unterscheidet zwischen HLA-Antigenen der Klassen I, II und III. Für die Transplantation bedeutsam sind die HLA-Antigene der Klasse I (HLA-A, -B und -C) und II (HLA-DR, -DP und -DQ). Die ersteren finden sich auf fast allen kernhaltigen Körperzellen. MHC-Klasse-II-Moleküle dagegen werden konstitutiv nur von B-Lymphozyten, Monozyten/Makrophagen und dendritischen Zellen exprimiert. Nach Aktivierung durch bestimmte Zytokine (Interferon- $\gamma$ ) können sich allerdings auch andere Zellen, wie Endothelzellen oder Fibroblasten zu antigenpräsentierenden Zellen (APCs) entwickeln. Aufgrund des genetischen Polymorphismus existiert eine große Anzahl verschiedener HLA-Phänotypen. Entscheidender, den Erfolg der Transplantation determinierender Faktor, ist die HLA-Kompatibilität zwischen Empfänger und Spenderorgan. Ist die Zahl der „HLA-Mismatches“ klein, zeigen sich vermindert Abstoßungsreaktionen; denn es sind die HLA-Antigene auf den Organzellen des Spenders, die die wichtigsten Auslöser einer gegen das Transplantat gerichteten Immunantwort des Empfängers darstellen [10].

Auch unspezifische, antigenunabhängige Faktoren auf Seite des Spenders können die Organqualität stark beeinträchtigen. So ist die Prognose für die Langzeitfunktion von Leichenspenderorganen im Vergleich zu der von Lebendspenderorganen bedeutend schlechter [11, 12]. Abgesehen von dem dominierenden Faktor „Hirntod“ werden unter den unspezifischen, antigenunabhängigen Faktoren folgende Größen zusammengefasst:

- Spenderalter
- Erkrankungen des Spenders
- prolongierte Ischämiezeit
- chirurgische Manipulation
- Reperfusionsschäden

Ferner kann der Verlauf nach geglückter Organtransplantation von Virusinfektionen des Empfängers (z.B. Cytomegalie-Virus-Infektion des Transplantats) und zytotoxischen Schädigungen durch die lebenslang andauernde Immunsuppression geprägt sein. So konnte z.B. durch Serón et al. [13] gezeigt werden, dass eine Calcineurin-Inhibitor-freie immunsuppressive Therapie die Transplantatfunktion positiv beeinflusst.

## 1.2.2 Abstoßungsreaktionen

Klinisch können Abstoßungsreaktionen in erster Linie nach dem Zeitpunkt ihres Auftretens klassifiziert werden. Der einer Rejektion zugrunde liegende Mechanismus erlaubt die Einteilung in hyperakute, akute und chronische Rejektion.

Hyperakute Abstoßungen treten innerhalb von Minuten bis Stunden nach Transplantation auf und führen in der Regel zum sofortigen irreversiblen Organverlust. Ursache sind zytotoxische Antikörper der Immunglobulin-Klassen M (IgM) und G (IgG), die gegen die AB0- oder die Humanen-Leukozyten-Antigene des Spenders gerichtet sind. Eine vorangegangene Sensibilisierung kann zur Bildung dieser präformierten, panel-reaktiven Antikörper (PRA) führen. Ausgelöst wird diese z.B. durch frühere Transplantationen, Bluttransfusionen oder Schwangerschaften. Es kommt zur Aktivierung des Komplementsystems mit folgender Fibrinablagerung in den Gefäßen. Unter Thrombenbildung infiltrieren polymorphkernige Lymphozyten das Spenderorgan. Die Perfusion des Organs ist nicht länger gewährleistet – es kommt zur ischämischen Organ-Nekrotisierung. In der Klinik können hyperakute Abstoßungskrisen durch „cross-matching“ des Empfängerserums auf die Anwesenheit von zytotoxischen Spender-Antikörpern größtenteils verhindert werden. Dem Antikörpersuchtest kommt dabei eine entscheidende Bedeutung bei der Bestimmung des PRA-Levels zu. Eine wachsende Anzahl potentieller Organ-Empfänger weist jedoch eine Sensibilisierung aufgrund ebendieser zytotoxischen Antikörper gegen körperfremde Leukozyten auf, so dass neue immunsuppressive Strategien in Erwägung gezogen werden müssen. Hierzu zählt die Induktionstherapie mit poly- und monoklonalen Antikörpern [14].

Die akute Abstoßung beginnt zwischen den ersten Tagen bis Wochen nach Transplantation und wird vor allem von alloantigenspezifischen T-Lymphozyten verursacht. Mechanismen auf zellulärer Ebene scheinen hierbei eine entscheidende Rolle zu spielen – im Gegensatz zu jenen maßgeblich bei der hyperakuten Rejektion beteiligten humoralen Mechanismen. Die akute Abstoßungsreaktion wird ausgelöst durch die Alloantigenerkennung der empfangereigenen T-Lymphozyten, die als Folge dieses Kontaktes eine komplexe Kaskade von Effektormechanismen hervorruft. Eine wesentliche Rolle spielen dabei Interleukine, die der Signalübermittlung von aktivierten Lymphozyten zu weiteren Abwehrzellen dienen. Histologisch kommt es bei der akuten Abstoßung zu einer massiven Infiltration von mononukleären Empfängerzellen in das Transplantat, welche schließlich zu einer Endothelschädigung des Organs führt. Beteiligt sind

neben den T-Lymphozyten auch Monozyten, Makrophagen, Natürliche Killerzellen und B-Zellen. Akute Rejektionskrisen lassen sich noch Jahre nach Transplantation beobachten. Sie korrelieren mit einer hohen Inzidenz für chronische Abstoßungsvorkommnisse und einer verkürzten Langzeitfunktion des Transplantats [15, 16].

Die chronische Abstoßungsreaktion stellt die Hauptursache für einen späten Transplantatverlust dar. Antigenabhängige und antigenunabhängige Faktoren scheinen hierbei involviert zu sein. Die chronische Rejektion tritt Monate bis Jahre nach Transplantation auf. Unabhängig vom Organ ist dieser Rejektionstyp histologisch charakterisiert durch einen leichten Entzündungsprozess in der Peripherie der Gefäße, im Subendothelium sowie durch eine konzentrische Verdickung der Intimaschicht. Die Infiltrate der Gefäßwände und die Entzündungsreaktion sind hauptsächlich durch CD4+ T-Effektorzellen, B-Zellen und aktivierte Makrophagen bedingt. Auch findet sich eine Vielzahl proinflammatorischer Moleküle, wie u.a. das „intercellular adhesion molecule-1“ (ICAM-1), das „vascular cell adhesion molecule-1“ (VCAM-1) und das „leukocyte function-associated antigen-1“ (LFA-1) [17]. Letztendlich zeigt sich der Funktionsverlust des Transplantats in Form von Fibrosierung und Sklerosierung des Organs. Diesem multifaktoriell bedingten Prozess lässt sich durch eine Verkürzung der kalten Ischämiezeit (KIZ), der individuellen Anpassung des immunsuppressiven Regimes sowie einer Cytomegalie-Virus (CMV)-Prophylaxe partiell entgegenwirken.

### **1.2.3 Abstoßungsdiagnostik**

Die ersten Tage nach Transplantation wird der Zustand der Patienten intensiv überwacht. So werden u.a. Veränderungen den Allgemeinzustand des Patienten betreffend notiert, die Körpertemperatur gemessen, die Leukozytenzahl und der Spiegel der Immunsuppressiva im Blut beobachtet. Dies dient der Erkennung erster unspezifischer Zeichen für eine Verschlechterung der Transplantatfunktion. Die Funktion der Nierentransplantate orientiert sich an der Messung der Serumkreatininwerte und der Bestimmung der glomerulären Filtrationsrate (GFR). Die Berechnung der GFR erfolgt unter Bezug auf die Körperoberfläche nach der Cockcroft-Gault Formel. Die Pankreastransplantatfunktion wird über die Bestimmung der Amylase und Lipase im Serum, wie auch den Blutzuckerspiegel abgeschätzt. In der Regel wird nach simultaner Transplantation von Niere und Pankreas desselben Spenders die Abstoßung eines einzigen Organs selten gesehen; hier eignet sich Kreatinin als früherer Abstoßungsmarker.

Eine weitere nicht-invasive Methode zur Diagnose der akuten Abstoßung ist die sonographische Darstellung des Transplantats. Sie liefert Erkenntnisse über die rechte Lage des Organs, Störungen bei der Perfusion oder über inflammatorische Prozesse. Dopplersonographisch kann der arterielle Gefäßwiderstand bestimmt werden. Bei der PTx sind für die Messung der Perfusionsparameter spezielle Kernspintomographie-Techniken entwickelt worden. Als Goldstandard dient bei Rejektionsverdacht die Punktion des betreffenden Organs, wodurch die klinische Diagnose bestätigt wird. In pathologischer Hinsicht kann ein Rückschluss auf die Art der Abstoßung erfolgen. Eine Hilfestellung bei der Einteilung des Schweregrades liefert die Klassifikation nach Banff (Tabelle 2,3).

<b>Abstoßungsreaktion</b>	<b>Besonderheiten</b>
<b>Hyperakute Rejektion</b>	Antikörper gegen Spender-Antigene
<b>Borderline Befund (BL)</b>	keine Arteritis der Intima; milde Form der Tubulitis
<b>Akute Rejektion</b>	<u>histopathologische Veränderungen</u>
Ia	Infiltration des Interstitiums und moderate Tubulitis (>4 mononukleäre Zellen pro Tubus-Querschnitt oder Gruppe von 10 tubulären Zellen)
Ib	Infiltration des Interstitiums und moderate Tubulitis (>10 mononukleäre Zellen pro Tubus-Querschnitt oder Gruppe von 10 tubulären Zellen)
IIa	milde bis moderate Form der Arteritis der Intima
IIb	schwere Form der Arteritis der Intima mehr als 25% des Lumens betreffend
III	Transmurale Arteritis und/ oder fibrinöse Veränderung der Intima und Nekrose von glatten Muskelzellen der Media
<b>Chronische, sklerotische Nephropathie</b>	<u>histopathologische Veränderungen</u>
Grad I	milde Form der interstitiellen Fibrose und tubulären Atrophie
Grad II	moderate Form der interstitiellen Fibrose und tubulären Atrophie
Grad III	stark ausgeprägte Form der interstitiellen Fibrose und tubulären Atrophie mit Verlust der Tubuli

**Tab. 2: Banff 97-Kategorien für die Diagnose allogener Nierentransplantat-Bioptate.** Unterteilung in antikörpervermittelte Rejektionen, Borderline-Veränderungen, akute Rejektion, chronische Abstoßung [18].

Abstoßungsreaktion	Besonderheiten
<b>Undefiniert</b>	Inflammation der Septen; die Kriterien für eine milde, zellvermittelte akute Rejektion sind nicht erfüllt
<b>antikörpervermittelte, hyperakute Rejektion</b>	C4d Positivität + Spender-spezifische Antikörper + Organdysfunktion
<b>Akute Rejektion</b>	<u>histopathologische Veränderungen</u>
Grad I	Aktive Septen-Inflammation (Lymphozyten-Blasten, Eosinophile) der umliegenden Strukturen: Venulitis, Ductitis. Entzündung des Perineuriums. Und/oder fokal-azinäre Inflammation (nicht mehr als 2 Inflammationsfoki pro Lobulus).
Grad II	Multi-fokale Inflammation der Azini (>3 Foki pro Lobulus) mit azinärer Zellschädigung und/oder minimale Arteritis der Intima.
Grad III	Diffuse, azinäre Inflammation mit fokaler oder diffuser multi-zellulärer/ konfluierender azinärer Nekrose. Und/oder mäßige oder schwere Arteritis der Intima. Und/oder transmurale, nekrotisierende Arteritis.
<b>Chronische, sklerotische Pankreatopathie</b>	<u>histopathologische Veränderungen</u>
Stadium I	Expansion fibröser Septen; Fibrose <30% des Kern-Oberfläche, azinäre Lobuli sind befallen. Zentrale Lobuli sind normal.
Stadium II	Fibrose 30–60% der Kern-Oberfläche. Die Atrophie der exokrinen Anteile betrifft den Großteil der peripheren und zentralen Lobuli.
Stadium III	Fibrotische Anteile dominieren >60%; rudimentär sind Azini und/oder Langerhans-Inseln erhalten.

**Tab. 3: Klassifikation der Pankreasbiopsien nach Banff [19]**

Einen Sonderfall stellt der transplantierte Dünndarm dar. Leicht können bei Störungen der Integrität des intestinalen Gewebes Resorptionsstörungen entstehen, die den Übertritt von pathogenen Keimen in die Blutbahn mit Folge einer Sepsis ermöglichen. Das darmassoziierte lymphatische Gewebe mit seiner starken Immunogenität ist für die Immunreaktionen an der Mukosa-Oberfläche verantwortlich. Die Transplantatakteptanz ist zudem durch die funktionelle Rolle des Dünndarms erschwert – das Epithel ist beständig dem Kontakt mit den oral aufgenommenen Fremddantigenen ausgesetzt. Nach Kusne et al. [20] tritt bei bis zu 97% der dünndarmtransplantierten Patienten eine infektiöse Episode auf. Transplantatabstoßungen sind häufig und haben zu Beginn einen oft asymptomatischen Verlauf. Auch Infektionen können das

erste Anzeichen einer Abstoßungskrise sein. Wenn Fieber, Bauchschmerzen, Diarrhoe oder ein Ileus auftreten, kann die Destruktion der Dünndarm-Mukosa schon fortgeschritten sein. Bei 1/3 der Patienten scheint die Mukosa in der Routine-Endoskopie unauffällig [21]. Aus diesem Grund werden in der Frühphase nach Transplantation Ileum-Biopsien als „Screening“-Methode angewandt. Bei Rejektion lassen sich histologisch Lymphozyteninfiltrate der Lamina propria sowie eine Kryptitis und Apoptose der Krypten erkennen.

### **1.3 (Basis-)Immunsuppressiva**

Bei der soliden Organtransplantation kommt den T-Lymphozyten eine entscheidende Bedeutung für das Rejektionsgeschehen zu. Aus diesem Grund liegt der Fokus bei der Behandlung organtransplantierten Patienten vorwiegend auf der Kontrolle der T-Zellen [22]. Aufgrund verbesserter immunsuppressiver Therapien sind Abstoßungsreaktionen seltener geworden. Jedoch bringen immunsuppressive Protokolle den Nachteil der Gefahr von Überdosierung und Nephrotoxizität mit sich.

Die Ziele immunsuppressiver Strategien sollten sein:

- die Minimierung akuter und chronischer Rejektionen, die Beseitigung von Nebenwirkungen und Toxizität, das Aufheben des Auftretens von Infektionen und malignen Neubildungen
- die Maximierung von Transplantat- und Patientenüberleben, wie die Steigerung der Kosten-Effektivität der Therapie

#### **1.3.1 Glukokortikoide**

Erst mit Einführung der Glukokortikoide in den 1960ern wurde die Organtransplantation möglich. Die synthetisch hergestellten Glukokortikoide (Decortin, Urbason) sind unspezifische Immunsuppressiva mit verschiedenen immunsuppressiven Wirkmechanismen. Durch ihre Wirkung werden periphere Blutzellen umverteilt und die Anzahl der Lymphozyten vorübergehend reduziert. Dies erfolgt über den Mechanismus der intrazellulären Rezeptorbindung.

Glukokortikoide führen z.B. durch die Blockade der T-Zell-Aktivierung zur Hemmung der Zytokin-Synthese und verhindern die Transkription von Interleukin-2 (IL-2) und Tumornekrosefaktor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ). Ebenfalls können Glukokortikoide in Makrophagen zu einer Inhibierung der MHC-Expression und somit zu einer reduzierten antigenstimulierten T-Zell-Aktivierung führen. Glukokortikoide werden häufig in Kombination mit anderen Immunsuppressiva als Therapeutikum bei Transplantationen eingesetzt. Als intravenöse Stoßtherapie finden sie Verwendung bei der Behandlung von Abstoßungskrisen. Auch Autoimmunerkrankungen und Graft-versus-Host-Reaktionen nach Knochenmarkstransplantation wird mit einer Therapie durch Glukokortikoide begegnet. Die intensive Glukokortikoid-Therapie kann zu beträchtlichen Nebenwirkungen führen, die mit einer erhöhten Morbidität organtransplantierte Patienten einhergeht. Durch die Kombination mit Cyclosporinen kann die Glukokortikoid-Dosis eingeschränkt werden. Dadurch kommt es zu einer Reduzierung der adversen Effekte. Zu den systemischen Nebenwirkungen zählen: Wachstumsretardierung bei Kindern, Osteopenien, erhöhtes Infektionsrisiko, Kataraktbildung, Hyperglykämien und Bluthochdruck. Ein bestehender Diabetes mellitus, wie auch eine Osteoporose können verstärkt werden.

### 1.3.2 Calcineurin-Inhibitoren

Cyclosporin A (CyA; Sandimmun) und FK506 (Tacrolimus; Prograf) sind heutzutage die wichtigsten Bestandteile der immunsuppressiven Therapie. Die beiden Immunsuppressiva haben einen ähnlichen Wirkmechanismus. Sie entfalten ihre pharmakologische Wirkung durch Bindung an eine Gruppe zytoplasmatischer Proteine, die sogenannten Immunophilinen. Die auf diese Art und Weise gebildeten Substanz-Immunophilin-Komplexe hemmen selektiv die enzymatische Aktivität von Calcineurin, einer Calcium-abhängigen Phosphatase. Durch die Bindung des T-Zell-Rezeptors (TCR) an einen Antigen-MHC-Komplex erhöht sich der Calciumspiegel, daraus ergibt sich die Aktivierung von Calcineurin. Somit beruht die primäre immunsuppressive Wirkung von Calcineurin-Inhibitoren (CNIs) auf der Blockierung der Proliferation von T-Zellen durch eine Verminderung der Expression mehrerer Zytokingene, die normalerweise bei der T-Zell-Aktivierung induziert werden. Dazu gehört IL-2, dessen Synthese durch T-Lymphozyten ein wichtiges Wachstumssignal für T-Zellen darstellt. Tacrolimus hemmt die Bildung von zytotoxischen T-Zellen und deren Aktivierung und unterbindet die davon abhängige B-Zell-Proliferation. Im Vergleich zu CyA besitzt Tacrolimus die 10- bis 100-fache Wirk-Effektivität. 1994 wurde es für die Basis-Immunsuppression bei der Leber-Transplantation eingeführt und ist seit 1997 auch für NTx-Patienten zugelassen. CNIs erfordern

eine strenge Kontrolle der Wirk-Spiegel im Blut – zu niedrige Spiegel gehen mit einer höheren Inzidenz an akuten und chronischen Abstoßungen einher, während überhöhte Blutspiegel ihr Korrelat in der Zunahme der Toxizität, der systemischen Nebenwirkungen und Infektionen finden. Zahlreiche Nebenwirkungen können die systemische Anwendung von Tacrolimus einschränken, dabei ist das Nebenwirkungsspektrum von Tacrolimus dem von CyA ähnlich. Beide Immunsuppressiva gelten als nephrotoxisch. Eine CyA induzierte Hypertension tritt in etwa 50% der Fälle einer NTx auf. Tacrolimus-behandelte Patienten haben eine höhere Inzidenz für neurotoxische Erscheinungen, gastrointestinale Symptome und für die Entwicklung eines Diabetes mellitus. Im Vergleich zu CyA-behandelten Patienten kommt es unter Tacrolimus-Therapie selten zu einer Gingivahypertrophie oder Hypertrichose. Bei dem aufgeführten Spektrum an Nebenwirkungen versucht man den Einsatz und die Dosierung von CNIs zu limitieren.

### 1.3.3 Mycophenolat-Mofetil

Mycophenolat-Mofetil (MMF) ist der 2-Morpholinoethylester der Mycophenolsäure. Nach der oralen Aufnahme und enteralen Resorption wird MMF in diese aktive Form umwandelt. MMF hemmt die Proliferation alloreaktiver T- und B-Lymphozyten und verhindert ihre klonale Expansion, indem es selektiv die *de novo* Synthese von Purinen unterdrückt. Weitere Wirkmechanismen von MMF sind die Induktion der Apoptose aktivierter T-Zellen mit der Folge der Eliminierung antigenstimulierter Zellen, die Hemmung der Glykolyisierung und damit der Expression von Adhäsionsmolekülen auf T- und B-Lymphozyten. Die Antikörperproduktion durch B-Zellen wird gehemmt. Diese Wirkmechanismen haben zur Hypothese geführt, dass MMF die Entwicklung einer chronischen Abstoßung hemmen könne. Diese Hypothese konnte in Tierexperimenten bestätigt werden [23], während die Ergebnisse von großen multizentrischen Studien dies bisher nicht zeigen konnten [24]. MMF wird prophylaktisch zur Vorbeugung einer Rejektionskrise nach Transplantation eingesetzt, typischerweise in Kombination mit Glukokortikoiden und CNIs. Häufige Nebenwirkungen sind Anämie, Thrombozytopenie und gastrointestinale Störungen. Die Anwendung von MMF geht mit einer erhöhten Infektionsrate einher, wobei insbesondere eine CMV-assoziierte Sepsis zu nennen ist.

## 1.4 Monoklonale Antikörper

### 1.4.1 Basiliximab (Anti CD25)

Basiliximab (Simulect) ist ein chimärer monoklonaler IL-2R $\alpha$  (CD25)-Antikörper vom IgG1 $\kappa$  Isotyp mit einem Molekulargewicht von 156 kDa. Der Antikörper besteht aus einem humanen und murinen Anteil. Die Hemmung des IL-2R ist bis zu 30-45 Tage nach Induktion nachweisbar – in einer Phase nach der Transplantation, in der das Risiko einer akuten Abstoßungsreaktion am höchsten ist. Neben dem wichtigsten Wirkungsmechanismus von IL-2R $\alpha$ -Antikörpern – der Blockierung der Induktion von Lymphozytenproliferation durch eine direkte Hemmung der IL-2/IL-2R-Interaktion – ist ein weiterer Mechanismus die T-Zell-Eliminierung durch antikörperabhängige, zellvermittelte Zytotoxizität (ADCC), die komplementabhängige Zelllyse und/oder Opsonierung. Um das Nebenwirkungsprofil von Antikörper-Therapien deutlich zu reduzieren und um über eine hohe Spezifität in der Bindung aktivierter T-Zellen als Prävention akuter Abstoßungen zu erzielen, wurde dieser chimäre monoklonale Antikörper entwickelt [25]. Anti-IL-2-Rezeptorantagonisten finden Verwendung als Prophylaxe gegen akute Abstoßungsreaktionen. Die unter Basiliximab-Therapie auftretenden adversen Effekte sind gering. Zu den Nebenwirkungen zählen eine erhöhte Anfälligkeit für opportunistische Infektionen, insbesondere viraler Genese, und das Auftreten anaphylaktischer Reaktionen.

### 1.4.2 Campath (Anti CD52)

Campath-1H (Alemtuzumab) ist ein humaner monoklonaler Antikörper, ein Abkömmling des in der Ratte generierten IgG2b Antikörpers Campath-1G. Er ist gegen das 21-28 kDa schwere zelluläre CD52-Oberflächenprotein gerichtet und führt über eine antikörperabhängige, zellvermittelte Zytotoxizität zur Depletion von T-, B- und Dendritischen Zellen [26, 27]. Campath-1H findet seine Verwendung zunehmend als immunsuppressives Reagenz im Rahmen solider Organtransplantationen, insbesondere wird hier der Vorteil der Aufrechterhaltung der Immunsuppression bei gleichzeitiger Minimierung der Therapeutika-Anzahl und der Dosierung gesehen [28-30].

### 1.4.3 OKT3 (Anti CD3)

1986 eingeführt, war OKT3 (Muromonab) der erste in der klinischen Anwendung zugelassene monoklonale Antikörper [31]. Es handelt sich dabei um einen murinen, gegen den TCR gerichteten IgG-Antikörper. Die Bindung erfolgt an die  $\epsilon$ -Untereinheit des CD3-Rezeptors, führt damit zu einer kurzzeitigen Aktivierung der T-Zelle, darauffolgend jedoch zu einer Blockierung der T-Zellfunktion und einer Induktion der Apoptose. Zirkulierende T-Zellen werden eliminiert, aktivierte T-Zellen depletiert. OKT3 wird zur Behandlung von akuten, steroidresistenten Abstoßungsreaktionen nach allogener Organtransplantation eingesetzt.

## 1.5 Polyklonale Antikörper (ATG)

Polyklonale Antikörper werden aus Pferde- oder Kaninchenserum durch die Immunisierung mit humanen Lymphozyten oder Thymozyten hergestellt. Die Antigene, die primär zur Produktion von Anti-Lymphozyten-Serum (ALS) eingesetzt wurden, bestanden aus Leukozyten. Bald wurden diese Immunogene durch reine Lymphozyten, überwiegend T-Lymphozyten ersetzt. Die entstandenen Produkte nannte man Anti-Thymozyten-Globuline (ATGs) oder Anti-Lymphozyten-Globuline (ALGs), je nachdem, ob Thymozyten oder kultivierte Lymphozyten zur Immunisierung verwendet wurden. Als wirksame Immunogene bewährten sich humane Thymozyten oder die Jurkat-Zelllinie [32, 33]. Nach dem Immunisierungsprozess und der Isolation von IgG aus den Seren, folgen verschiedene Aufreinigungsschritte. Auf diese Weise wird ein Großteil der entstehenden, unspezifischen Antikörper entfernt. Nach wie vor besteht jedoch das Problem aller Antikörper-Präparationen darin, dass sie speziesspezifisch sind. Ihre Chargen sind instabil und ungenügend standardisiert. Folgende polyklonale Antikörper finden in Deutschland ihre Verwendung (Tabelle 4).

<b>Antikörper</b>	<b>Ursprung</b>	<b>Immunogen</b>	<b>Hersteller</b>	<b>Induktive Dosis (mg/kg/Tag)</b>
ATG (Thymoglobulin)	Kaninchen	Thymus	Genzyme, Neu-Isenburg	1-1,5
ATG (Lymphoglobulin)	Pferd	Thymus	Gemzyme, Neu-Isenburg	10
ATG (ATG-Fresenius S)	Kaninchen	Jurkat-T-Zelllinie	Fresenius, Gräfelfing	2-5

**Tab. 4:** Liste von in Deutschland verwendeten Anti-Lymphozyten-Seren

Die immunsuppressive Eigenschaft polyklonaler Antikörper wurde schon im Jahre 1951 von Woodruff und Forman gezeigt. Bereits um die Jahrhundertwende hatten Metchnikoff et al. den anti-inflammatorischen Effekt am Beispiel von ALS beschrieben, gefolgt von den Experimenten Monacos [34], der an Hunden demonstrieren konnte, dass die Administration von ALS das Transplantatüberleben verlängerte. 1967 verwandten Starzl et al. [35] diese polyklonalen Antikörper zum ersten Mal in der humanen NTx. 1977 wurde durch Beatty et al. [36] der Effekt, den die Administration von ATG auf T-Zell-Entwicklung und Transplantat-Abstoßung habe, gezeigt. Es wird davon ausgegangen, dass der hinter den polyklonalen Antikörpern steckende Mechanismus vornehmlich zur Depletion und Sequestration immunkompetenter T-Lymphozyten führt [37]. Innerhalb von 24 Stunden nach ATG-Applikation lässt sich eine periphere Lymphopenie beobachten; dabei ist im Fall von aus Kaninchen gewonnenen Antikörpern eine stärkere und längere Suppression von CD3+ T-Zellen zu verzeichnen, als bei den aus Pferdeserum isolierten Präparaten [38]. Die periphere Lymphozytendepletion mag von der komplementabhängigen Opsonierung und Lysierung herrühren. Opsonierte T-Zellen werden vom retikuloendothelialen System aufgenommen, darauf folgen Phagozytose durch Makrophagen in Milz, Leber und Lunge [37, 39]. ATG induziert die Fas-Rezeptor- (CD95) und Fas-Liganden-Expression, die in der Apoptose aktivierter T-Zellen resultiert [40]. Den Ergebnissen von Dubey et al. [41] zu Folge ist dabei auch TNF- $\alpha$  involviert. Des Weiteren konnten immunmodulatorische Effekte anhand von ATG beschrieben werden; so vermuteten im Jahre 1998 Merion et al. [42], dass die induktive Behandlung von organtransplantierten Patienten mit ATG zu T-Zell-Anergie und teilweiser Aktivierung von T-Zellen führen könne. Polyklonale Antikörper wirken nicht nur modulierend auf Moleküle, die die T-Zell-Aktivierung über die TCRs kontrollieren; vielmehr finden sich immer breiter gefächerte Antigene, die von den

Antikörper-Präparationen erkannt werden. Diese Moleküle lassen sich grob in drei Kategorien einteilen (Tabelle 5).

Immunantwort-Moleküle	Adhensions-Moleküle	Moleküle heterogener Signalwege
CD1a	CD11a/ CD18 (LFA-1)	CD2
CD3/ TCR	CD44	CD5
CD4	CD49/ CD29 (VLA-4)	CD6
CD6	CD50 (ICAM-3)	CD11b
CD7	CD51/CD61	CD29
CD8	CD54 (ICAM-1)	CD38
CD16	CD56	CD40
CD19	CD58 (LFA-3)	CD45
CD20	LPAM-1 ( $\alpha 4\beta 7$ )	CD95
CD25	CD102 (ICAM-2)	CD126
CD28	CD195 (CCR5)	CD138
CD30	CD197 (CCR7)	
CD32	CD184 (CXCR4)	
CD40		
CD80		
CD86		
CD152 (CTLA-4)		
HLA-Klasse I		
HLA-Klasse II		
$\beta 2$ -M		

**Tab. 5: Bekannte Ziel-Antigene von ATGs.** Einteilung in Immunantwort-Moleküle, Adhesion Moleküle und Moleküle heterogener Signalwege [43].

Über die Induktions- und Anti-Rejektionstherapie bei NTx hinausgehend, finden diese Antikörper in der Klinik für Allgemein-, Viszeral- und Transplantationschirurgie der Charité – Universitätsmedizin Berlin Verwendung in der PTx und simultanen P/NTx. Unter der Therapie mit ATG konnte die Dosis an Glukokortikoiden, im Vergleich zur kombinierten Therapie von Azathioprin mit Glukokortikoiden verringert werden [44]. Später wurde die Verwendung von ATG auf die Behandlung von immunologisch sensibilisierten Patienten, Patienten mit verzögerter Initialfunktion und auf die Therapie Steroid-resistenter akuter Abstoßungen ausgeweitet [45]. Um die immunsuppressiven Strategien zu optimieren, führte Kaden 1990 die Induktionstherapie durch einen ATG-Bolus ein [46]. Nach Organspende beginnt im Moment der Reperfusion die Sensibilisierung des Empfängerimmunsystems. Im Fall von Leichenspenden können Basis-Immunsuppressiva den gewünschten Wirkspiegel im Blut zu diesem Zeitpunkt nur schwerlich erreichen. Depletierende polyklonale Antikörper schaffen es hingegen, die Antwort des Immunsystems insofern zu schwächen, dass ein Erkennen von Fremdantigenen größtenteils ausbleibt [47]. Die Vorteile der Induktion der Immunsuppression durch polyklonale Antikörper bei Lebertransplantation wurden durch Schulack et al. [48] und Tschervenkov et al. [49] aufgeführt. 2003 veröffentlichten Starzl et al. [50] eine klinische Studie, die besagte, dass es durch die Induktionstherapie von polyklonalen Antikörpern bei diversen Transplantationsarten, u.a. auch bei DDTx, zu einer Vermittlung von Toleranz gegenüber der Allo-Spende käme. Polyklonale Antikörper werden umfassend bei Herztransplantation, Lungen- und Herz-Lungen-Transplantation eingesetzt; wobei die Verwendung bei Lungentransplantation wegen der erhöhten Gefahr einer CMV-Infektion kontrovers diskutiert wird. Bei Knochenmarkstransplantationen werden polyklonale Antikörper seit längerer Zeit eingesetzt, u.a. um das Auftreten einer Graft-versus-Host-Disease (GvHD) abzuwehren [51].

Seit einigen Jahren ist eine Renaissance im Einsatz von ATG durch die Markteinführung von Thymoglobulin (Genzyme) zu verzeichnen. Einige größere Studien über Thymoglobulin belegen seine hohe Effektivität in dem Verhindern von akuten Abstoßungen. Gleichzeitig ist die Inzidenz für Infektionskomplikationen erniedrigt, insbesondere in der kombinierten Therapie mit Tacrolimus [52]. Auch wirkt sich die prophylaktische ATG-Induktionstherapie positiv auf die Reduzierung der Nephrotoxizität durch CNIs aus [53]. In einigen Zentren werden polyklonale Antikörper ausschließlich im Fall eines erhöhten Risikos für die Entwicklung einer akuten Abstoßung appliziert – d.h. bei Patienten mit Zweit- oder Re-Transplantation, bei Patienten mit präformierten zytotoxischen Antikörpern und bei Patienten mit verzögerter Transplantatfunktion [54, 55]. Polyklonalen ATGs ist ein positiver Effekt bei der Reduzierung des Ischämie-

Reperfusionsschadens nachgewiesen worden [56]. Dieser Schaden besteht aufgrund der zeitweiligen Ischämie, Hypoxie, der Akkumulation toxischer Metabolite und letzten Endes der Reperfusion. Dieser Prozess bringt die Expression von Zell-Adhäsions-Molekülen mit sich, die wichtig für die Infiltration von Effektorzellen in das Gewebe sind. Diese Lymphozyten-Aktivierungs-Moleküle, wie  $\beta$ 1- und  $\beta$ 2-Integrine, und endotheliale Inflammations- und Adhäsionsmoleküle, wie ICAM-1 werden jedoch durch ATG geblockt [32].

Die Rolle von polyklonalen Antikörpern als Induktionstherapie wird kontrovers diskutiert. Datenanalysen haben gezeigt, dass die Induktionstherapie mit einem verminderten Risiko für eine akute Abstoßung bzw. mit einer signifikanten Erhöhung des Transplantatüberlebens assoziiert ist [57, 58]. Langzeitdaten zeigen allerdings keinen signifikanten Vorteil für das Transplantatüberleben im Verhältnis zu Patienten ohne polyklonale Antikörper-Induktionstherapie [54, 59]. Die durch polyklonale Antikörper erfolgende Immunsuppression ist wenig selektiv und kann zu einem Zustand genereller Immunsuppression führen. Die wichtigsten Nebenwirkungen sind allergische Reaktionen, Serumkrankheit, Fieber, Schüttelfrost, Thrombozytopenie und Anämie. Weitere adverse Effekte sind infektiöse Komplikationen, opportunistische Infektionen und die Entwicklung einer lymphoproliferativen Störung (PTLD). Einer drohenden Überdosierung durch polyklonale Antikörper wird durch durchflusszytometrisches Immunmonitoring von CD3+ T-Zellen begegnet. Bei Erreichen einer Zielgröße von 50-100 Zellen/ $\mu$ l kommt es zur Abnahme der unerwünschten Nebenwirkungen [60, 61].

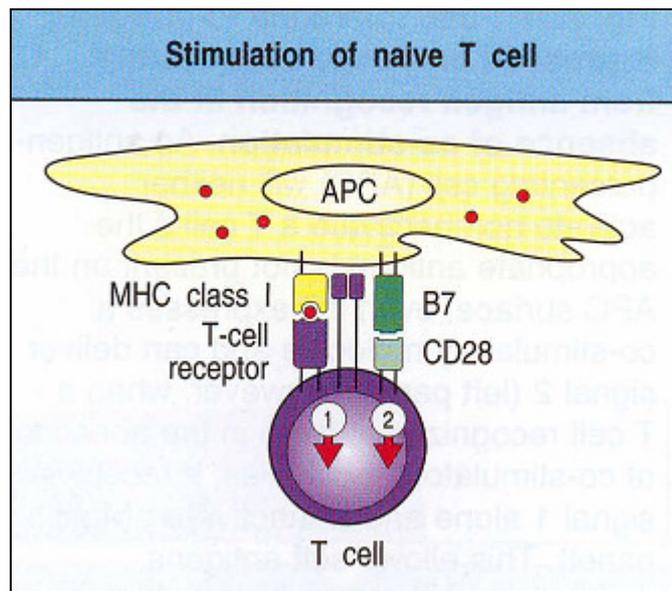
## 1.6 T-Zell-Entwicklung und T-Zell Funktion

Zu Beginn des 20. Jahrhunderts definierte Paul Ehrlich den Unterschied zwischen „selbst“ und „fremd“. Es stellte sich die Frage, warum bei der scheinbar unbegrenzten Zahl von Kombinationsmöglichkeiten an B- und T-Zell-Rezeptorspezifitäten, sich nicht auch Rezeptoren mit autoreaktivem Potential entwickeln. Begründet werden konnte dies durch den Begriff der Entwicklung von zentraler und peripherer Toleranz.

Im Knochenmark entstehen aus hämatopoetischen Vorläuferzellen Pro-T-Zellen. Diese wandern über das Blut in den Thymus ein und durchlaufen eine Lymphozytenreifung. Nach Umlagerung und Ausprägung der Gene zum TCR, erfolgt als Kontrollmechanismus der zentralen Toleranz

die positive, dann die negative Selektion. Erkennen die T-Zellen den von Thymusepithelzellen präsentierten MHC-Selbst-Peptid Komplex gemeinsam mit CD8, vollzieht sich ihre Entwicklung zu einer CD8+ zytotoxischen T-Zelle. Bindet MHC im Zusammenhang mit CD4, reift die Zelle zur CD4+ T-Helfer-Zelle. Wird allerdings im Rahmen der negativen Selektion das von den Thymusepithelzellen dargebotene Selbst-Peptid-MHC von CD4+ und CD8+ Thymozyten mit zu hoher Affinität gebunden, leitet das die Apoptose ein. Ist dieser Schritt durchlaufen, verlassen reife, naive CD4+ oder CD8+ T-Lymphozyten den Thymus und besiedeln die peripheren lymphatischen Organe. Ein Großteil der autoreaktiven Rezeptorspezifitäten wird auf diese Weise eliminiert. Da jedoch nicht jedes Autoantigen durch die Thymusepithelzellen exprimiert wird, können potentiell autoreaktive T-Zellen der negativen Selektion entkommen. Die Entwicklung der zentralen Toleranz ist unvollständig, deshalb wirken in der Peripherie weitere Mechanismen unterstützend bei der Verhinderung der Aktivierung autoreaktiver Zellen.

Die Aktivierung von T-Lymphozyten benötigt zwei Signale. Das Primärsignal erhält die T-Zelle durch eine APC über den MHC-I/-II-Komplex, der mit dem T-Zell Rezeptor interagiert. Das Sekundärsignal wird über die kostimulatorischen Glykoprotein-Moleküle B7.1 und B7.2 (CD80/CD86) auf den APCs vermittelt, die mit CD28 interagieren (Abbildung 1). Nicht aktivierte APCs exprimieren nur wenige dieser ko-stimulatorischen Moleküle, was die T-Zellen in einen Status der Anergie überführt. Ein stimulierendes Signal wird im Regelfall durch pro-inflammatorische Zytokine ausschließlich im Umfeld einer Entzündung induziert, was letztlich die T-Zellen zur Proliferation anregt. Ein weiterer Kontrollmechanismus ist darin zu sehen, dass eine wiederholte Stimulation mit Selbst-Antigenen den aktivierungsinduzierten Zelltod hervorruft; somit werden gegen Selbst-Antigene gerichtete Zellen eliminiert. Kommt es dennoch zur Aktivierung autoreaktiver Lymphozyten, können diese aktiv durch tolerogene regulatorische Zellen kontrolliert werden.



**Abb. 1: TCR einer naiven T-Zelle.** Der TCR erkennt das über MHC I präsentierte Antigen einer APC – Pfeil 1. Kostimulatorisch wirkt dabei die Interaktion zwischen B7 (CD80/CD86) und CD28 – Pfeil 2. Durch diese Signale kommt es zur Aktivierung/ Proliferation der T-Zelle [62].

Bei bis zu 75% der zirkulierenden Lymphozyten handelt es sich um T-Zellen. Es lassen sich grob drei T-Zellpopulationen unterscheiden: CD4+ T-Helfer-Zellen ( $T_H1$  und  $T_H2$ ), CD8+ zytotoxische T-Zellen (CTLs) und T-Zellen mit regulatorischer Funktion. Nach Antigenkontakt kommt es zu einer Differenzierung der T-Helferzellen in zwei unterschiedliche Subpopulationen, den  $T_H1$  und  $T_H2$ -Zellen. Die Antigene kommen zuerst mit unterschiedlichen Zellen des angeborenen Immunsystems, wie Makrophagen, Granulozyten oder Natürlichen Killerzellen (NK-Zellen), in Kontakt. Die Antigenverarbeitung dieser Zellen erzeugt ein Zytokin-Milieu, welches die Polarisierung zu einer  $T_H1$  oder  $T_H2$  Differenzierung entscheidend beeinflusst.  $T_H1$ -Zellen sezernieren vor allem IL-2, Tumornekrosefaktor- $\beta$  (TNF- $\beta$ ) und Interferon- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ) und führen über eine Makrophagenaktivierung zu der direkten zellulären Eliminierung. Zusätzlich können  $T_H1$ -Zellen zytotoxische T-Zellen aktivieren.  $T_H2$ -Zellen regen über die Sekretion von IL-4 und IL-5 B-Zellen zur Produktion von antigenspezifischen Antikörpern an. Auf diese Weise wirken sie auf dem humoralen Weg indirekt auf die Zielzelle. Die grobe Einteilung der T-Helferzellen in diese beiden Gruppen stellt sich als stark vereinfacht dar. Zu Beginn der 1990er wurde das  $T_H1/ T_H2$ -Paradigma formuliert, das ein Gleichgewicht zwischen  $T_H1$  und  $T_H2$ -Zellen beschreibt. Dessen Verschiebung zur einen Seite hin, kann entweder in Toleranz gegenüber dem Transplantat münden oder aber, bei überschießender Zytokin-Produktion auf anderer Seite,

gipfelt es im Auftreten von Autoimmunerkrankungen [63]. Bei IL-10 handelt es sich um einen, überwiegend von T<sub>H</sub>2-Zellen und Monozyten/Makrophagen, aber auch von B-Zellen gebildeten Botenstoff. Dieses pleiotrope Zytokin kann die Proliferation von T- und B-Zellen induzieren. Die Entwicklung und Funktion von T<sub>H</sub>1-Zellen durch Suppression von IL-2 und IFN- $\gamma$  wird in seiner Anwesenheit gehemmt [64]. IL-10 ist ein potenter B-Zell-Wachstums- und Differenzierungsfaktor, stimuliert die antikörperabhängige zelluläre Zytotoxizität und kann dadurch humorale Immunantworten gegen das Transplantat induzieren. Mehrere tierexperimentelle Arbeiten bestätigten, dass der durch IL-10 bedingte Verschiebung von T<sub>H</sub>1- zu T<sub>H</sub>2-Zytokinen eine Toleranzinduktion bewirke [65, 66]. Im Gegensatz dazu bewerteten die Arbeiten anderer Gruppen den erhöhten IL-10-Plasmaspiegel mit einem Anstieg der Inzidenz akuter und chronischer Abstoßungen [67].

CD8+ T-Zellen erkennen in erster Linie ubiquitär vorkommende, über MHC-I präsentierte Antigene. Auf der einen Seite kommt ihnen eine entscheidende Rolle bei der Beseitigung viraler Infektionen zu. Auf der anderen Seite sind sie u.a. für den Abstoßungsprozess von Transplantaten verantwortlich. Die biologische Bedeutung von zytotoxischen T-Zellen liegt darin, Zielzellen nach Antigenkontakt zu lysieren, indem sie das porenbildende Protein Perforin freisetzen. Auf diesem Weg gelangen die Granzyme, unter ihnen die Verdauungsenzyme Trypsin und Chymotrypsin, in das Zytoplasma der Zelle. Als drittes zytotoxisches Protein induziert Granulysin letztendlich die Apoptose. Darüber hinaus synthetisieren CD8+ T-Zellen IFN- $\gamma$ , das die virale Replikation hemmt, die Expression von MHC-I-Molekülen anregt und eine aktivierende Wirkung auf Makrophagen hat.

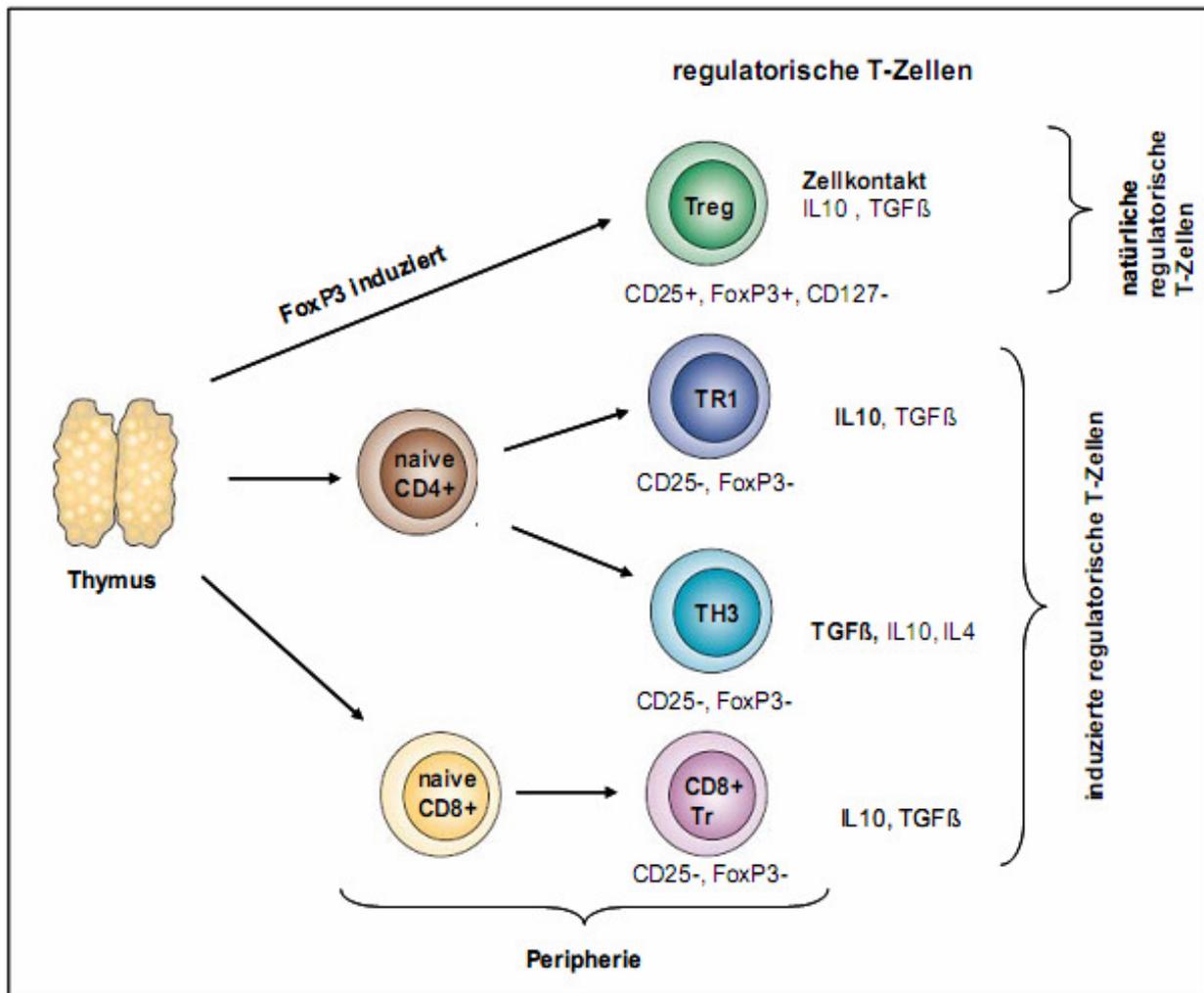
Der zentrale Moment in der Initiierung einer Transplantat-Abstoßungsreaktion ist die Erkennung der fremden, d.h. vom Spender stammenden Gewebeantigene durch die T-Lymphozyten des Empfängers. Beim Zusammentreffen von Spenderantigenen und Empfänger T-Zellen, werden 1. lösliche Mediatoren gebildet, 2. kommt es zur Expansion der T-Zellen und 3. differenzieren sich die T-Zellen in T-Helfer- und zytotoxische T-Zellen. [68].

## 1.7 T-Zellen mit regulatorischer Eigenschaft

Bereits im Jahre 1975 postulierten Kilshaw, Brent und Pinto [69], dass T-Zellen mit suppressiver Eigenschaft eine Rolle in der Entwicklung von Toleranz gegenüber dem Transplantat zukommt. In ihrer Gesamtheit zeichnen sich regulatorische T-Zellen durch die suppressive Eigenschaft gegenüber der Proliferation und Zytokin-Produktion aktivierter CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> Zellen aus. Dabei inhibieren sie die Expression von IL-2, woraus CD4<sup>+</sup> T-Zellen mit anergischem Phänotyp resultieren. 1969 hatten Nishizuka and Sakakura [70] gezeigt, dass eine neonatale Thymektomie bei Mäusen zwischen Tag zwei und vier nach Geburt zu einer autoimmun-vermittelten Abstoßung der Eierstöcke führte. Bestätigt wurden diese Ergebnisse 1973 durch Penhale et al. [71], die bei Ratten den Thymus resezierten und sie einer Röntgenbestrahlung aussetzten. In deren Folge wurde die Entwicklung einer Autoimmun-Thyroiditis beobachtet. Ein ähnliches Versuchsprotokoll ließ in Ratten den autoimmunen Typ-1 Diabetes entstehen. Die Übertragung von CD4<sup>+</sup> T-Zellen derselben Spezies verhinderte jedoch den Ausbruch der Krankheit. Daraus ließ sich folgern, dass der Thymus kontinuierlich CD4<sup>+</sup> T-Zellen mit autoreaktivem wie auch suppressivem Potential produziert, die er ab Tag drei nach Geburt in die Peripherie abgibt. Als Grund hinter den Autoimmunreaktionen wird die Depletion der Zellen mit regulatorischem Potential vermutet [72]. Diese zentralen Beobachtungen und die Entdeckung von Zelloberflächenproteinen auf T-Zellen, die mit der regulatorischen Kapazität einhergingen, eröffneten dem Feld der regulatorischen T-Zellen eine neue Basis. 1995 entdeckten Sakaguchi et al. [73], dass CD25 (die  $\alpha$ -Kette des IL-2-Rezeptors) konstitutiv auf der Oberfläche CD4<sup>+</sup> regulatorischer T-Zellen (Tregs) exprimiert wird. Aufgrund der Entstehung im Thymus werden diese CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> T-Zellen auch natürliche CD25<sup>+</sup> Tregs genannt. 5-10 % der zirkulierenden CD4<sup>+</sup> T-Zellen sind zu dieser Klasse der CD25-exprimierenden Tregs zu zählen [74, 75].

Bisher wird zwischen zwei gut charakterisierten Subtypen unterschieden: den im Thymus differenzierten CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> Tregs und den in der Peripherie generierten Tregs [76]. Diese beiden Zelltypen unterscheiden sich in ihrem zur Zell-Suppression verwendeten Mechanismus. Die im Thymus differenzierten Tregs sind nicht in der Lage, nach einem TCR-Stimulus zu proliferieren oder Zytokine zu sezernieren [77]. In vitro erfolgt die Suppression über einen Zellkontakt abhängigen, jedoch zytokinunabhängigen Mechanismus [78]. Sie wirken inhibitorisch auf die Proliferation von CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> T-Zellen. Der zweite Treg-Subtyp hingegen vermittelt die Suppression über die Sekretion immunsuppressiver Zytokine wie TGF- $\beta$

und IL-10 [79]. Eine weitere charakteristische Eigenschaft von Tregs ist die Expression des Transkriptionsfaktors „forkhead box P3“ (FoxP3) [80-82]. FoxP3 ist ein Transkriptionsfaktor der „forkhead“-Familie, welcher essentiell an der Bildung von Tregs beteiligt ist. In diesem Zusammenhang wurden auch CTLA-4 (cytotoxic T-lymphocyte antigen-4) und GITR (glucocorticoid-induced tumor necrosis factor receptor) als potentielle Marker für Tregs genannt. CTLA-4 exprimierende Tregs haben einen negativen Einfluss auf die Aktivierung von T-Zellen. Somit sollte CTLA-4 eine entscheidende Rolle bei der Unterdrückung von T-Zell-Antworten spielen. Seine Funktion bei der Generierung von Tregs bleibt aber fraglich [83]. GITR findet sich vorzugsweise auf murinen CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> Tregs [84]. Aktivierte CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup> T-Zellen können diesen Oberflächenmarker jedoch auch verstärkt exprimieren, ohne suppressive Eigenschaften zu entwickeln. Nach jüngeren Untersuchungen von Liu und Hartigan-O'Connor [85, 86] zu Folge sind Tregs nicht alleine durch das intrazelluläre Anfärben von FoxP3 gekennzeichnet; so können funktionelle Tregs ebenso über das Fehlen der  $\alpha$ -Kette des IL-7-Rezeptors (CD127) charakterisiert werden. Darüber hinaus werden in der Literatur Zellen mit regulatorischen Eigenschaften beschrieben, die weder CD25 noch FoxP3 exprimieren [87, 88]. Diese schließen CD4<sup>+</sup> T<sub>R</sub>1-Zellen, deren Zytokin-Milieu von der IL-10-Sekretion dominiert wird, und CD4<sup>+</sup> T<sub>H</sub>3-Zellen ein. T<sub>H</sub>3-Zellen sekretieren überwiegend TGF- $\beta$ , aber auch IL-4 und IL-10, wohingegen T<sub>R</sub>1-Zellen in einer von IL-10 abhängigen Art und Weise TGF- $\beta$  abgeben [89]. Regulatorische T<sub>H</sub>3-Zellen werden jedoch überwiegend durch die Aufnahme oraler Antigene im Magen-Darm-Trakt generiert und scheinen für die toleranzvermittelnde Funktion nach Organtransplantation eine untergeordnete Rolle zu spielen. Forschungsergebnisse zeigen, dass ebenso ein Teil der CD8<sup>+</sup> wie auch der NK-T-Zellen zu der Gruppe der regulatorischen T-Zellen gezählt werden können [90]. (Abbildung 2)



**Abb. 2: Hauptpopulationen CD4+ und CD8+ regulatorischer T-Zellen.** Das Diagramm zeigt schematisch die regulatorischen T-Zellen, ihren Ursprung und ihre Wirkungsweise. Treg = CD4+CD25+ natürliche regulatorische T-Zelle, TH3= T-Helfer-3 Zelle, TR1= regulatorische Typ1 Zelle, CD8+TR = CD8+ regulatorische T-Zelle. In der rechten Spalte sind die für den Wirkungsmechanismus wichtigen Signalmoleküle angezeigt. Fettgedruckt ist der bei der Suppression dominierende Mechanismus [90].

## 1.8 ATG und regulatorische T-Zellen

Die Applikation von ATG vor Transplantation bedingt die Depletion immunkompetenter T-Zellen. Dies entspricht einer maximal möglichen Unterdrückung einer immunologischen Antwort auf das Spenderorgan. Zudem kann neben der T-Zell-Lymphopenie auch die Produktion des immunsuppressiven Zytokins IL-10 zu einer Toleranz-Entwicklung gegenüber dem Spenderorgan führen. Entsprechend den unterschiedlichen Organtransplantationen wird von den Autoren eine Zunahme der von  $T_H1$ - und  $T_H2$ -Zellen sekretierten Zytokine beschrieben [91, 92]. Andere Autoren favorisieren hingegen das von nur einer T-Helferzell-Art dominierte Zytokin-Muster [93]. Bonnefoy-Berard et al. [94] beobachteten, dass ATG eine *in vitro* Aktivierung von peripheren T-Zellen sowie eine Stimulierung der IL-2, IFN- $\gamma$  und TNF- $\alpha$ -Synthese bewirkt. Zudem war eine Induktion der CD25 Expression zu verzeichnen.

Lopez et al. [95] veröffentlichten im Jahr 2006 eine Arbeit über die Entdeckung eines neuen Wirkmechanismus von ATG: die Induktion CD4+CD25+FoxP3+ Tregs. Spender-Lymphozyten wurden dabei über 24 Stunden mit ATG inkubiert. Die anschließende durchflusszytometrische Analyse wies innerhalb der CD4+ T-Zellpopulation eine Zunahme der CD25 wie auch der FoxP3-Expression auf. Vorher hatten bereits Walker et al. [96] eine mit der CD25-Expression einhergehende Hochregulierung von FoxP3 demonstriert. *In vitro* war bei der Induktion von Tregs eine Abhängigkeit von den im Überstand generierten  $T_H2$ -Zytokinen zu erkennen. Weitere Untersuchungen von Feng et al. [97] aus dem Jahr 2008 bestätigten, dass bei *in vitro* Experimenten die niedrige, submitogene Dosierung von Kaninchen-ATG, zu einer Konversion von CD4+CD25- zu CD4+CD25+ T-Zellen, gepaart mit einer vermehrten Expression von FoxP3 führt. Vermutet wird hierbei ein von IL-10 abhängiger Mechanismus.

## 2. Fragestellung

Die Transplantation stellt die letztmögliche kausale Therapieoption bei terminalem Organversagen dar. Durch eine Verbesserung des immunsuppressiven Regimes konnte dabei in den vergangenen zwei Jahrzehnten das akute Abstoßungsrisiko in der Frühphase nach Transplantation signifikant verbessert werden. So führt beispielsweise bei allogener Leichenspende die induktive Therapie mit polyklonalen Antikörpern (ATG/ Thymoglobulin) zu einer erhöhten Transplantatakzeptanz gegenüber dem Allotransplantat. Zudem kann durch die Administration von ATG eine Ausweitung der Spenderkriterien und ein verlängertes Transplantatüberleben erreicht werden. Trotz der deutlichen klinischen Effekte bleibt der detaillierte immunmodulierende Mechanismus von ATG/ Thymoglobulin bislang ungeklärt. Neben der T-Zelldepletion wird eine Treg-generierende Wirkung diskutiert. Nachdem in vorausgehenden *in vitro* Studien eine verstärkte Expression von regulatorischen T-Zellen nach induktiver Therapie mit diesen Antikörpern beobachtet werden konnte, soll auf folgende Aspekte in der vorliegenden Arbeit eingegangen werden:

1. Die Depletion von Lymphozyten ist ein entscheidender Wirkmechanismus von ATG (Thymoglobulin). Im Vordergrund steht hierbei die Inhibition der Aktivierung alloreaktiver T-Lymphozyten. Um einen detaillierten Aufschluss über die einzelnen Lymphozyten-Subpopulationen nach Thymoglobulin-Administration im Rahmen einer Induktionstherapie zu erhalten, sollte anhand ausgewählter organtransplantierte Patienten die Verlaufsentwicklung innerhalb der ersten 30 Tage p.T. der T-Zellpopulationen verfolgt und die Effekte auf B- und NK-Zellen beschrieben werden.
2. In Studien waren die T-Zell-modulierende Effekte durch polyklonale Antikörper *in vitro* demonstriert worden. Im Rahmen des stationären Aufenthalts der organtransplantierten Patienten sollte daher die Annahme überprüft werden, inwiefern die induktive Thymoglobulin-Therapie zu einer Generierung regulatorischer T-Zellen *in vivo* führt.
3. Abschließend soll die Frage geklärt werden, welcher Mechanismus für die Generierung der regulatorischen T-Zellen nach Thymoglobulin-Applikation *in vivo* verantwortlich ist. Hierfür erfolgten Expressionsanalysen von Zytokinen im Serum transplantierte Patienten p.T., um einen Hinweis auf die Beteiligung potentieller löslicher Faktoren zu erhalten.

## 3. Material und Methoden

### 3.1 Material

#### 3.1.1 Geräte/ Software

ABI PRISM 7500 sequence detection system	Applied Biosystems, Weiterstadt
Agilent 2100 Bioanalyzer	Agilent Technologies, St <sup>a</sup> Clara, USA
Biofuge	Heraeus, Berlin
CellQuest pro software	Becton Dickinson, San Jose, USA
DNA Thermo Cycler	Perkin Elmer, Wellesley, USA
Durchflusszytometer FACSCalibur	Becton Dickinson, San Jose, USA
Eppendorf Zentrifuge 5415R	Eppendorf, Hamburg
Gefrierschränke	Bosch, Stuttgart
GeneAmp PCR System 9600/9700	Applied Biosystems, Weiterstadt
GeneAmp 5700 sequenz detection system	Applied Biosystems, Weiterstadt
GeneAmp 5700 sequenz detection system V.1.3 software	Applied Biosystems, Weiterstadt
Glasware	Schott, Mainz
GraphPad Prism V. 5.00 software	GraphPad Software, San Diego, USA
Inkubationsschränke	Jouan, Fernwald
Kühlschränke	Liebherr, Ochsenhausen
Kühltruhe	Sanyo, Japan
Mikroskop	Carl-Zeiss, Jena
Nano LabChip Kit	Agilent Technologies, St <sup>a</sup> Clara, USA
Neubauer-Zählkammer improved	Braun, Melsungen
Pipetus Akku	Hirschgarten Laborgeräte, Eberstadt
Primer express software	Applied Biosystems
Vortexer	Roth, Karlsruhe
Sterilwerkbank	Heraeus, Berlin
Zentrifugen CR312, GR422	Jouan, Fernwald

### 3.1.2 Verbrauchsmaterial

48-well microtest Zellkultur-Platten Falcon	Becton Dickinson, USA
BD Vacutainer	BD Biosciences, Heidelberg
Einwegpipetten Falcon (5ml, 10ml, 25ml)	Becton Dickinson, USA
Eppendorfgefäße (0,5ml, 1,5ml, 2ml)	Sarstedt, Nümbrecht
FACS Röhren	BD Biosciences, Heidelberg
Falcon Conical Tubes (15ml, 50ml)	BD Biosciences, Heidelberg
MicroAmp Optical Caps	Applied Biosystems, Foster City, USA
MicroAmp Optical Tubes	Applied Biosystems, Foster City, USA
Parafilm	Brand, Mainz
Pipettenspitzen	Biozym, Hessisch Oldendorf

### 3.1.3 Kits

CD4+CD25+ regulatory T cell isolation kit	Miltenyi Biotec, Bergisch-Gladbach
Human Th1/Th2 cytokine kit	BD Biosciences, Heidelberg
Absolutely RNA miniprep kit	Stratagene, La Jolla, USA

### 3.1.4 Reagenzien

Destilliertes Wasser	
Essiglösung (3%ig)	
Dulbecco's MACS-Puffer	PAA Laboratories GmbH, Linz, A
Dulbecco's PBS	PAA Laboratories GmbH, Linz, A
FACS-Puffer	BD Biosciences, Heidelberg
FCS	Biochrom AG, Berlin
Ficoll-Lösung	Biochrom AG, Berlin
Human FoxP3 buffer set	BD Biosciences, Heidelberg
Hypoxanthin-Guanin Phosphoribosyl Transferase (HPRT) – "Housekeeping-Gen"	
Penicillin/Streptomycin Seromed	Biochrom AG, Berlin
PrimerMix	Metabion, Martinsried
RNA-Lysis Puffer	
RPMI 1640	PAA Laboratories GmbH, Linz, A

TaqMan Sonde

Eurogentec, Köln

TaqMan universal MasterMix

Applied Biosystems, Weiterstadt

Thymoglobulin

Genzyme, Neu Isenburg

### 3.1.5 Antikörper (FACS)

CD3, CD4, CD19 (FITC)

Miltenyi Biotec, Bergisch-Gladbach

CD16, CD25 (PE)

Miltenyi Biotec, Bergisch-Gladbach

CD3, CD127 (PE/Cy5)

eBioscience, San Diego, USA

CD56 (APC)

Miltenyi Biotec, Bergisch-Gladbach

FoxP3 (APC)

BD Biosciences, Heidelberg

Isotyp-Kontrollen (IgG Maus)

eBioscience, San Diego, USA

### 3.2 Patienten-Kollektiv

In die vorliegende prospektive Studie wurden 18 Patienten eingeschlossen, die sich an der Charité – Universitätsmedizin Berlin, Campus Virchow, einer soliden Organtransplantation unterzogen. Das Kollektiv setzte sich aus einer heterogenen Gruppe von Nieren- (n=10), kombinierten Pankreas-/Nieren- (n=6) und Dünndarm- (n=2) transplantierten Patienten zusammen. Nach vorausgehendem Aufklärungsgespräch und vorliegender Einverständniserklärung wurde den Patienten während ihres stationären Aufenthalts morgens peripheres Blut entnommen. Die Blut-Entnahme erfolgte in der ersten Woche nach operativem Eingriff alle zwei Tage. Ab dem postoperativen siebten Tag vergrößerte sich das Entnahme-Intervall auf fünf Tage. Die Patienten wurden in eine mit ATG-behandelte Gruppe (Thymoglobulin) und in eine nach (Standard-)Protokoll der Klinik für Allgemein-, Viszeral- und Transplantationschirurgie immunsupprimierten (Kontroll-)Gruppe eingeteilt (Tabelle 6). Die Thymoglobulin-Gruppe bestand aus P/NTx-Patienten und DDTx-Patienten. Diese erhielten den polyklonalen Antikörper über fünf Tage als Induktionstherapie (1,5mg/kg). In diese Gruppe wurde ein nierentransplantiertes Patient eingeschlossen, der Thymoglobulin als Anti-Rejektionstherapie erhielt. Die Kontrollgruppe hingegen bestand ausschließlich aus nierentransplantierten Patienten. Bei komplikationslosem Verlauf nach Organtransplantation betrug der stationäre Aufenthalt dieser Patientengruppe ca. zwei Wochen ( $16,33 \pm 4,88$  Tage). Die *ex vivo* Analyse der Lymphozyten-Populationen erstreckte sich über  $15,78 \pm 4,94$  Tage. Im Gegensatz dazu war die Krankenhaus-Verweildauer der Thymoglobulin-Patienten mit  $45,44 \pm 22,24$  Tagen länger. Der Analyse-Zeitraum lag bei  $28,89 \pm 11,34$  Tagen.

Die ethischen Grundsätze für die medizinische Forschung am Menschen beziehen sich auf die Deklaration des Weltärztebundes von Helsinki (1964, Revision 2000). Alle Experimente, die die Verwendung von humanem Material mit sich bringen, wurden durch die Ethik-Kommission der Charité – Universitätsmedizin Berlin befürwortet.

	m/w (n)	Alter (Jahre)	LD/BD (n)	1. Tx	re Tx	KIZ (Stunden)			HLA- Mismatch	Transplantat- funktion		aRx/ keine Rx	Banff '97	
						PTx	NTx	DDTx		früh	spät		B L	I°
<b>Thymoglo- bulin (n=9)</b>	7/2	48 ± 13	0/9	9	0	9,8 ± 2,9	11,6 ± 2,5	6,7 ± 1,3	4,3 ± 1,2	8	1	1/8		1
P/NTx (Induktions- therapie) (n=6)	4/2	54 ± 10				9,8 ± 2,9	11,3 ± 2,7		5 ± 0,8					
DDTx (Induktions- therapie) (n=2)	2/0	30 ± 8						6,7 ± 1,3	3,5 ± 0,5					
NTx (Anti- Rejektions- therapie) (n=1)	1/0	47					13		2	0	1	1/0		1
<b>Kontrolle (n=9)</b>	2/7	52 ± 11	0/9	9	0	11,6 ± 3,3			2,2 ± 1,5	9	0	0/9		
NTx (n=9)														

**Tab. 6: Patienten-Demographie.** Einteilung in Thymoglobulin-behandelte Patienten (n=9) und Kontrollgruppe (n=9). Verhältnis zwischen Männern und Frauen (m/w) in der Thymoglobulin-Gruppe 7/2, Kontrollgruppe 2/7. In beiden Gruppen vergleichbares Durchschnittsalter und gleiche mittlere kalte Ischämiezeit (KIZ) der Niere. Zur Transplantation kamen ausschließlich Organe hirntoter Spender (LD=living donor; BD=brain dead). HLA-Inkompatibilität: 4,3±1,2 „Matches“ (Thymoglobulin-Gruppe), 2,2±1,5 (Kontrollgruppe). Die einzige verspätete Funktionsaufnahme ging einher mit einem akuten Abstoßungsereignis (aRx), ersten Grades entsprechend der Klassifikation nach Banff (BL=Boderline-Abstoßung). Angaben als Mittelwert ± Standardabweichung (SD).

### 3.3 Immunsuppressive Medikation

Die primäre Immunsuppression bei NTx war eine Vierfach-Therapie. Sie bestand in der Administration von:

- einem Calcineurin-Inhibitor (Prograf)
- Mycophenolat-Mofetil (Cellcept) oder Mycophenolat-Natrium (Myfortic)
- Basiliximab (Simulect)
- und der Erhaltungstherapie durch ein Glukokortikoid der Wahl (Urbason, Decortin).

Die Immunsuppression der Patienten aus der Kontrollgruppe erfolgte entsprechend diesem Standard-Protokoll.

Die als Hoch-Risiko-Patienten eingestuften Patienten wurden induktiv mit Thymoglobulin behandelt. Das Immunsuppressions-Protokoll bei kombinierter P/NTx gestaltete sich wie folgt: (Tabelle 7)

	MEDIKAMENT	DOSIS
<b>präoperativ</b>	PROGRAF	0,05 mg/kg p.o.
	MMF	2000 mg p.o.
<b>intraoperativ</b>	THYMOGLOBULIN	1,5mg/kg KG über 4h (verdünnt auf 250ml)
	FENISTIL	4 mg i.v.
	RANITIDIN	50 mg i.v.
	URBASON	500 mg i.v.
<b>postoperativ</b>	PROGRAF	0,1 mg/kg p.o. verteilt auf 2 Einzelgaben
	MMF	2 x 1000 mg p.o.
	THYMOGLOBULIN	1,5mg/kg über 4h über 5 Tage
<b>Glukokortikoide</b>	FENISTIL	4 mg i.v.
	RANTIDIN	50 mg i.v.
	URBASON (Tag 1)	125 mg i.v.
	PREDNISOLON (Tag 2-6)	40 mg p.o.
	PREDNISOLON (Tag 7-14)	30 mg p.o.
	PREDNISOLON (Tag 15-21)	20 mg p.o.

**Tab. 7: Immunsuppressions-Protokoll bei kombinierter P/NTx.** Angabe der verwendeten Medikamente und ihrer Dosierungen - präoperativ, intraoperativ, postoperativ bis Tag 21 nach Transplantation.

Die dünn darmtransplantierten Patienten erhielten ebenfalls eine fünftägige Thymoglobulin-Induktionstherapie (1,5mg/kg über 4h). Im Fall der histopathologisch gesicherten Rejektion nach NTx wurde dieselbe Thymoglobulin-Dosis als Anti-Rejektionstherapie verabreicht.

### 3.4 Probenakquisition und Aufbereitung

Von den in die Studie eingeschlossenen Patienten wurden Citrat- und Serum-Blutproben abgenommen. Die Seren wurden bei -20°C eingefroren und gelagert, bis sie gesammelt auf ihre jeweilige Zytokin-Konzentration untersucht werden konnten. Bei den Vollblutproben fand eine Separation der „peripheral blood mononuclear cells“ (PBMCs) von Erythrozyten, Granulozyten und Zelldetritus über einen Ficoll-Dichtegradienten statt. 3ml Ficoll-Lösung wurden langsam mit 6ml antikoaguliertem Vollblut überschichtet und 30min lang zentrifugiert (800 g, Raumtemperatur). Die milchige Interphase wurde abpipettiert und in 20ml Waschpuffer (PBS) aufgenommen, dem fetales Kälberserum (1%) zugesetzt wurde. Es folgten zwei weitere Waschschr itte mit 20ml PBS/1% FCS (300 g, 15min, 4°C).

Die aus dem Pellet gewonnenen Zellen wurden entweder:

- magnetisch für nachfolgende *in vitro* Versuche aufgetrennt oder
- für die durchflusszytometrische Messung angefärbt oder
- für die PCR-Analyse aufbereitet

## 3.5 „Magnetic-activated cell sorting“ (MACS)

### 3.5.1 Grundlagen

Unter magnetischer Zellsortierung (MACS) wird die Isolation einer bestimmten Zellpopulation mittels magnetisierbarer biotinkonjugierter Antikörper verstanden. Zur Auftrennung der Lymphozyten in CD4<sup>+</sup> T-Zellen und nicht-CD4<sup>+</sup> T-Zellen wurden diese mit einem „biotin-antibody cocktail“ und spezifischen „anti-biotin microbeads“ markiert. Entsprechend der Technik der Firma Miltenyi Biotech wurden zur manuellen Trennung der Zellen MACS-Säulen verwendet. Durch Platzieren der Zellsuspension in das magnetische Feld des „MACS-Separators“ wurden die nicht-CD4<sup>+</sup> Lymphozyten in den MACS-Säulen zurückgehalten. In einem weiteren Schritt erfolgte die Separation des CD4<sup>+</sup> Magnetsäulendurchflusses in CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> und CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup> T-Zellen. Hierzu wurden die CD4<sup>+</sup> T-Zellen mit einem gegen das Oberflächenmolekül CD25 gerichteten Antikörper markiert und mit entsprechenden „microbeads“ versetzt. Nach erneuter Separation über die MACS-Säulen bestand die Negativ-Selektion der aufgefangenen Zellen aus angereicherten CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup> T-Lymphozyten.

### 3.5.2 Durchführung

Nach Zellzählung, Waschung und zehnmütiger Zentrifugation bei 300 g wurden die Spender-PBMCs mit 10µl „biotin-antibody cocktail“ versetzt. Die Zellen wurden 10min bei 4-8°C inkubiert. Nach Zugabe von 20µl „anti-biotin microbeads“ wurde die Suspension weitere 15min bei 4-8°C inkubiert und über die mit kaltem MACS-Puffer gewaschene MACS-Säule gegeben. Nach wiederholtem Durchspülen der Magnetsäule mit 2ml Puffer beinhaltete der Magnetsäulendurchfluss die angereicherte CD4<sup>+</sup> T-Zell-Fraktion. Diese T-Zell-Fraktion wurden daraufhin 10min bei 300 g zentrifugiert, in Puffer resuspendiert, mit CD25-Antikörpern versetzt und mit „anti-biotin CD25-microbeads“ (Maus IgG1) 15min inkubiert. Anschließend wurden die Zellen mit 20ml MACS-Puffer gewaschen, 10min bei 300 g zentrifugiert und das Zellpellet resuspendiert. Die CD25<sup>+</sup> Zellen wurden von den CD25<sup>-</sup> Zellen über eine MACS-Säule im „MACS-Separator“ getrennt. Nach wiederholtem Durchspülen der MACS-Säule bestand die aufgefangene Negativ-Selektion aus einer Suspension aufgereinigter CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup> T-Zellen. Es erfolgte die Zellzählung sowie die Kontrolle der Reinheit im Durchflusszytometer „FACSCalibur“.

### 3.6 Zellkultivierung mit Thymoglobulin

Die isolierten CD4+CD25- T-Zellen wurden in einer 48-well Flachboden-Platte mit einer Konzentration von  $1 \times 10^6$  Zellen eingesetzt. Die Vertiefungen wurden mit entsprechender Menge an RPMI 1640 Medium (Zusatz von 10% FCS und 1% Penicillin/Streptomycin) bis auf 1ml aufgefüllt. Diese Zellen wurden dann für 24 Stunden in einem Inkubator bei 37°C, 86 % relativer Luftfeuchte und 5% CO<sub>2</sub>-Gehalt kultiviert. Thymoglobulin wurden in unterschiedlichen Konzentrationen zu den Ansätzen hinzugegeben (1, 5, 10, 20, 30, 40, 50 µg/ml). Als Kontrolle wurde ein Kaninchen IgG1-Antikörper mitgeführt. Nach Ablauf von 24h wurden die Überstände aus der Zellkultur geerntet, das nach zehnmütiger Zentrifugation bei 500g entstandene Pellet mit PBS/1% FCS gewaschen, erneut zentrifugiert und in 150µl Puffer gelöst. Es folgte die Oberflächenfärbung für CD4 und CD25 sowie die intrazelluläre Färbung mit FoxP3.

### 3.7 Durchflusszytometrie (FACS)

#### 3.7.1 Grundlagen

Bei der durchflusszytometrischen Messung, auch FACS („fluorescence-activated cell sorter“) genannt, werden suspendierte Einzelzellen in einem Leitungssystem durch einen monochromatischen Laserstrahl geführt. Um sicher zu stellen, dass die Zellen einzeln am Laser vorbei gleiten, werden sie hydrodynamisch fixiert. In Abhängigkeit von Zelltyp und markierender Färbung emittieren sie charakteristische Signale. Diese werden mittels Detektoren im optischen System erkannt. Dieses besteht beim Durchflusszytometer „FACSCalibur“ aus einem Argon Laser, der Licht bei 488nm emittiert und einem Dioden Laser (635nm). Das gestreute Licht wird über ein Detektions-System aufgenommen. Die Partikelgröße bestimmt dabei die Intensität des Vorwärtsstreulichts (FSC), die Zellgranularität die des Seitwärtsstreulichts (SSC). Sind die Zelltypen mit einem spezifischen fluoreszierenden Antikörper markiert, wird ein Teil der Lichtenergie durch das entsprechende Fluorochrom absorbiert und Fluoreszenzlicht einer definierten, höheren Wellenlänge emittiert. Anhand dieser Phänomene sind charakteristische Verteilungen der Zellen reproduzierbar.

Das Emissionsspektrum erfasst das „FACSCalibur“ über vier Kanäle:

<b>Laser</b>	<b>Emmissionsmaximum</b>
Kanal 1	530 nm
Kanal 2	585 nm
Kanal 3	670 nm
Kanal 4	661 nm

**Tab. 8: Emissionsspektrum „FACSCalibur“**

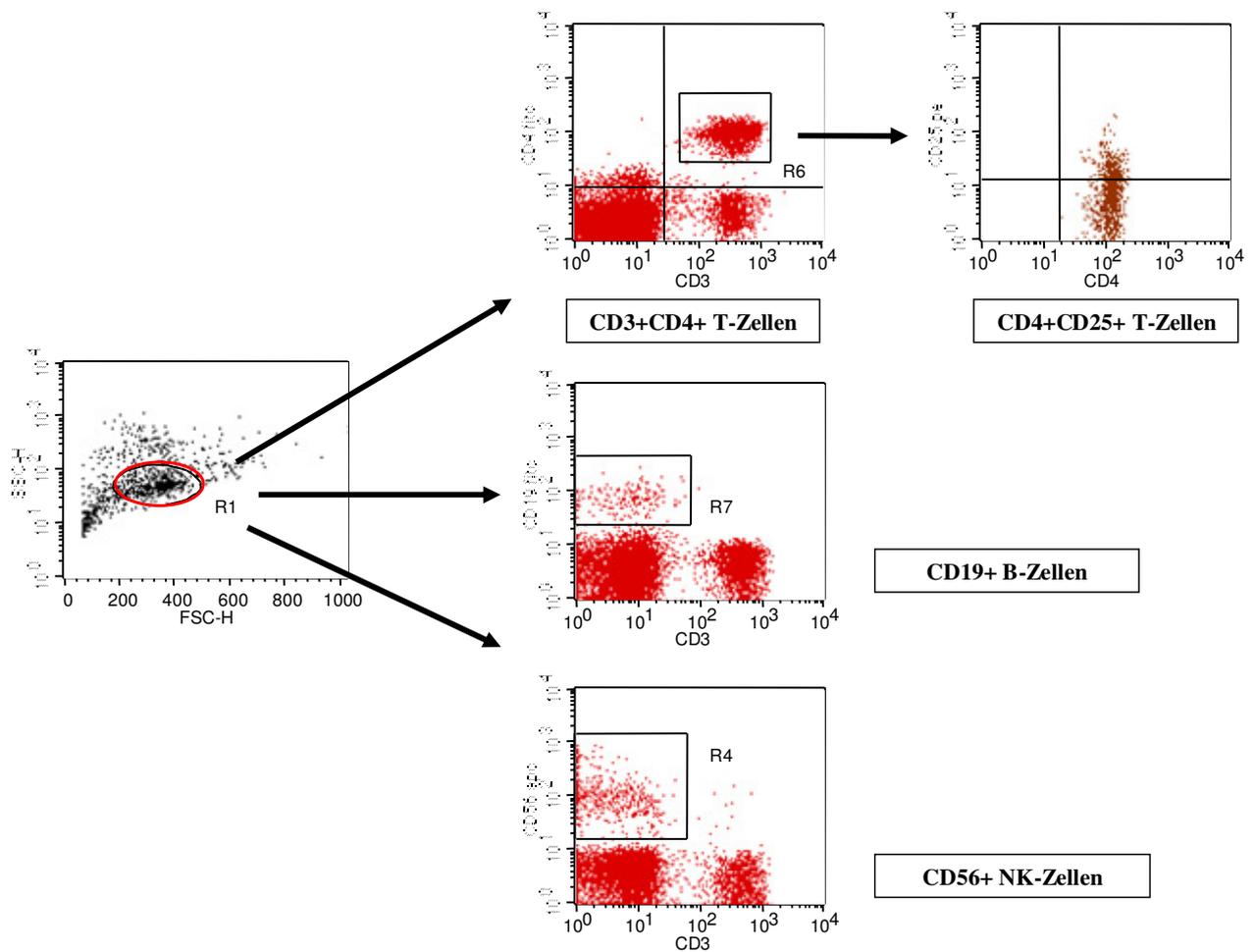
Die aufgeführten Farbstoffe können mit einer Vielzahl von Antikörpern gegen Oberflächen-Moleküle oder Stoffwechselprodukte der Zellen gerichtet sein. Für das vorliegende Probenmaterial kamen folgende Fluorochrome zum Einsatz:

<b>Fluorochrom</b>	<b>Antikörper</b>
Fluorescein-Isothiocyanat (FITC)	CD3, CD4, CD19
Phycoerythrin (PE)	CD16, CD25
Phycoerythrin/Cyanin (PE/Cy5)	CD3, CD127
Allophycocyanin (APC)	CD56, FoxP3

**Tab. 9: Fluorochrome und Antikörper**

In der Messungs-Einstellung für das Ausgangs-Setting wurden Zellgröße, -granularität und Isotyp-Kontroll-Färbungen erfasst und die Laser entsprechend mit der Software „CellQuest pro“ kalibriert. Die Negativkontrolle diente dazu, die Autofluoreszenz, die durch Streuung von Laserlicht an Zellorganellen entsteht, zu detektieren. Insgesamt wurden 100.000 Ereignisse pro Einzelmessung im Vorwärtsstreulicht (FSC)/ Seitwärtsstreulicht (SSC) aufgenommen. Zunächst wurde das Lymphozyten-Feld („Lymphozyten-Gate“) R1 eingestellt. Von diesem Feld ausgehend, konnten die einzelnen Lymphozyten-Subpopulationen bestimmt werden. Die T-Lymphozyten sind durch das Anfärben der Oberflächenproteine mit einem gegen CD3 und CD4 gerichteten Antikörper charakterisiert. B-Lymphozyten exprimieren CD19, NK-Zellen CD56. Anhand der in Abbildung 3 gezeigten „Gating-Strategie“ konnten die prozentualen Anteile der CD3+CD4+ T-, der CD19+ B- und der CD56+ NK-Zellen an den PBMCs ermittelt werden.

Durch einen weiteren „Gating“-Schritt ließen sich die T-Lymphozyten in CD25+ und CD25- unterteilen.



**Abb. 3:** „Gating-Strategie“ für T-, B- und NK-Zellpopulationen. R1 bildet das Ausgangs-„Gate“ für die Punktwolkenanalysen. Prozentuale Anteile an CD3+CD4+ T-Zellen (R6) beziehen sich auf die in R1 aufgenommene Lymphozytenzahl. Die Kombination der Felder R1\*R6 stellt den Anteil an CD4+CD25+ T-Zellen innerhalb der CD3+CD4+ T-Zellpopulation dar. Den CD19+ B-Zellen (R7) und CD56+ NK-Zellen (R4) liegt ebenfalls R1 zu Grunde.

### 3.7.2 Durchführung

Das Zellpellet wurde in 2ml PBS/1% FCS aufgenommen, es folgte die Zellzählung in der Neubauer Zählkammer. 100µl der Zellsuspension – einer Anzahl von  $2 \times 10^5$  Zellen pro Färbeansatz entsprechend – wurden in FACS-Röhrchen überführt. In diese waren vorher fluoreszenzmarkierte Antikörper für die Oberflächen-Färbungen (Kapitel 3.6) zu je 1µl vorgelegt worden. Die Suspension wurde unter Lichtausschluss für eine halbe Stunde im Kühlschrank inkubiert, anschließend gewaschen und zentrifugiert (300 g, 5min, 4°C). Hierauf folgte die

Fixierung der resuspendierten Zellen mit 250µl des humanen FoxP3 Puffers A (BD Biosciences). Nach Inkubation für 10min bei Raumtemperatur (RT) im Dunkeln, Zentrifugation und Waschung wurden die Zellen mit Hilfe von 200µl 1x working solution human FoxP3 Buffer C permeabilisiert. Die Inkubationsdauer betrug 30min. Das Zellpellet wurde zweimal gewaschen und mit 2µl des hinzu gegebenen FoxP3 Antikörpers für eine halbe Stunde unter Lichtausschluss inkubiert. Nach wiederholtem Waschen wurden die angefärbten Zellen im FACS analysiert.

### **3.8 Zytokin-Analyse, CBA-Kit**

Das „cytometric bead array“ (CBA) ist eine Methode zur Bestimmung von löslichen Substanzen, wie z.B. von Zytokinen aus Zellüberständen oder Seren. Für jedes der Zytokine (IL-2, IL-4, IL-5, IL-10, TNF und IFN- $\gamma$ ) gibt es eine Population von „capture-beads“ (Polymerkügelchen) mit unterschiedlicher Fluoreszenzintensität. Der „cytokine-capture-bead“-Komplex bindet wiederum einen spezifischen Detektions-Antikörper mit einer anderen Fluoreszenzintensität. Vom Prinzip handelt es sich um einen „sandwich-ELISA“. Die Ermittlung der Zytokin-Konzentration wird durchflusszytometrisch bestimmt.

Für die Zytokin-Bestimmung in der vorliegenden Arbeit wurde das CBA-Kit der Firma BD Biosciences verwendet. Entsprechend der Produktanleitung wurde das „setup“ des Zytometers erstellt. Über eine angefertigte Eichgerade konnten qualitative wie auch quantitative Zytokin-Analysen erzielt werden. Nach Vortexen der „capture-beads“, Zentrifugation bei 200 g für 5 min und 30-minütiger Inkubation bei RT, wurden je 50µl der „capture-beads“, des Detektions-Reagenz, der Zytokin-Standardverdünnung und der aufgetauten Patienten-Seren zusammengeführt und drei Stunden unter Lichtausschluss bei RT inkubiert. Die durchflusszytometrische Messung erfolgte am „FACSCalibur“.

## 3.9 Real-time RT-PCR

### 3.9.1 Grundlagen

Die real-time quantitative PCR stellt eine im molekularbiologischen Bereich weit verbreitete Technologie dar. Im Gegensatz zur klassischen Endpunkt-PCR ist nicht nur eine qualitative Bestimmung des Produkts möglich, sondern es kann auch eine Aussage über die Ausgangs-DNA-Menge getroffen werden. Die Grundlage für die heute angewandte RT-PCR wurde 1992 durch Higuchi et al. geschaffen [98, 99]. Sie entwickelten das real-time Detektions-System, bestehend aus einem PCR-Cycler und einem optischen Detektionsmodul. Das Prinzip der Methode beruhte ursprünglich auf der Interkalierung von Ethidiumbromid an doppelsträngige DNA und dessen fluoreszierender Eigenschaft bei UV-Bestrahlung. Heute werden bei der RT-PCR fluoreszierende Reporterfarbstoffe verwendet, wobei proportional zur Menge des neu entstandenen Produktes ein Anstieg der Fluoreszenz zu verzeichnen ist.

Die für die real-time RT-PCR-Panel notwendigen mRNA- und DNA-Sequenzen waren entsprechenden Internetdatenbank entnommen worden. Mit Hilfe der Software „Primer express“ waren Primer und Sonden unter vorgeschriebenen Kriterien ausgewählt worden und galten als im Labor etabliert (Tabelle 10).

Gen	Forward primer	Reverse primer	Sonde
<b>CD3</b>	5'agg aca aag aat cta ccg tgc aag3'	5'tga cat cag tga caa tga tgc ca3'	5'tca tta tcg aat gtg cca gag ctg tgt gg3'
<b>CD25</b>	5'aag tcc aat gca gcc agt gg3'	5'cat ttt ccc atg gtg gag gtt3'	5'aag cga gcc ttc cag gtc act gca g3'
<b>FoxP3</b>	5'aag tgg ccc gga tgt gag a3'	5'cat tgt gcc ctg ccc ttc t3'	5'act tcc tca agc act gcc agg cgg3'
<b>HPRT</b>	5'agt ctg gct tat atc caa cac ttc g3'	5'gac ttt gct ttc ctt ggt cag g3'	5' ttt cac cag caa gct tgc gac ctt ga 3'

**Tab. 10: Verwendete TaqMan-Panel.** Sequenzen für die ausgewählten Gene IL-10, CD3, CD25, FoxP3 und das „Housekeeping-Gen“ Hypoxanthin-Guanin Phosphoribosyl Transferase (HPRT). Angegeben sind die jeweiligen Sequenzen für den Forward Primer, Reverse Primer und die Sonde.

Bei der real-time RT-PCR mit fluoreszenzmarkierten Sonden liegt zwischen den beiden sequenzspezifischen Primern ein zusätzliches Oligonukleotid. Diese Sonden sind am 5'-Ende mit einem Reporterfarbstoff (FAM) und am 3'-Ende mit einem Quencher (TAMRA) markiert. Die Fluoreszenzemission des Reporters wird bei einer intakten Sonde durch strahlungsfreie Energieübertragung mit Hilfe des Quenchers unterdrückt. Wird der neue Strang synthetisiert, baut die Taq-Polymerase durch ihre 5'-, 3'-Endonukleaseaktivität die Sonde in kleine Fragmente ab, und die räumliche Nähe zwischen Reporter und Quencher geht verloren. Die zunehmende Reporterfluoreszenz kann nach jedem Zyklus gemessen werden und ist proportional zur DNA-Menge.

Die Quantifizierung der PCR beruht auf der Berechnung des Schwellenwertes (Ct), der erreicht wird, wenn die Reporterfluoreszenz die Hintergrundfluoreszenz signifikant überschreitet. Der Ct-Wert kann zur absoluten Quantifizierung mit Hilfe einer Kalibrierkurve oder zur relativen Quantifizierung eingesetzt werden. In der vorliegenden Arbeit wurde durch den Bezug der Zielexpression auf das nicht regulierte „Housekeeping-Gene“ Hypoxanthin-Guanin Phosphoribosyl Transferase (HPRT) die relative Quantifizierung bestimmt.

Bei der relativen Quantifizierung wurde die Menge des Zielgens einer unbekannt Probe im Vergleich zu HPRT über die Formel  $2^{-\Delta Ct}$  normalisiert. Die Herleitung dieser Methode beschrieben Livak et al. [100]. In der vorliegenden Arbeit wurde diese Art der Auswertung für die Verlaufsbetrachtung von Genexpressionen ausgewählter Kandidatenmarker (CD3, CD25, FoxP3) nach Thymoglobulin-Induktionstherapie versus Standard-Therapie verwandt.

### 3.9.2 Durchführung

Für die PCR-Analyse wurden 600µl Guanidin-Isothiocyanat enthaltener RNA-Lysis Puffer zum Zellpellet gegeben. Guanidin-Isothiocyanat wirkt hierbei denaturierend auf Proteine und somit inaktivierend auf RNAsen [101]. Um die Funktionalität von Enzymen endgültig zu beseitigen, wurde zur Deaktivierung noch eventuell vorhandener RNAsen 0,1molares β-Mercaptoethanol zu 1% hinzugegeben. Das homogenisierte Lysat wurde bei -80°C eingefroren, um es zu einem späteren Zeitpunkt mittels real-time PCR zu analysieren.

Die bei -80°C eingefrorenen PBMCs wurden mit Hilfe des „absolutely RNA miniprep kits“ von Stratagene weiterverarbeitet. Nach Filtrierung des Homogenisats durch Zentrifugation (12.000 g)

wurde dem Lysat zur Ausfällung der RNA das gleiche Volumen an kaltem 70%igen Ethanol hinzugefügt. Alle Zentrifugationsschritte wurden bei 12.000 g bei RT durchgeführt. Das Filtrat-Alkohol-Gemisch wurde auf die RNA-Bindungsmatrix gegeben und kurz zentrifugiert. Auf den RNA-Bindungsfilter wurden 600µl einfach konzentrierten Low-Salt-Buffer gegeben und das Filtrat mit DNase plus DNase-Digestions-Buffer für 30min bei 37°C im Brutschrank belassen. Nach wiederholten Wasch- und Zentrifugations-Schritten konnte die RNA mittels 22µl 60°C warmen Elutionspuffer in ein 1,5ml Eppendorfgefäß eluiert werden. Am „Agilent 2100 Bioanalyzer“ wurde der RNA-Gehalt der Proben ermittelt. Zur RNA-Quantifizierung diente das „RNA 6000 Nano LabChip Kit“. Mit Hilfe der Syntheseaktivität des Enzyms Taq-Polymerase wurde die präparierte RNA in cDNA umgeschrieben. Dafür wurden zu der RNA in H<sub>2</sub>O gelöste Diethyl-Pyrocabonate und oligo-dT-Primer gegeben und 10min bei 75°C inkubiert; anschließend abgekühlt. Die cDNA wurde anhand des folgenden Pipettierschemas synthetisiert (Tabelle 11).

Menge	Substanz
8µl	„reaction buffer“
4 µl	dNTPs
0,5 µl	RNAse-Inhibitor
2 µl	DNase

**Tab. 11: cDNA-Synthese-Schema**

Der Mix wurde 30min lang bei 37°C inkubiert. Danach wurde die DNase durch ein fünfminütiges Erhitzen bei 75°C inaktiviert, die Ansätze wurden abgekühlt, Reverse Transkriptase und RNAse-Inhibitor hinzugefügt, dann die cDNA für eine Stunde bei 42°C synthetisiert. Zur Inaktivierung der RNAse wurden die Proben auf 95°C erhitzt. Proben wurden nur verwendet, wenn die aus der cDNA-Synthese stammenden Kontrollansätze ohne Reverse Transkriptase keine Kontamination mit genomischer DNA aufwiesen.

Für die Testung der Proben im „ABI PRISM 7500 sequence detection system“ betrug das eingesetzte Probenvolumen 25µl. In jeden PCR-Ansatz wurden 12,5µl Mastermix, 6µl Primer-Mix, 1µl Sonde, 4,5µl steriles Wasser und 1µl zu analysierende cDNA pipettiert. Das standardmäßig verwendete PCR-Programm beinhaltete 4 Schritte. Im ersten Segment wurden „Carryover Fragmente“ für 2 min bei 50°C verdaut, dann das Enzym bei 95°C für 10 min

inaktiviert. Für 40 Zyklen erfolgte der Denaturierungsschritt bei 95°C für 15 Sekunden, die Annealing- und Extensionsschritte bei 60°C für 60 Sekunden. Abschließend erfolgte die Auswertung mit der „GeneAmp 5700 sequence detection software“. Zum Beweis der Reproduzierbarkeit wurden für alle Proben Doppelansätze pipettiert, wobei der Schwellenwert (Ct-Wert) nicht mehr als 0,5 Zyklen voneinander abweichen durfte. Bei einem Ct-Wert des „Housekeeping-Gens“ >30 konnte die Probe aufgrund der fehlenden Reproduzierbarkeit nicht ausgewertet werden. Bei Ct-Werten des Zielgens >35 wurde davon ausgegangen, dass keine spezifische Ausgangs-DNA vorgelegen hatte.

### 3.10 Statistische Auswertung

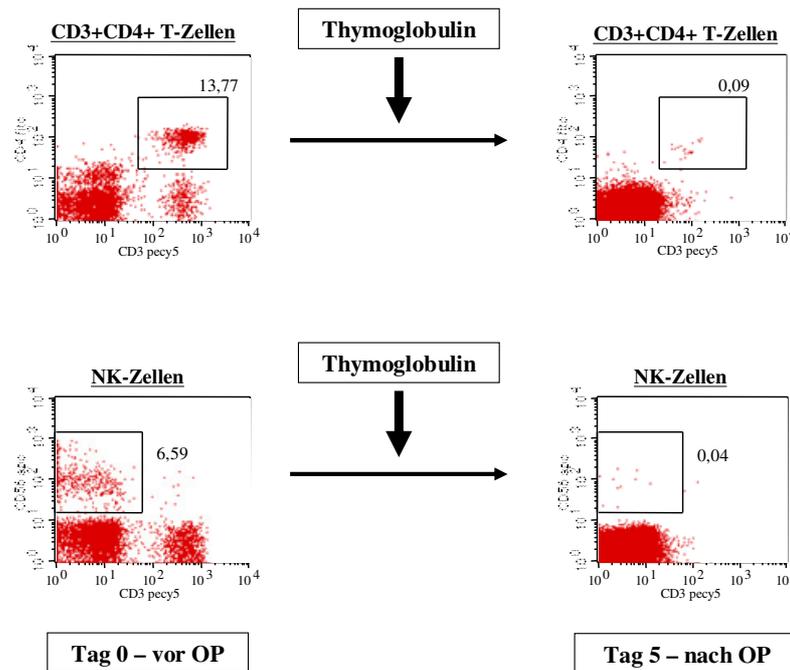
Die statistische und graphische Auswertung erfolgte mit dem Statistikprogramm GraphPad 5.00 für Windows der Firma GraphPad Software. Die Ergebnisse werden als Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung (mean  $\pm$  SD) präsentiert. Für die statistische Auswertung wurden parameterfreie Tests für unabhängige Stichproben (Mann-Whitney-U-Test bzw. Kruskal-Wallis-Test) verwendet, da die Stichproben klein und die Bedingungen der Normalverteilung nicht garantiert waren. Dabei wurden für die T-, B- und NK-Zellen die Expressionen von CD3, CD4, CD19, CD25+<sup>high</sup> und CD56 bestimmt. Über den Verlauf von 0-20 bzw. 30 Tagen wurden die Werte für die Tage 0, 5, 10, 15, 20, 25 und 30 innerhalb der beiden Gruppen miteinander verglichen. Die Expressionsanalyse für CD25+<sup>high</sup> und CD127<sup>low</sup> erfolgte in der Gegenüberstellung von Thymoglobulin-behandelten Patienten und Kontroll-Patienten. Gleiches galt auch für die mRNA-Expression von FoxP3. Bei der Analyse des Zytokin-Profiles erfolgte die Fokussierung auf die Thymoglobulin-Gruppe. Bei allen Tests wurde eine Signifikanz bei einem p-Wert < 0,05 angenommen.

## 4. Ergebnisse

Die vorliegenden Ergebnisse zeigen die unterschiedliche Lymphozyten-Populations-Entwicklung von Patienten nach solider Organtransplantation. Die zu untersuchende Patientenkohorte teilte sich in zwei Gruppen: die eine Patientengruppe erhielt als primäre Immunsuppression ein Anti-Thymozyten-Globulin (das Produkt Thymoglobulin der Firma Genzyme). Die andere Patientengruppe diente als Kontrolle und wurde entsprechend einem Vierfach-Standard-Schema therapiert (Kapitel 3.3). Im Folgenden wird die Entwicklung der CD3+CD4+ T-Zellen, der CD19+ B-Zellen und der CD56+ NK-Zellen nach Immunsuppression dargestellt. Die Analyse der T-Zellen konzentriert sich hierbei auf die Subpopulationen CD25+ T-Zellen.

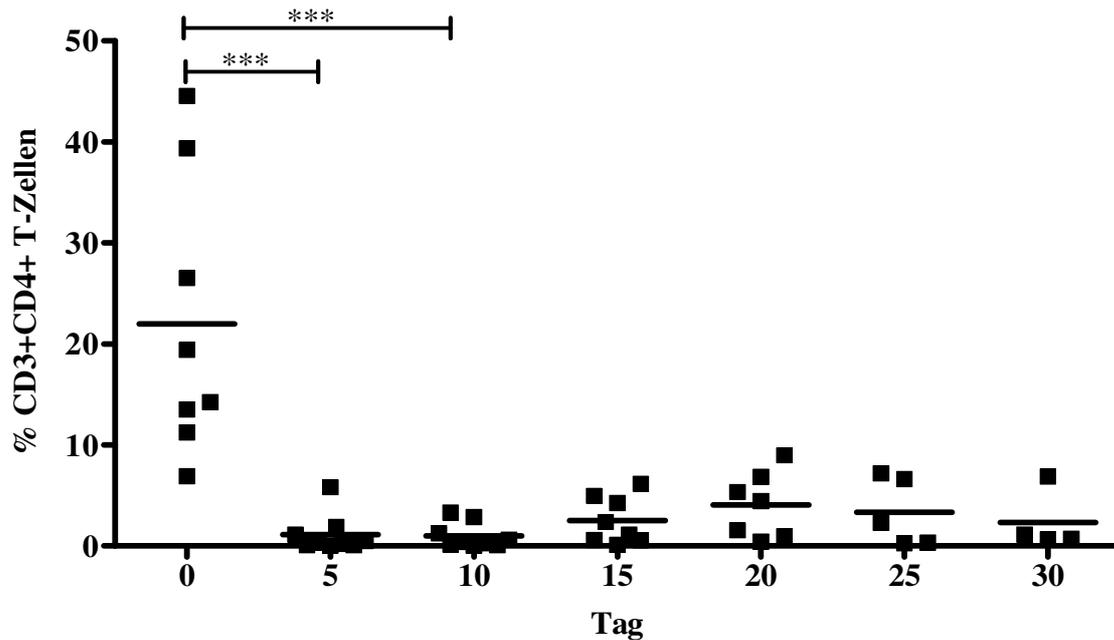
### 4.1 Verlaufsbeobachtung der T-, B- und NK-Zellen nach immunsuppressiver Therapie mit Thymoglobulin

Nach der Induktionstherapie mit Thymoglobulin kommt es initial zu einer Depletion der peripheren Lymphozyten. Exemplarisch wird die FACS-Punktwolkenanalyse einer 52-jährigen Patientin nach kombinierter P/NTx gezeigt (Abbildung 4). Vor 26 Jahren war bei ihr die Diagnose eines Diabetes mellitus Typ1 mit progredienter diabetischer Nephropathie gestellt worden. Bei dem Zustand einer chronischen Niereninsuffizienz, einer renalen Anämie und einem schlecht beherrschbaren arteriellen Hypertonus wurde die Patientin über zwei Jahre peritoneal dialysiert. Schließlich erfolgte bei terminaler Niereninsuffizienz die Transplantation des Pankreas und der linken Niere. Nach induktiver Immunsuppression mit Thymoglobulin ist eine deutliche Depletion der T- und NK-Zellpopulationen zu erkennen. Nach der Administration von Thymoglobulin über fünf aufeinanderfolgende Tage zeigen sich die Populationen der CD3+CD4+ T- und CD56+ NK-Zellen in der FACS-Analyse als fast nicht mehr existent.



**Abb. 4: Thymoglobulin depletiert T- und NK-Zellen.** Exemplarisch sind die prozentualen Anteile an T- und NK-Zellen einer P/NTx-transplantierten Patientin (52 Jahre, w.) vor und nach Induktionstherapie dargestellt. Die Expression für CD3+CD4+ T-Zellen sinkt von 13,77% auf 0,09%. Die CD56+ NK-Zellen werden ähnlich stark depletiert.

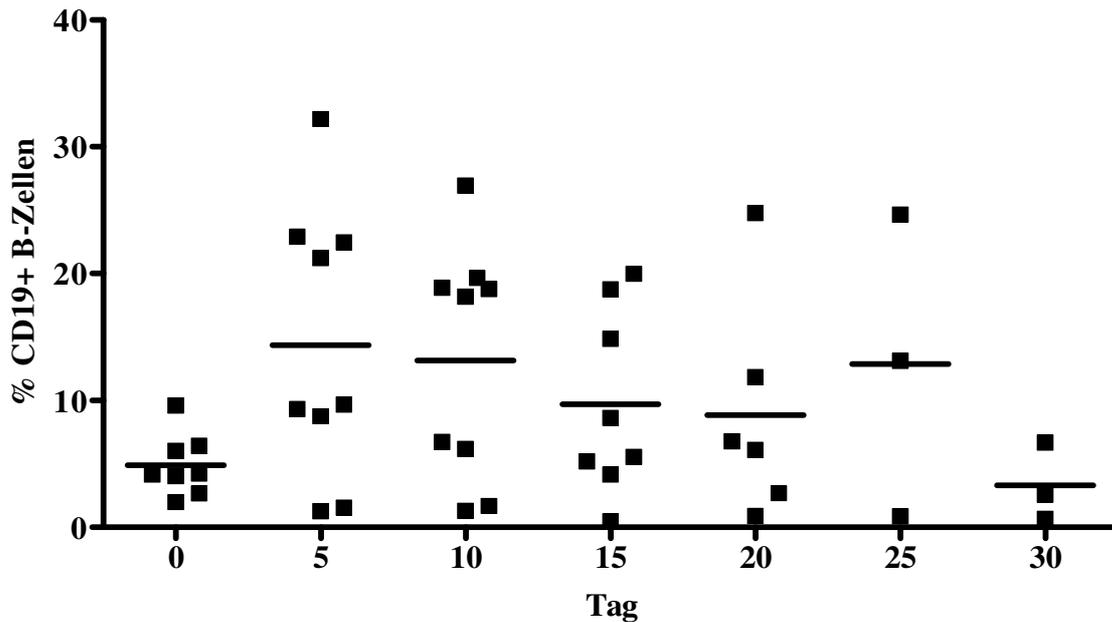
Die mit dem polyklonalen Antikörper behandelten Patienten wurden in der Thymoglobulin-Gruppe (n=9) zusammengefasst. Die Entwicklung der Patienten-Lymphozyten wurde in 5-Tages-Intervallen über 30 Tage analysiert. In der FACS-Analyse zeigt sich eine Depletion der CD3+CD4+ T-Lymphozyten nach induktiver Immunsuppression (Abbildung 5). Vor Transplantation sind  $21,97 \pm 13,70\%$  der totalen PBMCs CD3+CD4+ T-Lymphozyten. Dabei lässt sich eine große Streubreite (6,91-44,58%) der prozentualen Expression von CD3+CD4+ T-Zellen erkennen. Nach der Administration von Thymoglobulin ist an Tag 5 und 10 eine signifikante Depletion der CD3+CD4+ T-Zellen festzustellen. Zwischen Tag 10 und 15 nach Transplantation ( $13,38 \pm 1,21$  Tage) kommt es zu einer langsamen Repopulation der T-Lymphozyten. Jedoch ist innerhalb des Analysezeitraums (bis einschließlich Tag 30) keine vollständige Rekonstitution der CD3+CD4+ T-Lymphozytenzahlen zu beobachten.



**Abb. 5: Thymoglobulin depletiert CD3+CD4+ T-Zellen.** Verlauf der CD3+CD4+ T-Zellen nach Thymoglobulin-Induktion (n=9). Thymoglobulin depletiert primär die T-Zellpopulation. Im Vergleich zur T-Lymphozytenzahl an Tag 0 zeigen sich signifikant verminderte prozentuale Anteile der CD3+CD4+ T-Zellen von  $1,11 \pm 1,87\%$  an Tag 5 und  $1,0 \pm 1,24\%$  an Tag 10 (\*\*\*)  $p < 0,001$ ).

Neben der beobachteten Depletion der T-Zellen kommt es ebenfalls zu einer Depletion der CD56+ NK-Zellen (Abbildung 6). Vor Transplantation beträgt der prozentuale Anteil an CD56+ NK-Zellen  $13,24 \pm 10,17\%$  der Gesamt-Lymphozyten. Wie bei der T-Zell-Analyse zeigen sich innerhalb der Thymoglobulin-Gruppe Unterschiede hinsichtlich der Ausgangs-Expression für CD56. Die minimale Expression von CD56+ NK-Zellen vor Transplantation liegt bei  $4,35\%$ , das Maximum bei  $31,88\%$ . Dies ist in Übereinstimmung mit den Normalwerten aus der Literatur zu sehen [102]. An Tag 5 und 10 zeigt sich im Vergleich zu den Ausgangswerten eine signifikante Abnahme der CD56-Expression. Auch hier ist eine Regeneration der NK-Zellen ab Tag  $13,38 \pm 1,21$  zu erkennen. Teilweise sind die Lymphozyten-Populationen nicht für alle Patienten an den entsprechenden Tagen analysiert worden. Deshalb erfolgte beispielsweise an Tag 25 die Berechnung der NK-Zellpopulation nur mit den Werten von drei Patienten. Dies mag zu einer Verzerrung des CD56-Expressions-Mittelwerts ( $2,16 \pm 0,96$ ) geführt haben.



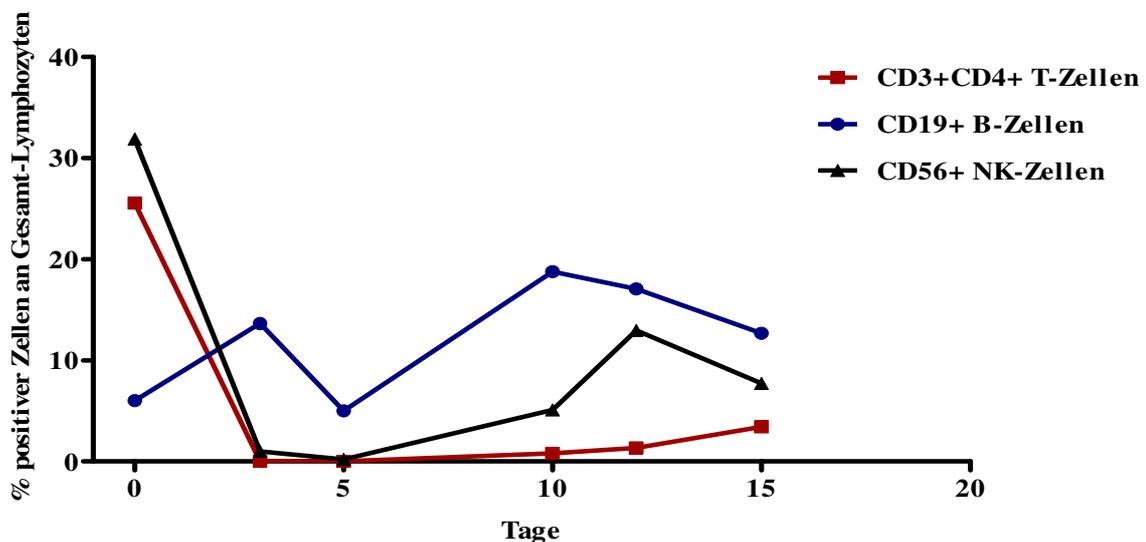


**Abb. 7: B-Lymphozyten werden nicht durch Thymoglobulin depletiert.** Die Oberflächenmoleküle der CD19+ B-Zellen sind nicht das primäre Ziel der Antikörper-Präparationen. Im Gegensatz zur Depletion der CD3+CD4+ T-Zellen und CD56+ NK-Zellen zeigen die B-Lymphozyten eine leichte Expansion.

#### 4.1.1 Exemplarische Darstellung der Lymphozytenverläufe Thymoglobulin-behandelter Patienten nach solider Organtransplantation

Exemplarisch ist die Entwicklung der Lymphozyten-Populationen eines 54-jährigen P/NTx-Patienten nach induktiver Thymoglobulin-Therapie dargestellt (Abbildung 8). Von Geburt an bestand ein Diabetes mellitus Typ1. Bei einer diabetischen Nephropathie entwickelte sich über die Jahre der Zustand einer chronischen, dialysepflichtigen Niereninsuffizienz. Als weitere Diagnosen sind ein arterieller Hypertonus und eine koronare Herzkrankheit mit 2-facher Stentanlage vor zwei Jahren anzuführen. Nach erfolgter Transplantation nahmen die Organe initial ihre Funktion auf. Spender und Empfänger waren CMV-negativ. Am siebten postoperativen Tag kam es jedoch aufgrund einer Transplantat-Pankreatitis zur Revision mit Anlage einer Spül drainage. Daran anschließend machte die andauernde endokrine Pankreasinsuffizienz die Zuführung von Insulin notwendig. Im weiteren Verlauf traten keine Anzeichen einer opportunistischen Infektion zum Vorschein. Gezeigt wird die Analyse der Patienten-PBMCs über einen Zeitraum von 15 Tagen. Direkt nach induktiver Thymoglobulin-Administration ist eine Depletion der CD3+CD4+ T-Zellen wie der CD56+ NK-Zellen zu beobachten. Die CD19+ B-Zellen sind von dieser Depletion nicht betroffen, bei einem undulierenden Verlauf kommt es

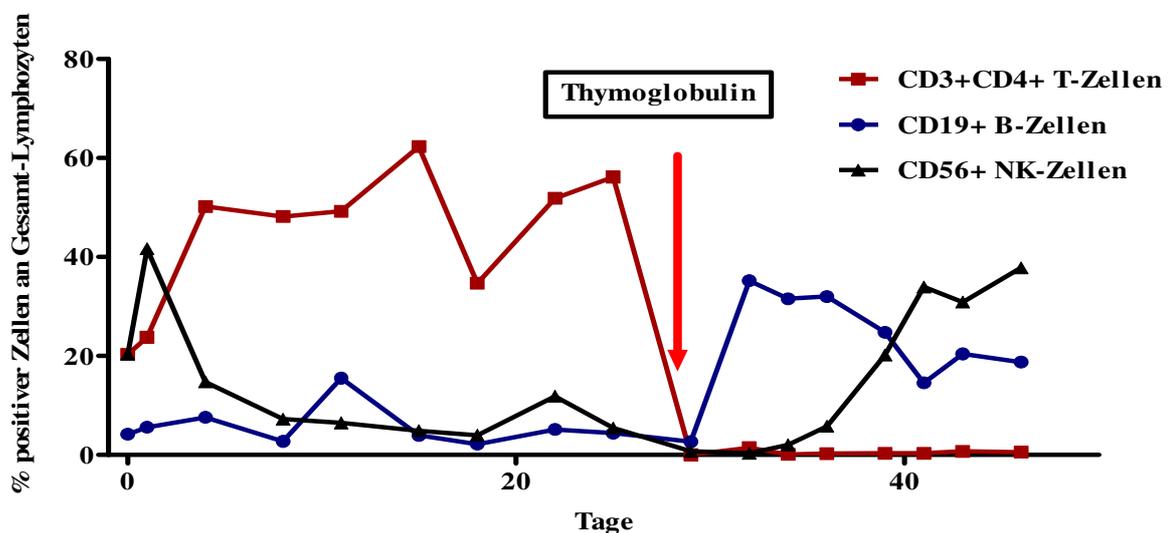
vielmehr zu einer leichten Expansion der B-Lymphozyten. Ab dem postoperativen zehnten Tag ist eine Repopulation der T- und NK-Zellen zu verzeichnen (Abbildung 8).



**Abb. 8:** Depletion der T- und NK-Zellen nach Thymoglobulin-Administration am Beispiel eines P/NTx-Patienten (54 Jahre, m.). Ab Tag 10 nach P/NTx kommt es zu einer Regeneration der einzelnen T-, B- und NK-Zellpopulationen.

Thymoglobulin wurde in acht von neun Fällen als Induktionstherapie nach kombinierter P/NTx oder DDTx eingesetzt. Bei einem Patienten wurde jedoch eine Rejektion nach NTx mit Thymoglobulin therapiert. Abbildung 9 zeigt die Entwicklung der Lymphozyten-Populationen dieses 47-jährigen NTx-Patienten. Nach der Diagnose einer membranproliferativen Glomerulonephritis und einem nicht beherrschbaren Hypertonus war es vor sieben Jahren zur rechtsseitigen Nephrektomie gekommen. Beim Zustand einer chronischen Niereninsuffizienz gestaltete sich bereits ein Jahr zuvor die Hämodialyse als notwendig. Nach OP wies die transplantierte Niere keine Initialfunktion auf. Postinterventionell wurde in der dritten Woche bei insuffizienter Ureterzystoneotomie eine Revision durchgeführt. Nach anfänglicher Immunsuppression mit Prograf, CellCept und Urbason zeigte sich eine unzureichende Abnahme der Nierenretentionswerte (Plasma-Kreatinin > 1,1 mg/dl, Harnstoff > 50 mg/dl). Am postoperativen 27. Tag wurde durch die Biopsie des Nierentransplantats eine akute zelluläre Rejektion (Banff-Ib) diagnostiziert. Die anschließende Virusdiagnostik und der HLA-Antikörper-Test waren negativ. Unter einer Urbasonstoß-Therapie (500 mg) zeigte sich keine Besserung. Daraufhin wurde eine Thymoglobulin-Therapie über fünf Tage durchgeführt, unter der es zu einer Besserung der Transplantat-Funktion kam. Bei bestehender chronischer Leukozytose zeigten sich die zu

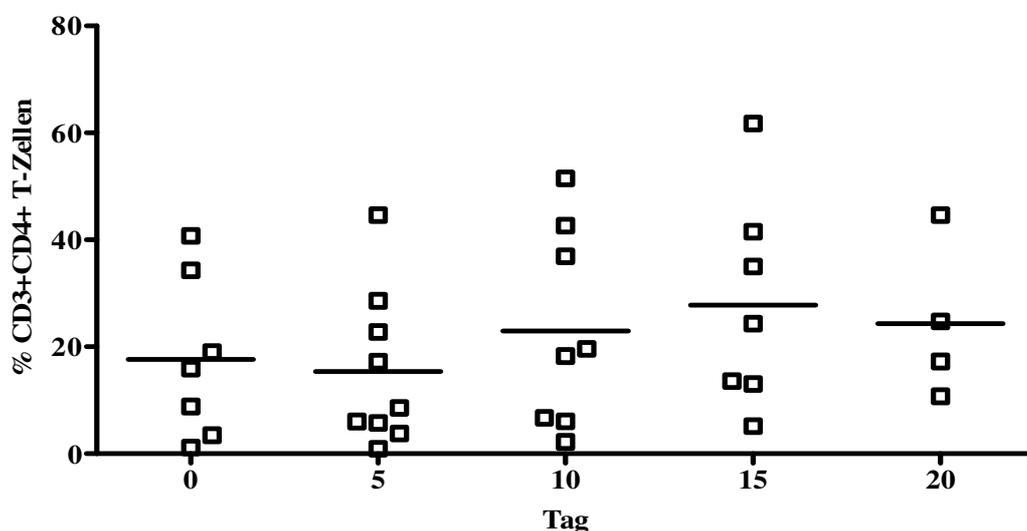
erwartenden Veränderungen einer Leukozytenreduktion und Lymphopenie. Im Verlauf der ersten 25 Tage liegt der prozentuale Anteil an CD3+CD4+ T-Zellen zwischen 20,34% (Tag 0) und 62,33% (Tag 15) der PBMCs. Gleichzeitig kommt es zu einer leichten Abnahme der Expression von CD56+ NK-Zellen, wohingegen sich die CD19+ B-Zellen auf einem relativ konstanten Niveau von  $5,69 \pm 3,77\%$  befinden. Bedingt durch die Thymoglobulin-Applikation am Tag 29 nach OP ist eine Depletion der T- und NK-Zellen zu verzeichnen. Zeitgleich kommt es zu einer Expansion der B-Zellen. Im Verlauf von fünf Tagen sind eine Erholung und eine prozentual deutlich erhöhte Expression der NK-Zellen festzustellen, ohne dass sich das Korrelat einer viralen Infektion finden ließ. Bis zum 17. Tag nach Thymoglobulin-Administration ist keine Repopulation der T-Zellen zu beobachten (Abbildung 9).



**Abb. 9: Anti-Rejektionstherapie mit Thymoglobulin am Beispiel eines NTx-Patienten (47 Jahre, m.).** Nach initialer Standard- Immunsuppression kommt es zu keiner Depletion der CD3+CD4+ T-Zellpopulation. Im Zeitraum von 25 Tagen nimmt die Expression der CD56+ NK-Zellen von 20,39% auf 3,99% der PBMCs ab. Unter der Thymoglobulin Anti-Rejektionstherapie zeigt sich eine Depletion der T-Lymphozyten.

## 4.2 Verlaufsbeobachtung der T-, B- und NK-Zellen nach immunsuppressiver Standard-Therapie

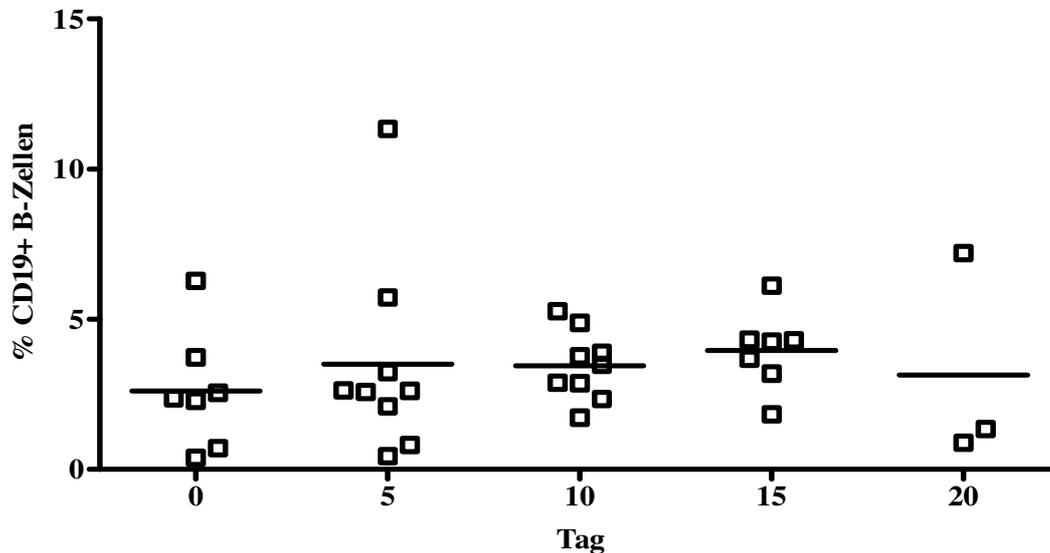
Um die Ergebnisse der FACS-Analyse der Thymoglobulin-Patienten bewerten zu können, wurden die PBMCs der Patienten einer Kontrollgruppe analysiert. Dabei erfolgte die Analyse der Lymphozyten-Populationen der Kontroll-Patienten (n=9) über 20 Tage. Bei gleichbleibendem 5-tägigem Analyse-Intervall fiel der Analyse-Zeitraum damit im Vergleich zur Thymoglobulin-Gruppe kürzer aus. Auch hatten die Patienten der Kontrollgruppe einen kürzeren stationären Aufenthalt. Vor solider Organtransplantation weisen sie einen prozentualen Anteil an CD3+CD4+ T-Zellen von  $17,63 \pm 15,09\%$  der Gesamt-Lymphozyten auf (Abbildung 10). Dabei ist die Expression für CD3+CD4+ bei fünf der Kontroll-Patienten kleiner als 20%. Interessanterweise ist im Beobachtungsverlauf der Anteil an CD3+CD4+ T-Zellen mit  $22,63 \pm 4,54\%$  relativ konstant. Die für die Thymoglobulin-Gruppe in Kapitel 4.1 beschriebene Ausgangsexpression für CD3+CD4+ T-Lymphozyten liegt im Vergleich zur Kontrollgruppe etwas höher ( $21,97 \pm 13,70\%$ ). Bei einem angenommenen Normalwert von 28-57% der PBMCs im gesunden Erwachsenen sind die Expressionen für CD3+CD4+ in beiden Gruppen etwas erniedrigt [102, 103].



**Abb. 10:** Die Standard-Immunsuppression depletiert die CD3+CD4+ T-Zellen nicht. Entwicklung der prozentualen Expression CD3+CD4+ T-Zellen bei Standard-Immunsuppression nach NTx. Es lassen sich keine Unterschiede in der Verlaufsbeobachtung über 20 Tage verzeichnen. (An den Analysetagen wurden die zur Verfügung stehenden Patienten analysiert.)

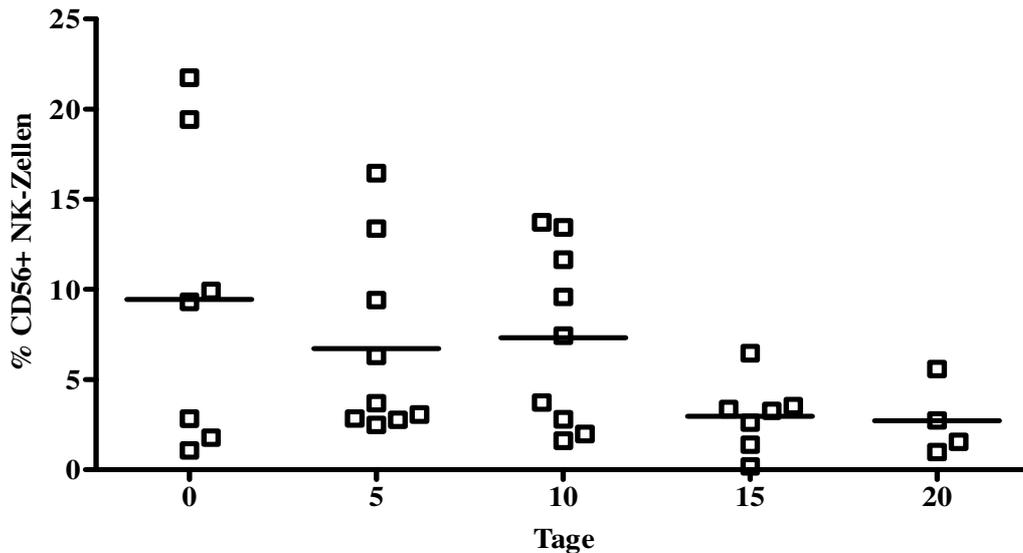
Unter Standard-Immunsuppression zeigt sich ein gleich bleibender Anteil CD19+ B-Zellen an den Gesamt-Lymphozyten (Abbildung 11). Der Ausgangswert liegt bei  $2,62 \pm 2,0\%$  und verändert

sich im Verlauf von 20 Tagen kaum. Diese geringe prozentuale Expression ist im Vergleich zu den B-Zell-Normwerten von 6-19% zu klein. Wie die graphische Darstellung zeigt, konnte wiederum nicht an allen Tagen von neun Patienten-Daten ausgegangen werden, so dass an Tag 20 die Berechnung mit  $n=3$  erfolgte.



**Abb. 11: Keine Veränderungen der prozentualen B-Zell-Anteile in der Kontrollgruppe.** Im Gegensatz zu der B-Zell-Entwicklung nach Thymoglobulin-Induktionstherapie bleiben die CD19+ B-Zellen konstant auf einem Niveau von  $3,37 \pm 2,16\%$  der Gesamt-Lymphozyten.

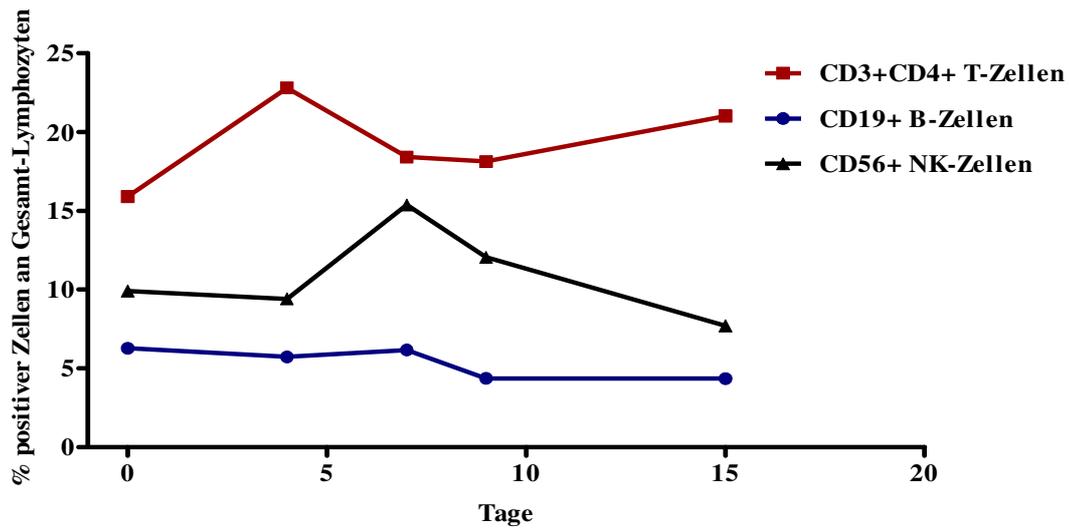
Im selben Zeitraum nimmt der prozentuale Anteil der CD56+ NK-Zellen an den PBMCs ab (Abbildung 12). Bei einem Ausgangswert von  $9,44 \pm 8,4\%$  vor OP zeigt sich eine Regression der NK-Zell-Expression auf  $2,71 \pm 2,1\%$  an Tag 20. Zwischen den einzelnen Patienten bestehen jedoch große interindividuelle Unterschiede. Unter der Annahme, dass 7-31% der PBMCs des Erwachsenen zu den CD56+ NK-Zellen zu zählen sind, kann man bei diesem Wert von einer selektiven Depletion der NK-Zellen sprechen. Die CD56+ NK-Zellen der Thymoglobulin-Patienten werden durch die induktive Immunsuppression hingegen von  $13,24 \pm 10,17\%$  auf  $1,25 \pm 1,1\%$  an Tag 5 depletiert.



**Abb. 12: Abnahme der NK-Zell-Expression unter Standard-Immunsuppression.** Es handelt sich jedoch nicht um eine so starke Depletion wie unter Thymoglobulin-Therapie.

#### 4.2.1 Entwicklung der Lymphozyten-Populationen eines organtransplantierten Patienten unter Standard-Immunsuppression

Als Beispiel aus der Kontrollgruppe zeigt Abbildung 13 die Analyse der isolierten PBMCs eines 46-jährigen Patienten nach NTx. Bevor es zur allogenen Organtransplantation kam, bestand für den Patienten aufgrund zweier bilateraler Schrumpfnieren über sechs Jahre ohne Verzögerung nahm das Transplantat intraoperativ seine Funktion auf. Spender und Empfänger waren IgM- und IgG seronegativ und zeigten keinen Anhalt einer abgelaufenen CMV-Infektion. Am ersten postoperativen Tag war aufgrund erhöhter Nierenretentionswerte die Durchführung einer Hämodialyse notwendig. Während des Beobachtungszeitraums von 15 Tagen sind die prozentualen Anteile der T-, B- und NK-Zellen relativ konstant. Die Expression der CD3+CD4+ T-Zellen beträgt  $19,25 \pm 2,4\%$ , die der CD19+ B-Zellen  $5,38 \pm 2,4\%$  und die der CD56+ NK-Zellen  $10,89 \pm 2,64\%$  der Gesamt-Lymphozyten. Bis auf die niedrigen Anteile an CD3+CD4+ T-Lymphozyten liegen die Werte im unteren Normbereich.

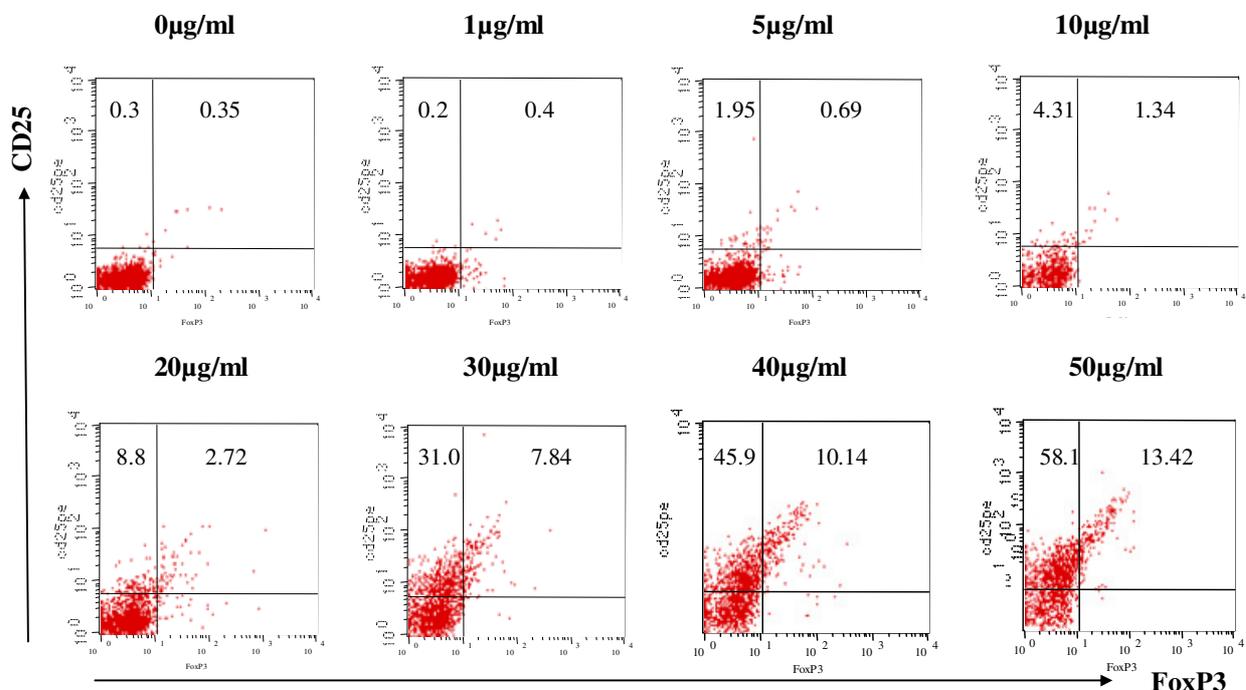


**Abb. 13:** Die Standard-Immunsuppression führt zu keiner verminderten Expression der T-, B- oder NK-Zellen. Beispiel eines Kontroll-Patienten (46 Jahre, m.).

Unter immunsuppressiver Standard-Therapie lässt sich im Gegensatz zu der unter Thymoglobulin-Therapie beobachteten Depletion der T- und NK-Zellen kein vergleichbarer Effekt verzeichnen.

### 4.3 Expansion von CD4+CD25+FoxP3+ T-Zellen nach Inkubation mit Thymoglobulin *in vitro*

In zahlreichen Publikationen sind die möglichen Effekte, die ATG auf die Entwicklung peripherer Lymphozyten hat, diskutiert worden [36-42]. Um den von Lopez et al. [95] beschriebenen Effekt der Expansion CD4+CD25+FoxP3+ T-Zellen nach Administration von Thymoglobulin zu verifizieren, wurden Spender-T-Zellen mit Thymoglobulin inkubiert. Es wurden die PBMCs von vier verschiedenen Spendern verwendet. Nach Zell-Separation wurden zu einer Anzahl von je  $1 \times 10^6$  CD25-depletierten CD4+ T-Zellen unterschiedliche Konzentrationen an Thymoglobulin gegeben (1, 5, 10, 20, 30, 40, 50  $\mu\text{g/ml}$ ). Nach 24-stündiger Inkubation zeigte sich eine Expansion von CD4+CD25+FoxP3+ T-Zellen. Dabei ließ sich in Abhängigkeit von der eingesetzten Thymoglobulin-Konzentration eine unterschiedlich stark ausgeprägte Entwicklung der FoxP3-Expression *in vitro* feststellen. Die höchste FoxP3-Expression wurde bei Inkubation der separierten Zellen mit einer Konzentration von 50  $\mu\text{g/ml}$  Thymoglobulin erzielt. Wie in Abbildung 14 exemplarisch gezeigt, waren im Vergleich zur Null-Kontrolle bei Inkubation mit Thymoglobulin bis zu 13,42% der CD4+ T-Zellen intrazellulär durch FoxP3 anzufärben. Der native Anteil der CD25+FoxP3+ Zellen an CD4+ T-Zellen beträgt hingegen nur bei ein bis zwei Prozent [82, 104].

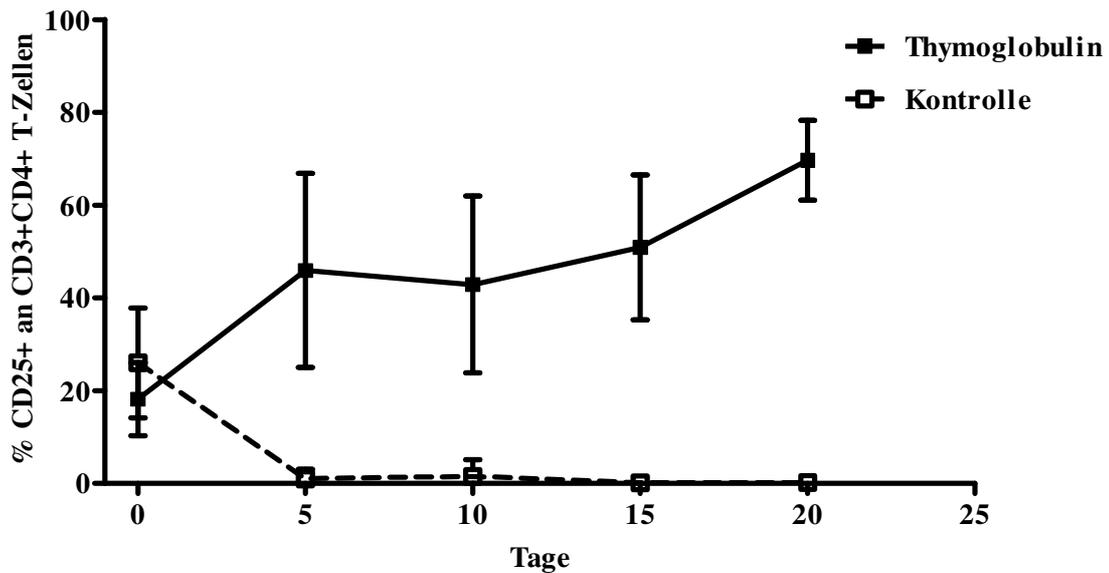


**Abb. 14:** Die Expression von CD25 und FoxP3 auf T-Zellen ist Thymoglobulin-dosisabhängig. CD25-depletierte T-Zellen zeigen nach Inkubation mit Thymoglobulin eine unterschiedlich starke Expression für CD25 und FoxP3. Bei der eingesetzten Konzentration von 50  $\mu\text{g/ml}$  Thymoglobulin war die FoxP3-Expression der CD4+CD25+ T-Zellen mit  $12,8 \pm 2,68\%$  maximal ( $n=4$ ).

## **4.4 Entwicklung der CD25+ T-Zellpopulation nach immunsuppressiver Therapie *in vivo***

### **4.4.1 Die CD25-Expression auf CD3+CD4+ T-Zellen nach Therapie mit Thymoglobulin und Standard-Immunsuppression**

Nach erfolgter Organtransplantation wurden die CD25-Expressionen der CD3+CD4+ T-Zellen von Thymoglobulin-behandelten Patienten (n=9) und von Patienten der Kontrollgruppe (n=9) miteinander verglichen. Der Anteil der CD25-exprimierenden CD3+CD4+ T-Zellen betrug in der Thymoglobulin-Gruppe vor Transplantation (Tag 0)  $18,17 \pm 7,89\%$ . In der Kontrollgruppe war er etwas höher und betrug  $26 \pm 11,87\%$ . Nach Hannet et al. [102] sind im gesunden Individuum 13-24% der T-Lymphozyten CD25+ T-Zellen. In der Publikation von Baecher-Allan et al. [105] werden 6-30% der CD4+ T-Zellen als CD25+ T-Zellen identifiziert. Durch die beiden verschiedenen immunsuppressiven Therapien bedingt lassen sich im Verlauf Unterschiede hinsichtlich der CD25-Expression auf T-Zellen beobachten. Über den Analyse-Zeitraum von 20 Tagen beträgt der durchschnittliche prozentuale Anteil der CD25-exprimierenden CD3+CD4+ T-Zellen  $52,35 \pm 10,4\%$  in der Thymoglobulin-Gruppe. Zwischen minimal  $23,38\%$  und maximal  $77,42\%$  der T-Lymphozyten der einzelnen Patienten exprimieren CD25. Mit Ausnahme einer leichten Regression der CD3+CD4+CD25+ T-Zellen an Tag 10 nimmt die CD25-Expression stetig zu. An Tag 20 nach initialer Immunsuppression ist der Anteil der CD25-exprimierenden CD3+CD4+ T-Zellen auf  $69,68 \pm 8,61\%$  angestiegen. Dies entspricht im Vergleich zum Ausgangswert einer um das Vierfache erhöhten CD25-Expression. In der Kontrollgruppe hingegen liegt der durchschnittliche Anteil der CD25-exprimierenden CD3+CD4+ T-Zellen zwischen Tag 5 und 20 bei deutlich geringeren  $0,73 \pm 0,56\%$ . Indessen fällt die CD25-Expression auf  $0,22 \pm 0,16\%$  an Tag 20 ab. Das entspricht in etwa einer 120-fachen Reduktion der CD3+CD4+CD25+ T-Lymphozyten (Abbildung 15).

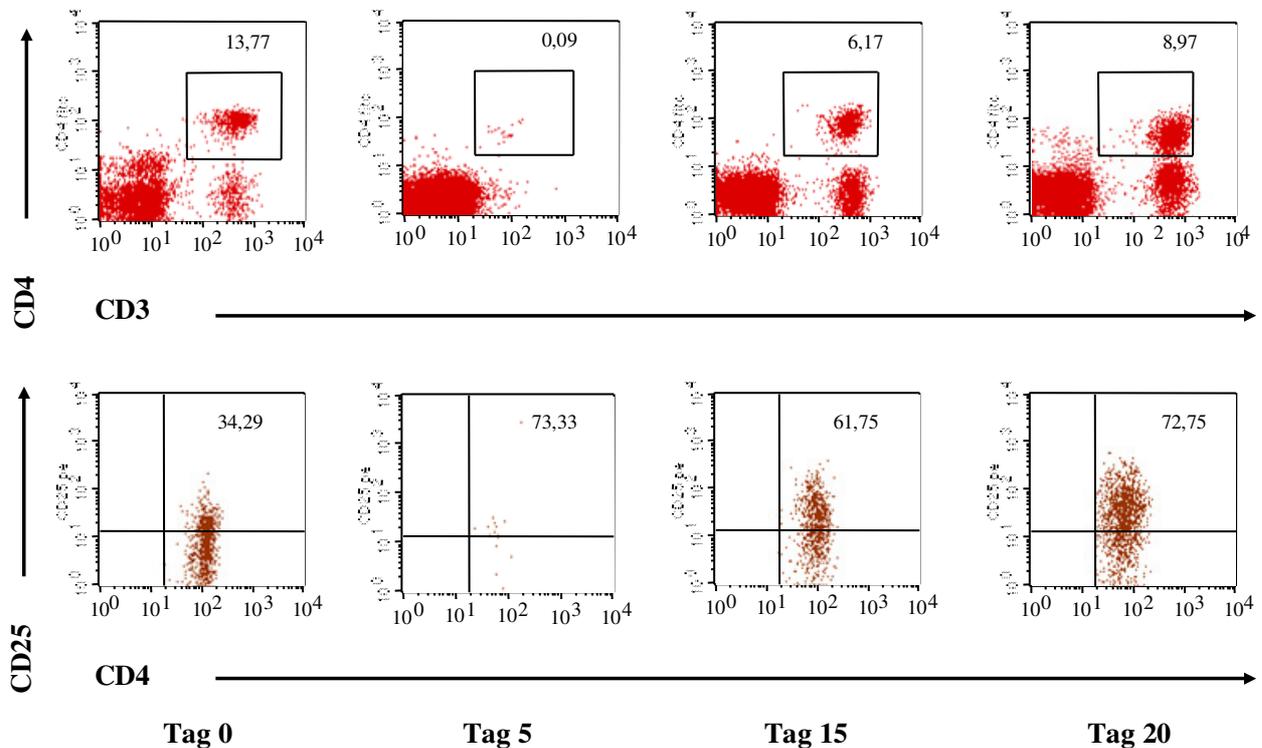


**Abb. 15: Expansion der CD3+CD4+CD25+ T-Zellen nach Thymoglobulin-Therapie.** In der Kontrollgruppe lässt sich im selben Beobachtungszeitraum eine Abnahme der CD25-Expression auf CD3+CD4+ T-Zellen erkennen.

Beim statistischen Vergleich der Expression von CD25 auf CD3+CD4+ T-Zellen lässt sich zwischen den beiden Gruppen postoperativ ein signifikanter Unterschied erkennen ( $p < 0,05$ ). Während an Tag 0 die Unterschiede noch gering sind, beträgt in der Thymoglobulin-Gruppe an Tag 5 der prozentuale Anteil der CD25-exprimierenden CD3+CD4+ T-Zellen bereits  $45,95 \pm 22,58\%$ . Bis zum Tag 20 nimmt die CD25-Expression zu. Konträr dazu verläuft die CD25-Expression der CD3+CD4+ T-Zellen in der Vergleichsgruppe. An den postoperativen Tagen (Tag 5-20) zeigt sich hier eine verminderte CD25-Expression der CD3+CD4+ T-Zellen von durchschnittlich  $2,45 \pm 0,91\%$ . An Tag 5 und 10 sind die Unterschiede zwischen beiden Gruppen mit  $p < 0,001$  signifikant. An Tag 15 ist  $p = 0,002$ , an Tag 20 ist  $p = 0,036$  (Abbildung 16).



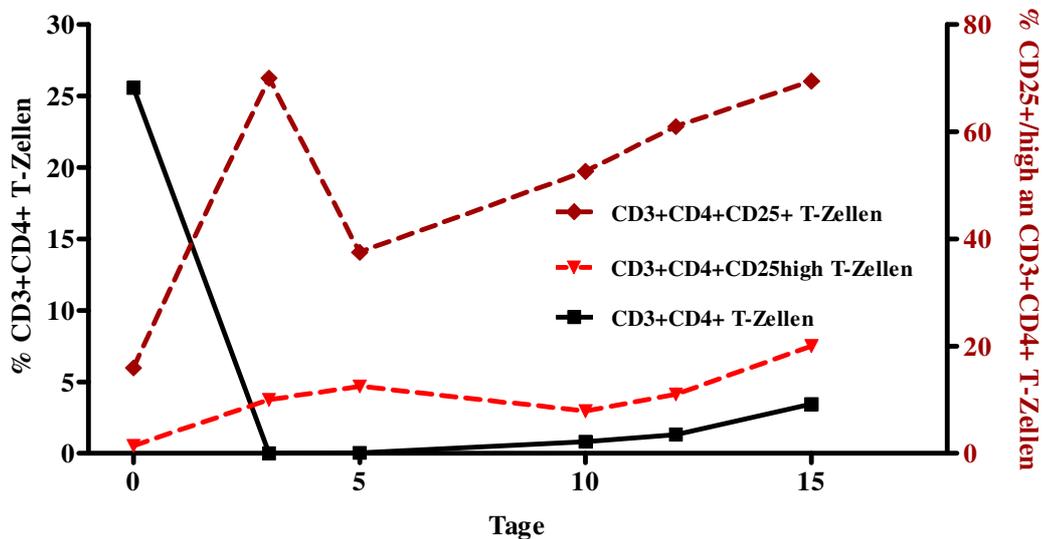
in der Gesamt-Gruppe der Thymoglobulin-behandelten Patienten ist ( $18,17 \pm 7,89\%$ ), kann der prozentuale Anteil an CD25-exprimierenden CD3+CD4+ T-Zellen an Tag 20 als vergleichbar gesehen werden ( $69,68 \pm 8,61\%$ ). Innerhalb der CD3+CD4+ T-Zellpopulation ist eine deutliche Erhöhung der CD25-Expression zu erkennen (Abbildung 17).



**Abb. 17: Depletion der CD3+CD4+ T-Zellen durch Thymoglobulin bei gleichzeitiger Expansion CD25+ T-Zellen.** FACS-Analyse einer induktiv mit Thymoglobulin behandelten P/NTx-Patientin (52 Jahre, w.). Ausgeprägte Depletion der CD3+CD4+ T-Zellen an Tag 5. Die verbleibenden CD3+CD4+ T-Zellen weisen eine verstärkte CD25-Expression zwischen 61,75% und 73,33% auf.

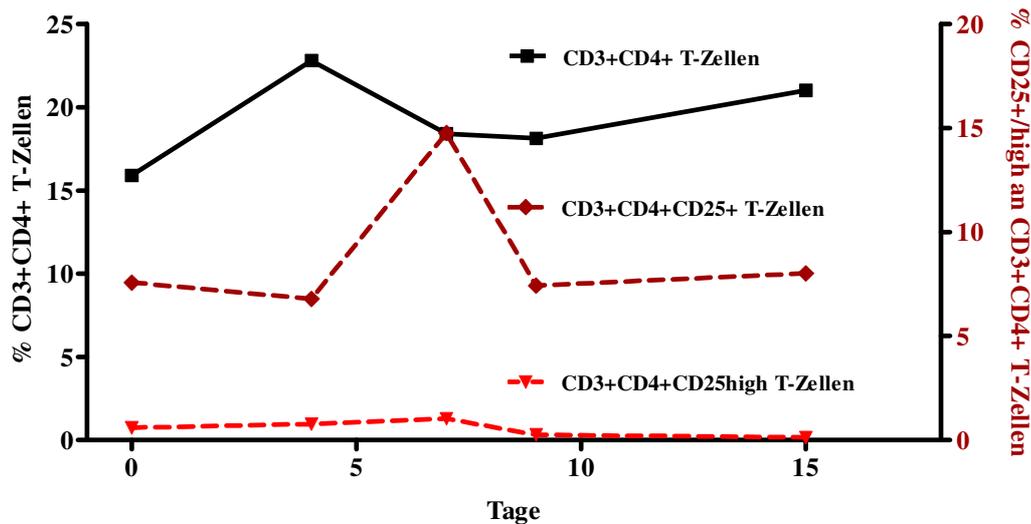
In der folgenden Abbildung 18 wird derselbe P/NTx-Patient wie in Kapitel 4.1.1, Abbildung 8 beschrieben. Exemplarisch ist die Entwicklung der CD3+CD4+ T-Lymphozyten über 15 Tage nach induktiver Thymoglobulin-Therapie dargestellt. Die CD3+CD4+ T-Lymphozyten sind gemäß der „Gating-Strategie“ aus Abbildung 22 in die Subpopulationen der CD25+ und CD25<sup>high</sup> T-Zellen unterteilt. Laut Baechner-Allan et al. [104] ist die Charakterisierung von regulatorischen T-Zellen durch die CD25-Expression nur unzureichend, da auch aktivierte T-Zellen diesen Marker tragen. Die CD25<sup>high</sup>-Expression hingegen scheint Treg-spezifischer zu sein. Nach Thymoglobulin-Administration zeigt sich die bereits in Kapitel 4.1 und 4.2 postulierte Depletion der CD3+CD4+ T-Zellen. Nach Tag 5 kommt es zu einer allmählichen Regeneration der CD3+CD4+ T-Zellen. Interessanterweise zeigt sich hierbei innerhalb der Population der

nicht-depletierten CD3+CD4+ T-Zellen ein Expressions-Anstieg für CD25+ T-Zellen. Bis zu 70% der CD3+CD4+ T-Lymphozyten weisen eine CD25-Expression auf (Tag 3 und 15). Ebenfalls nimmt die CD25<sup>high</sup>-Expression der CD3+CD4+ T-Zellen von 1,43% an Tag 0 auf 20,03% an Tag 15 zu. Der durchschnittliche prozentuale Anteil der CD3+CD4+CD25<sup>high</sup> T-Zellen nach initialer Immunsuppression liegt bei  $10,47 \pm 5,54\%$ .



**Abb. 18:** Expansion der CD3+CD4+CD25<sup>+/high</sup> T-Zellpopulation am Beispiel eines P/NTx-Patienten (54 Jahre, m.) nach Thymoglobulin-Administration. Primärachse (schwarz): prozentualer Anteil CD3+CD4+ T-Zellen an PBMCs. Sekundärachse (rot): prozentualer Anteil der CD25<sup>+/high</sup>-Zellen an CD3+CD4+ T-Zellen.

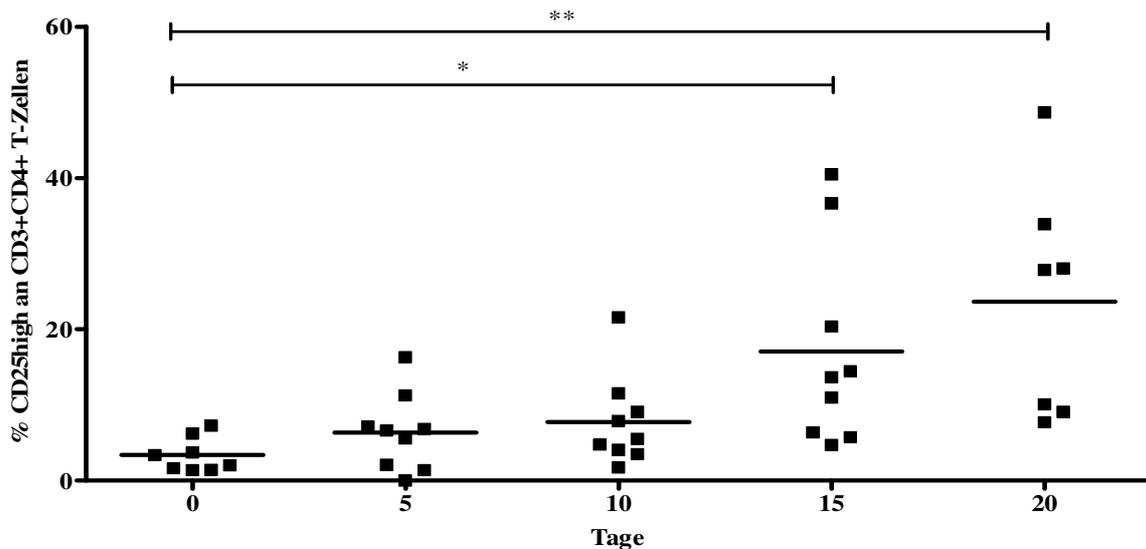
Im Gegensatz dazu steht die Entwicklung der T-Zellpopulationen der nach Standard-Protokoll behandelten Patienten. Abbildung 19 zeigt diese exemplarisch anhand des NTx-Patienten aus Kapitel 4.2.1. Über die 15-tägige Analysedauer befindet sich der prozentuale Anteil der CD3+CD4+ T-Zellen auf einem zu den anderen Patienten der Kontrollgruppe vergleichbarem Niveau von  $19,25 \pm 2,4\%$  (Kontrollgruppe:  $22,63 \pm 4,54\%$ ). Anders als nach der Immunsuppression durch Thymoglobulin ist eine anteilige Depletion der CD3+CD4+ T-Zellen nicht zu verzeichnen. Jedoch beträgt der Anteil an CD25+ T-Zellen nur  $8,91 \pm 2,95\%$ , wohingegen die CD3+CD4+ T-Zellen des P/NTx-Patient aus Abbildung 18 eine CD25-Expression von  $51,09 \pm 19,21\%$  aufweisen. Bedingt durch die Immunsuppression nach Standard-Protokoll sind CD3+CD4+CD25<sup>high</sup> T-Lymphozyten kaum existent ( $0,56 \pm 0,33\%$ ). Im Vergleich zu Patienten nach Immunsuppression mit Thymoglobulin ist der Anteil an CD3+CD4+ T-Zellen zwar höher, diese sind jedoch nicht CD25<sup>high</sup>.



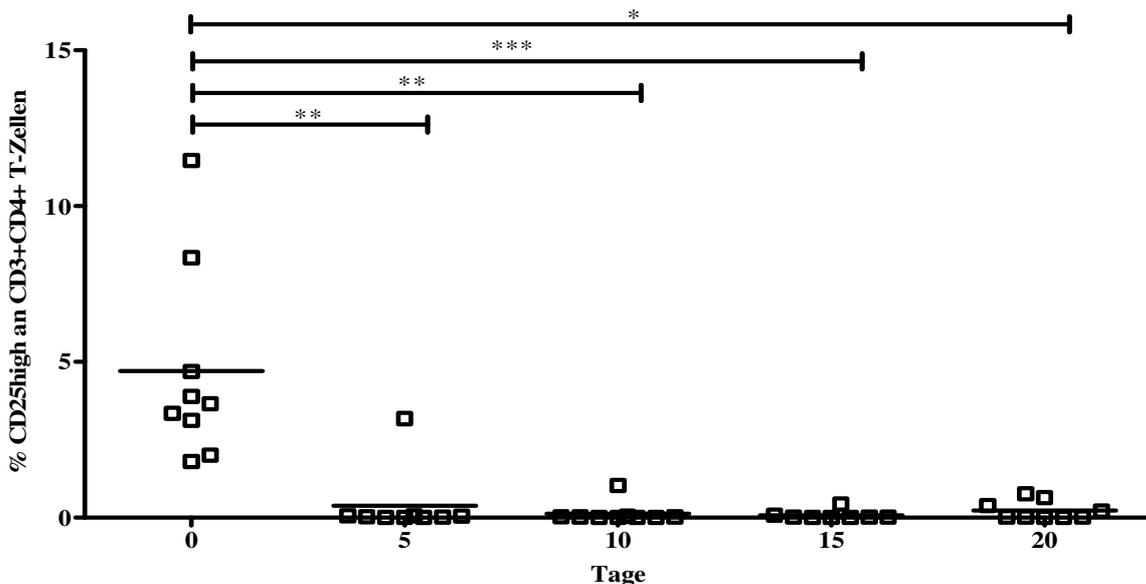
**Abb. 19: Keine Zunahme der CD25<sup>high</sup>-Expression auf CD3+CD4+ T-Zellen nach Standard-Immunsuppression.** Exemplarische Darstellung eines 46-jährigen Patienten nach NTx. Primärachse (schwarz): prozentualer Anteil CD3+CD4+ T-Zellen an PBMCs. Sekundärachse (rot): prozentualer Anteil der CD25<sup>high</sup>-Zellen an CD3+CD4+ T-Zellen.

#### 4.4.3 CD25<sup>high</sup> und CD127<sup>low</sup> T-Zellen expandieren nach der Administration von Thymoglobulin

Zunächst werden in Abbildung 20 und 21 die sich im Verlauf entwickelnden Unterschiede zwischen beiden Gruppen hinsichtlich der CD25<sup>high</sup>-Expression auf CD3+CD4+ T-Zellen graphisch verdeutlicht. Vor Immunsuppression ist der Ausgangswert für die CD25<sup>high</sup>-Expression zwischen beiden Gruppen noch vergleichbar. In der Thymoglobulin-Gruppe beträgt er  $3,39 \pm 2,26\%$ , in der Kontrollgruppe  $4,7 \pm 3,18\%$ . In der Verlaufsbeobachtung nimmt die Expression für CD25<sup>high</sup> auf den T-Zellen in der Thymoglobulin-Gruppe jedoch zu. An Tag 15 und 20 sind die CD25<sup>high</sup>-Expressionen im Vergleich zum Tag vor Thymoglobulin-Applikation signifikant voneinander abweichend. Dahingegen weisen die nach Standard-Protokoll immunsupprimierten Patienten an allen Folgetagen im Vergleich zu dem korrespondierenden Wert vor OP signifikant verminderte CD25<sup>high</sup>-Expressionen auf. An Tag 20 beispielsweise beträgt in der Thymoglobulin-Gruppe der Anteil der CD25<sup>high</sup>-exprimierenden CD3+CD4+ T-Zellen ein 64-Faches des Wertes der Patienten der Kontrollgruppe. Nach Transplantation liegt der durchschnittliche prozentuale Anteil der CD3+CD4+CD25<sup>high</sup> T-Zellen der Patienten der Thymoglobulin-Gruppe bei  $13,7 \pm 7,06\%$ . Es exprimieren hingegen nur  $0,2 \pm 0,56\%$  der CD3+CD4+ T-Lymphozyten der Patienten der Kontrollgruppe CD25<sup>high</sup>.



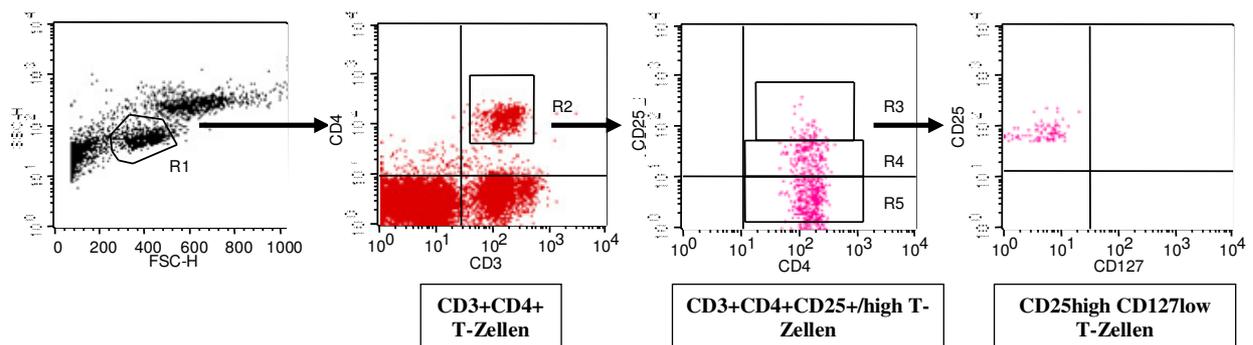
**Abb. 20: Thymoglobulin führt zu einem Anstieg der CD25<sup>high</sup>-Expression.** An Tag 0 sind 3,39±2,26%, an Tag 15 17,06±13,19%, an Tag 20 23,63±15,36% der CD3+CD4+ T-Lymphozyten CD25<sup>high</sup>. (\*p<0,05, \*\*p<0,01) (An den Analysetagen wurden die zur Verfügung stehenden Patienten analysiert.)



**Abb. 21: Abnahme der prozentualen CD25<sup>high</sup>-Expression unter Standard-Immunsuppression.** Im Vergleich zum Ausgangswert besteht an allen Tagen ein signifikanter Unterschied hinsichtlich der CD25<sup>high</sup>-Expression auf CD3+CD4+ T-Zellen. (\*p<0,05, \*\*p<0,01, \*\*\* p<0,001)

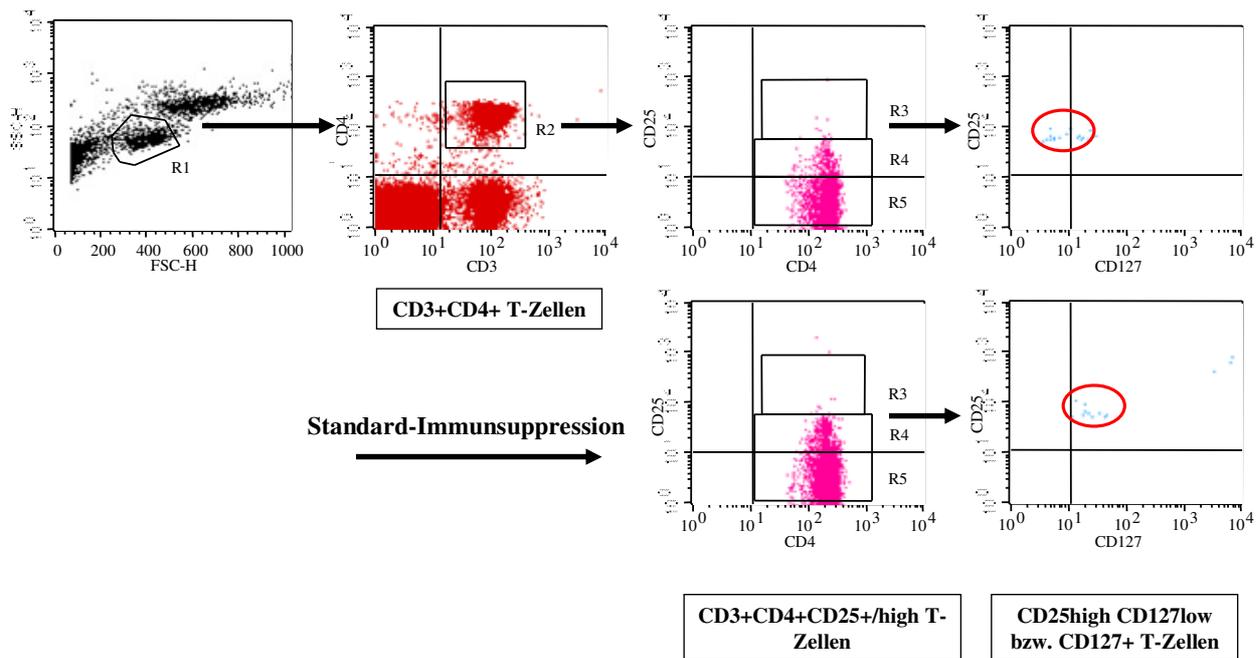
T-Zellen mit regulatorischen Eigenschaften sind nicht nur durch die Expression von CD25<sup>+</sup>/<sup>high</sup> charakterisiert, sondern auch durch die Expression von CD127<sup>low</sup>. Im Verlauf der Studie konnte die Färbung mit einem gegen das Oberflächenmolekül CD127 gerichteten Antikörper implementiert werden. Die FACS-„Gating-Strategie“ ist in Abbildung 22 dargestellt. Dabei

handelt es sich um die Punktwolkenanalyse der Lymphozyten eines 24-jährigen Mannes nach DDTx. Dieser wurde über fünf Tage induktiv mit Thymoglobulin behandelt. Die Patienten-Verweildauer im Krankenhaus betrug 34 Tage. Exemplarisch gezeigt werden die T-Zellpopulationen am Tag 15 nach Transplantation. Die CD3+CD4+ T-Lymphozyten lassen sich in CD25-, CD25+ und CD25<sup>high</sup> T-Zellen unterteilen. Die CD3+CD4+CD25<sup>high</sup> T-Zellen weisen eine Expression für CD127<sup>low</sup> auf.



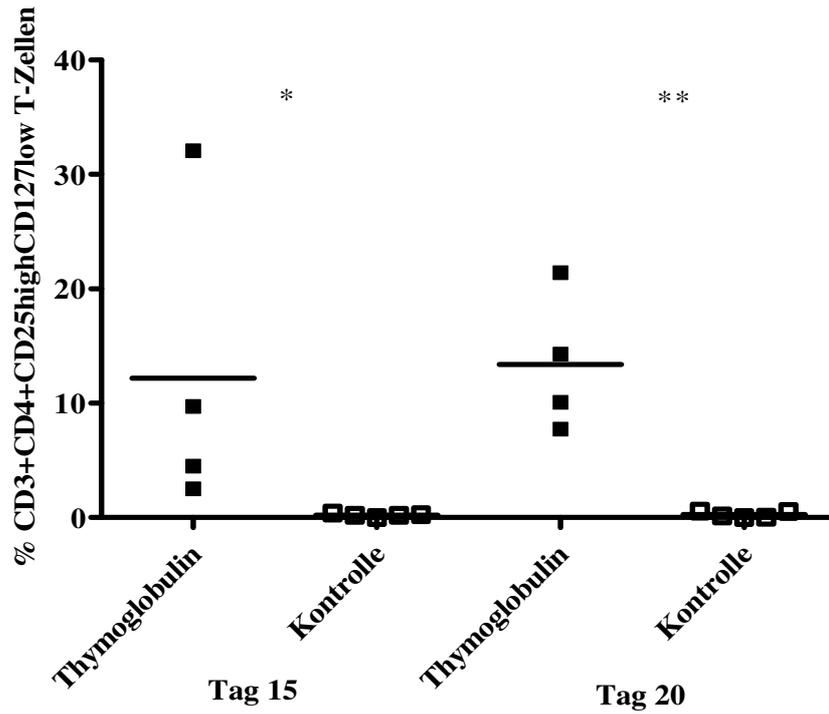
**Abb. 22:** „Gating-Strategie“ für CD3+CD4+CD25<sup>high</sup>CD127<sup>low</sup> T-Zellen am Beispiel eines Thymoglobulin-behandelten Patienten. Von dem „Lymphozyten-Gate“ (R1) ausgehend, lässt sich die Untergruppe der CD3+CD4+ T-Zellen (R2) isolieren. Die Felder R3-R5 beziehen sich auf die CD3+CD4+ T-Zellen aus R2. Innerhalb der für CD4 und CD25 angefärbten T-Zellen zeigt die Population der CD25<sup>high</sup> Zellen (R3) eine Expression für CD127<sup>low</sup>.

Exemplarisch sind die CD3+CD4+CD25<sup>high</sup> und CD127<sup>low</sup> T-Zellen eines Patienten aus der Kontrollgruppe an Tag 0 und an Tag 15 nach NTx gezeigt (Abbildung 23). Hierbei handelt es sich um die FACS-Analyse des bereits in Kapitel 4.2.1 und 4.4.2 vorgestellten Patienten. Wie die Abbildung verdeutlicht, weist der geringe prozentuale Anteil an CD3+CD4+CD25<sup>high</sup> T-Lymphozyten vor Transplantation eine Expression für CD127+ wie auch CD127<sup>low</sup> auf. Bemerkenswerterweise lässt sich feststellen, dass nach immunsuppressiver Standard-Therapie die wenigen verbleibenden CD3+CD4+CD25<sup>high</sup> T-Zellen ausschließlich CD127+ sind.



**Abb. 23: Expressions-Verschiebung der  $CD3+CD4+CD25+^{high}$  T-Zellen von  $CD127^{low}$  zu  $CD127+$ . CD127-Expression eines Kontroll-Patienten vor (Tag 0) und nach Immunsuppression (Tag 15).**

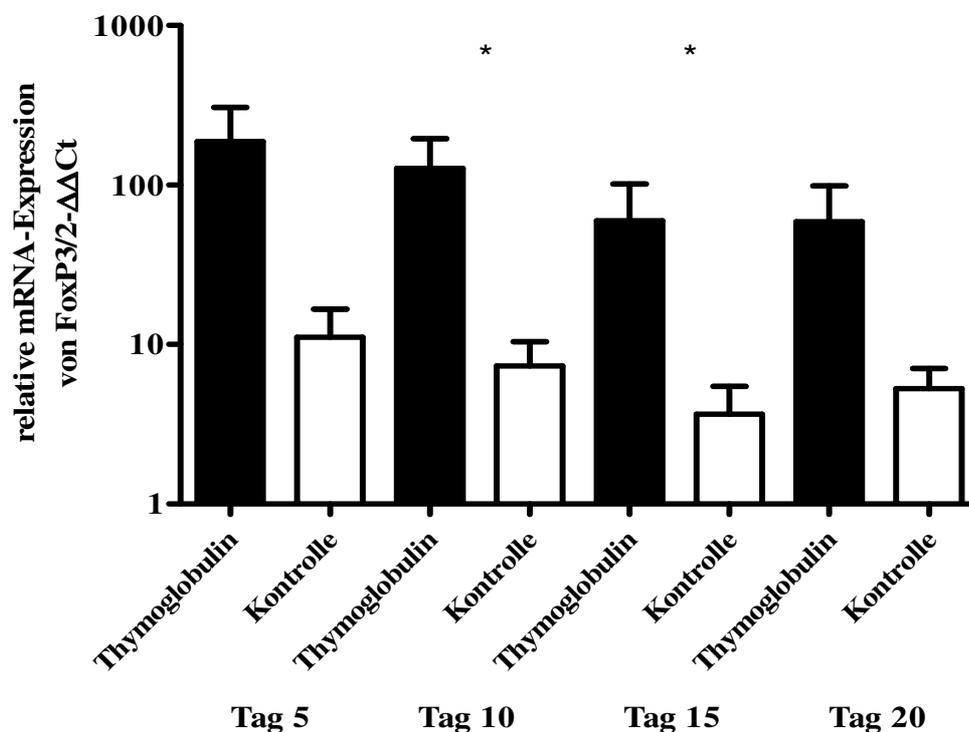
Im Vergleich der  $CD127^{low}$ -Expression beider Gruppen zeigt sich, dass vor Immunsuppression  $3,19 \pm 2,73\%$  der  $CD3+CD4+$  T-Zellen der Patienten aus der Thymoglobulin-Gruppe  $CD127^{low}$  exprimieren. In der Kontrollgruppe sind es  $3,02 \pm 2\%$ . Dies entspricht in beiden Gruppen beinahe den prozentualen Anteilen an  $CD3+CD4+CD25^{high}$  T-Lymphozyten ( $3,39 \pm 2,26\%$  und  $4,7 \pm 3,18\%$ ). Nach Thymoglobulin-Therapie weisen die T-Zellen der Patienten eine  $CD127^{low}$ -Expression von durchschnittlich  $8,78 \pm 5,56\%$  auf, in der Kontrollgruppe sind  $0,35 \pm 0,2\%$   $CD127^{low}$ . Für die Tage 15 und 20 ergeben sich in der Gegenüberstellung signifikante Unterschiede für die  $CD3+CD4+CD25^{high}CD127^{low}$  T-Zellpopulation (Abbildung 24). Die Färbung mit dem Antikörper gegen CD127 konnte bei  $n=4$  Patienten aus der Thymoglobulin-Gruppe und  $n=5$  Kontroll-Patienten implementiert werden.



**Abb. 24: Immunsuppression mit Thymoglobulin führt zur vermehrten Expression von CD127<sup>low</sup> T-Zellen.** Die CD127<sup>low</sup>-Expression ist in der Thymoglobulin-Gruppe im Vergleich zur Kontrolle an den Tagen 15 und 20 signifikant erhöht. (\*p<0,05, \*\*p<0,01)

#### 4.5 FoxP3-Expression in der real-time RT-PCR

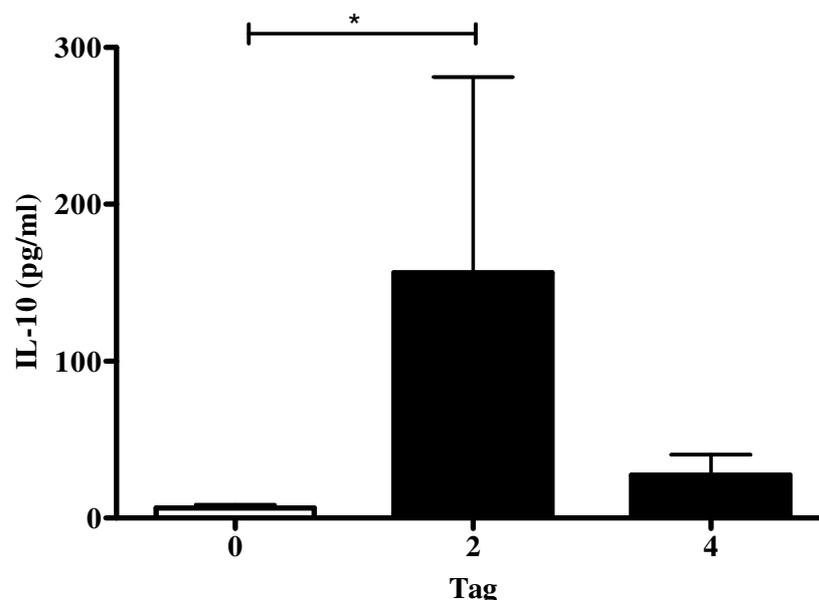
FoxP3 gilt als essentieller Transkriptionsfaktor regulatorischer T-Zellen [82]. Im Gegensatz zur Expressions-Analyse der oberflächlichen Zellproteine CD3, CD4, CD25 und CD127 im FACS, erfolgte die Analyse der FoxP3-Expression auf PCR-Ebene. Die entsprechend dem Protokoll aufbereiteten PBMCs (Kapitel 3.4 und 3.9.2) ausgewählter Patienten wurden der real-time RT-PCR zugeführt. Dabei wurde die relative mRNA-Expression für CD3, CD25 und FoxP3 durch den Bezug auf das nicht regulierte „Housekeeping-Gene“ HPRT bestimmt. Da Thymoglobulin die peripheren T-Lymphozyten depletiert, wurde die CD25 und FoxP3-mRNA-Expression zu der von CD3 relativiert. Die Ergebnisse aus Abbildung 25 zeigen demnach die relative FoxP3-Expression aller CD25+ T-Lymphozyten. Es konnten n=6 Patienten aus der Thymoglobulin-Gruppe und n=4 Patienten aus der Kontrollgruppe analysiert werden. Nach primärer Immunsuppression zeigt sich in der Messung über 20 Tage in den Proben der Thymoglobulin-Patienten eine im Verhältnis zur CD3-mRNA erhöhte Expression von FoxP3. An Tag 10 ist  $p=0,019$ , an Tag 15 ist  $p=0,02$ . Damit ist an beiden Tagen der Unterschied hinsichtlich der FoxP3-Expression zwischen Thymoglobulin- und Kontrollgruppe signifikant (Abbildung 25).



**Abb. 25: Signifikant erhöhte FoxP3-Expression nach Thymoglobulin-Therapie.** An allen bezeichneten Tagen sind Unterschiede bezüglich der relativen mRNA-Expression für FoxP3 zwischen Thymoglobulin-behandelten Patienten und Kontroll-Patienten existent. (\* $p<0,05$ )

#### 4.6 IL-10 Level nach Administration von Thymoglobulin

Nach Stimulation können CD4+CD25+ Tregs die Zytokine IL-4, IL-10 und TGF- $\beta$  bilden (Kapitel 1.7, Abbildung 2). Diese Zytokine werden u.a. für die regulatorische Effektorfunktion von T-Zellen verantwortlich gemacht. Bonnefoy-Berard et al. [94] beschreiben die durch ATG bewirkte Stimulierung der IL-2, IFN- $\gamma$  und TNF- $\alpha$ -Synthese. IL-2 spielt für die Treg-Funktion eine entscheidende Rolle, so ist z. B. die Suppression der primären T-Zell-Antwort bei Fehlen des IL-2-Stimulus nicht möglich (Kapitel 1.7). Feng et al. [97] detektierten nach der *in vitro* Inkubation von PBMCs mit ATG in den Serum-Überständen ein von IL-10 dominiertes Zytokin-Sekretionsprofil. Es wird vermutet, dass IL-10 zur Generierung von regulatorischen T-Zellen beitragen kann. Erstaunlicherweise zeigte in der vorliegenden Untersuchung die exemplarische Zytokin-Analyse der Seren von fünf mit Thymoglobulin behandelten Patienten keine Konzentrationserhöhung für die Zytokine IL-2, IL-4, IL-5, TNF und IFN- $\gamma$ . Jedoch war durchflusszytometrisch eine temporäre Erhöhung der IL-10-Serumspiegel an Tag 2 und 4 nach Transplantation festzustellen, was Abbildung 26 veranschaulicht. Bei der Gegenüberstellung zu dem Wert vor Operation (Tag 0) wurde an Tag 2 eine durchschnittliche IL-10-Konzentration von  $157 \pm 108$  pg/ml im Serum gemessen, wohingegen die Ausgangskonzentration bei  $6 \pm 2$  pg/ml lag ( $p=0,029$ ). An Tag 4 ist ein Abfallen der IL-10-Konzentration auf  $27 \pm 11$  pg/ml zu beobachten.



**Abb. 26: Erhöhte IL-10-Konzentrationen im Serum Thymoglobulin-behandelter Patienten.** Am Beispiel ausgewählter Patienten ist an Tag 2 und 4 nach Thymoglobulin-Administration eine erhöhte Serumkonzentration von IL-10 zu detektieren ( $n=5$ ).

## 5. Diskussion

Polyklonale Antikörper werden in der immunsuppressiven Therapie mit dem primären Ziel der Suppression alloreaktiver T-Lymphozyten eingesetzt. Diese spielen eine entscheidende Rolle bei der Vermittlung einer potentiellen Abstoßungsreaktion [36]. Durch die Administration dieser Antikörper können akute Abstoßungskrisen vermieden werden, chronischen Rejektionen wird durch sie vorgebeugt [16, 106]. In der vorliegenden Arbeit wurde *in vitro* und *in vivo* gezeigt, welche Effekte die Administration des polyklonalen Antikörpers Thymoglobulin auf humane Zellpopulationen hat. In acht von neun Fällen wurde Thymoglobulin als Induktionstherapie bei kombinierter P/NTx und DDTx verwendet. In einem Fall wurde eine akute Abstoßungsreaktion nach NTx mit Thymoglobulin therapiert. Vor und nach Administration des Antikörpers wurden die T-, B- und NK-Zellpopulationen organtransplantierter Patienten durchflusszytometrisch analysiert. Die Beobachtung konzentrierte sich dabei auf die Population CD3+CD4+CD25+<sup>high</sup> T-Zellen. Durch Lopez et al. [107] war nach Inkubation mit Thymoglobulin die Expansion dieser Zellpopulation *in vitro* gezeigt worden. In der vorliegenden Arbeit sollten diese Ergebnisse nicht nur bestätigt, sondern auch zum ersten Mal an *in vivo* generierten Daten demonstriert werden. Nach der immunsuppressiven Therapie durch Thymoglobulin war initial bei allen Patienten das Auftreten einer Lymphopenie zu verzeichnen. Es konnte allerdings beobachtet werden, dass durch die Induktionstherapie unter den nicht-depletierten T-Lymphozyten der prozentuale Anteil an CD3+CD4+CD25+<sup>high</sup> T-Zellen signifikant erhöht war. Diese T-Zellen wurden mittels der Expression von FoxP3 oder CD127<sup>low</sup> als Tregs identifiziert. Dabei wurde festgestellt, dass ausschließlich die T-Lymphozyten der mit Thymoglobulin-behandelten Patienten die Treg-spezifischen Oberflächenmarker exprimierten.

## 5.1 Die Wirkung von Thymoglobulin *in vitro*

Die in Kapitel 4.3 dargestellten *in vitro* Versuche, bestätigen den von Lopez et al. [95] und Feng et al. [97] gezeigten Effekt von Anti-Thymozyten-Globulin (ATG). Wie bereits Lopez et al. demonstrierten, führt die Inkubation von Spender-PBMCs mit dem polyklonalen Antikörper ATG zu einer Zunahme der CD25-Expression auf T-Zellen. Die Autoren gehen dabei von einer Expansion CD4+CD25+FoxP3+ Tregs durch Konversion von CD4+CD25-FoxP3- zu CD4+CD25+FoxP3+ T-Zellen aus. Eine Induktion im Sinne einer Proliferation ist dabei weniger zu beobachten. Auch Feng et al. hatten gezeigt, dass aus Kaninchen gewonnenes ATG im Gegensatz zu dem aus Pferdeserum isolierten ATG zu einer Expansion funktioneller Tregs *in vitro* führt. In unseren *in vitro* Versuchen wurden anstelle von PBMCs separierte CD4+CD25- T-Lymphozyten mit Thymoglobulin inkubiert. Mit steigenden Thymoglobulin-Konzentrationen nahm der prozentuale Anteil an CD4+CD25+FoxP3+ T-Zellen zu. Ohne Thymoglobulin war eine Zunahme dieser Zellpopulation nicht detektierbar. Bei der eingesetzten Konzentration von 50µg/ml war eine maximale Expansion der CD4+CD25+FoxP3+ T-Zellen zu erkennen. Im Vergleich dazu war bei einer verwendeten Thymoglobulin-Konzentration von 10µg/ml die FoxP3-Expression deutlich niedriger. Die in der aufgeführten Literatur beschriebene Expansion der CD4+CD25+FoxP3+ T-Zellen wurde für Dosierungen von 10µg/ml Thymoglobulin beschrieben. Dabei wurde eine bei Konzentrationen von 50µg/ml einsetzende Sättigung der Antikörper-PBMC-Bindung beobachtet. Bei höheren Thymoglobulin-Dosierungen nahm die Expression für FoxP3 ab. In dem vorliegenden Versuchsaufbau wurden die FoxP3+ T-Zellen nicht auf ihre Funktionalität überprüft, wohingegen die oben genannten Autoren zeigen konnten, dass die *in vitro* generierten CD4+CD25+FoxP3+ T-Zellen in einer „mixed lymphocyte reaction“ (MLR) suppressiv auf Alloantigene wirkten und damit Treg-spezifische Eigenschaften besaßen.

## 5.2 Die Wirkung von Thymoglobulin *in vivo*

Entsprechend der beobachteten Modulation der T-Zellen *in vitro* sollte versucht werden, ob sich die Ergebnisse *in vivo* reproduzieren ließen. Um den Einfluss von Thymoglobulin auf Lymphozyten-Populationen zu verdeutlichen, wurden im Folgenden die T-, B- und NK-Zellen organtransplantierten Patienten nach immunsuppressiver Therapie durch Thymoglobulin

durchflusszytometrisch analysiert. Die Ergebnisse dieser Arbeit bestätigen, dass es nach Induktions-, wie auch nach Anti-Rejektionstherapie durch Thymoglobulin, zu einer Depletion peripherer Lymphozyten im Blut kommt. Wie in Kapitel 4.1 demonstriert, scheint davon primär die Population der T-Lymphozyten betroffen zu sein. In der durchgeführten FACS-Analyse zeigte sich dies anhand der Depletion der CD3+CD4+ T-Zellen von  $21,97 \pm 13,70\%$  vor Immunsuppression auf  $1,11 \pm 1,87\%$  an Tag 5. Im weiteren Verlauf kam es langsam zu einer Regeneration der T-Lymphozyten (Abbildung 5). Diese Beobachtungen stehen im Einklang mit den Veröffentlichungen von Bestard et al. [108], wobei die Depletion zytotoxischer CD8+ T-Zellen in der vorliegenden Arbeit nicht untersucht wurde. Ebenfalls unterlagen die peripheren NK-Zellen der Depletion durch Thymoglobulin (Abbildung 6). Zu der apoptotischen Wirkung polyklonaler Antikörper auf CD56+ NK-Zellen veröffentlichten erst kürzlich Stauch et al. [109] eine Studie. Demnach ist allein der Fc-Teil von ATG ausreichend, um über eine Bindung an Fc- $\gamma$ -RIII zur NK-Zell-Apoptose zu führen. Entsprechend den Beobachtungen aus Kapitel 4.1 unterlagen die B-Zellen hingegen einer leichten Expansion. Ein möglicher Mechanismus hierfür mag die in den Seren gemessene erhöhte Konzentration an IL-10 sein (Kapitel 4.6 und 5.3). IL-10 kann B-Lymphozyten zur Proliferation und zur Differenzierung zu antikörperproduzierenden Zellen anregen. Da Thymoglobulin jedoch auch Antikörper gegen B-Lymphozyten aufweist [43], ist die vermehrte Expression von CD19+ B-Zellen nicht vollständig erklärbar. Louis et al. [110] wiesen zwar auf die T- und NK-Zell-depletierende Wirkung von Anti-Lymphozyten-Globulin (ALG) hin, deuteten aber nur an, dass die B-Zellpopulation von der Depletion durch den polyklonalen Antikörper ausgenommen werden könne. Es bleibt zu folgern, dass die B-Zell-Expansion nach Thymoglobulin-Applikation einer *in vitro* Überprüfung bedarf. Konträr dazu zeigte sich in den Seren der Patienten der Kontrollgruppe nach Immunsuppression ein relativ konstanter prozentualer Anteil der T- und B-Zellen an der Gesamtzahl der Lymphozyten (Kapitel 4.2). Jedoch war eine Regression der NK-Zell-Expression von einem Ausgangswert von  $9,44 \pm 8,4\%$  vor OP auf  $2,71 \pm 2,1\%$  an Tag 20 festzustellen (Abbildung 12). Im Vergleich mit der Literatur [102] fällt in der Thymoglobulin- wie auch in der Kontrollgruppe der Anteil an T-Zellen etwas gering aus. Laut Baecher-Allan et al. [104] weisen ca. die Hälfte der im humanen Blut zirkulierenden mononukleären Zellen eine CD4+ Expression auf. Ein möglicher Erklärungsansatz für den von den zitierten Arbeiten leicht abweichenden prozentualen Anteile an T-Zellen mag eine zu Grunde liegende unterschiedliche „Gating-Strategie“ und eine in manchen Fällen vorausgegangene immunsuppressive Therapie sein.

Während des Analyse-Zeitraums von  $28,89 \pm 11,34$  Tagen kam es in der Thymoglobulin-Gruppe zu einer langsamen Regeneration der T-Lymphozyten. Hierbei erfuhr die CD3+CD4+ T-Zellpopulation eine Modulation. Wie in Kapitel 4.4 dargestellt, zeigte die Patienten-Analyse der Thymoglobulin-Gruppe nach Immunsuppression eine signifikant erhöhte Expression CD3+CD4+CD25+ T-Zellen. Sakaguchi et al. [73] hatten diese CD25-exprimierenden T-Zellen als Tregs kategorisiert. Laut Literatur zählen 5-10% der zirkulierenden CD4+ T-Zellen zu den CD25+ Tregs [74, 75]. Hierbei ist jedoch anzumerken, dass CD25 nicht nur auf Tregs exprimiert wird, sondern auch auf aktivierten Zellen, denen die regulatorische Funktion fehlt. Die beiden im FACS analysierten Patientenkohorten wiesen vor initialer Immunsuppression folgende prozentuale Anteile an CD3+CD4+CD25+ T-Lymphozyten auf: in der Thymoglobulin-Gruppe konnten  $18,17 \pm 7,89\%$  der CD3+CD4+ T-Zellen als CD25-exprimierende T-Zellen identifiziert werden. In der Kontrollgruppe zählten  $26 \pm 11,87\%$  der CD3+CD4+ T-Zellen zu den CD25+ T-Zellen. Damit entspricht den CD25+ T-Zellen in der Thymoglobulin-Gruppe ein Anteil von ca. 4% der zirkulierenden Lymphozyten. In der Kontrollgruppe liegt ihr Anteil bei ca. 4,6%. Im Vergleich zu der Arbeit von Ardalan et al. [111], die T-Zellen ebenfalls anhand der Co-Expression von CD3 und CD4 charakterisierten, scheint dieser Ausgangswert an CD3+CD4+CD25+ T-Zellen etwas erniedrigt. Andererseits identifizierten Hannet et al. [102] 13-24% der T-Lymphozyten als CD25+ T-Zellen, was einem mit den vorliegenden Daten vergleichbaren relativen Anteil an 4-11% der Gesamt-Lymphozyten entspräche. Nach initialer Immunsuppression wurde in der Thymoglobulin-Gruppe während der T-Zell-Regenerationsphase eine Zunahme der CD3+CD4+CD25+ T-Zellen beobachtet. Im Vergleich zur Kontrollgruppe waren die Unterschiede für die CD25-Expression auf CD3+CD4+ T-Zellen an allen Analysetagen signifikant.

Für die eindeutige Charakterisierung von Tregs ist die CD25-Expression laut Baechner-Allan et al. [104] nur unzureichend. Demnach ist die CD25<sup>high</sup>-Expression auf T-Zellen mit einer größeren Spezifität für Tregs verbunden. Als natürliche Tregs wird von den Autoren ein prozentualer Anteil von 1-2% der peripheren CD4+ T-Lymphozyten beschrieben. Nach Auswertung der CD25-Expression konnte in einem weiteren Analyseschritt die CD25<sup>high</sup>-Expression CD3+CD4+ T-Zellen von neun Patienten bestimmt werden (Kapitel 4.4.3). Interessanterweise waren entsprechend der „Gating-Strategie“ aus Abbildung 22 die CD3+CD4+ T-Lymphozyten nach Thymoglobulin-Induktionstherapie zunehmend CD25<sup>high</sup> ( $23,63 \pm 15,36\%$  an Tag 20). Die CD3+CD4+ T-Zellen der Kontroll-Patienten wiesen hingegen eine CD25<sup>high</sup>-Expression von lediglich  $0,23 \pm 0,3\%$  an Tag 20 auf. Beim Vergleich der CD25<sup>high</sup>-Expression

---

zwischen beiden Gruppen erreichte der Unterschied Signifikanzniveau (Kapitel 4.4.3, Abbildung 23 und 24).

Auch die Definition von CD3+CD4+CD25<sup>high</sup> T-Zellen als Tregs befindet sich im Wandel. Eine einheitlichere Charakterisierung von Zellen mit regulatorischen Eigenschaften brachte die Entdeckung des Transkriptionsfaktors FoxP3 [82]. Durch FoxP3 werden weniger Zellen positiv gekennzeichnet als durch die Markierung mit CD25<sup>high</sup>. Obwohl Zweifel daran besteht, inwiefern FoxP3 alleine für die Charakterisierung von Tregs ausreichend ist; denn auch FoxP3+ Zellen müssen nicht zwingend suppressiv auf anderen Zellen wirken [112], zeichnet sich der FoxP3-Marker durch eine große Treg-Spezifität aus. Zu dieser Definition besteht gegenwärtig Konsens in der Wissenschaftswelt, weswegen im Folgenden für die FoxP3+ T-Zellpopulation der Begriff Tregs verwendet werden soll. FoxP3 ist jedoch ein intrazellulärer Marker, der nicht nur einen hohen Zeitbedarf bei der Anfärbung erfordert, sondern auch für die Separierung lebendiger Zellen ungeeignet ist. Aus diesem Grund wurden FoxP3-Daten nicht im FACS generiert. Stattdessen konnte das Anfärben des IL-7-Rezeptors durch den gegen das Oberflächenmolekül CD127 gerichteten Antikörper etabliert werden. In der FACS-Analyse verbindet die Kombination von CD25 und CD127-Färbung die Spezifität der Markierung durch FoxP3 mit der Leichtigkeit der Handhabung bekannter Oberflächenmarker. Wie in Abbildung 22 demonstriert, zeichnete sich der größte Teil der CD3+CD4+CD25<sup>high</sup> T-Zellen durch das für Tregs charakteristische Fehlen des IL-7-Rezeptors aus. Anhand der Färbung ausgewählter Thymoglobulin-Patienten mit einem gegen CD127 gerichteten Antikörper konnten Tregs eindeutig identifiziert werden. Bei ähnlichen CD25<sup>high</sup>- und CD127<sup>low</sup>-Expressionen in der Thymoglobulin-Gruppe (n=4) und der Kontrollgruppe (n=5) vor Transplantation kam es an Tag 15 und 20 nach Immunsuppression zu signifikant unterschiedlichen Expressionen für CD25<sup>high</sup> und CD127<sup>low</sup> (Kapitel 4.4.3, Abbildung 24). Nach Thymoglobulin-Applikation war eine Zunahme der CD127<sup>low</sup>-exprimierenden Tregs auf durchschnittlich 8,78±5,56% zu beobachten. Im Gegensatz dazu sind lediglich 0,35±0,2% der CD3+CD4+ T-Zellen der nach Standardprotokoll therapierten Patienten CD127<sup>low</sup>. Unter Thymoglobulin-Therapie war ein deutlicher prozentualer Anstieg der CD3+CD4+CD25<sup>high</sup>CD127<sup>low</sup> Treg-Population zu verzeichnen. Aufgrund zu geringer Zellzahlen wurden die als Tregs charakterisierten Zellen der Patienten allerdings nicht auf ihre suppressiven Eigenschaften *ex vivo* überprüft.

Da die Messung der FoxP3-Expression nicht im FACS erfolgte, wurden die PBMCs ausgewählter Patienten auf PCR-Ebene analysiert. Da es wie in Kapitel 4.1 beschrieben durch Thymoglo-

bulin vorwiegend zu einer Depletion der peripheren T-Lymphozyten kam, musste die CD25- und FoxP3-mRNA-Expression zu der von CD3 relativiert werden. Dabei konnte im Gegensatz zur Kontrollgruppe bei den Patienten der Thymoglobulin-Gruppe postoperativ eine relativ erhöhte Expression von FoxP3-mRNA nachgewiesen werden (Kapitel 4.5). Die Zellen der nach Standard-Protokoll behandelten Patienten zeigten in der Kinetik eine tendenziell verminderte FoxP3-Expression. An Tag 10 und 15 nach Thymoglobulin-Administration waren in den entsprechenden Patienten-Seren im Vergleich zu den Patienten-Seren der Kontrollgruppe signifikant höhere mRNA-Expressionen zu detektieren (Kapitel 4.5, Abbildung 25). Dies spricht bei einer Abnahme der T-Zellpopulation für eine gleichzeitige prozentuale Zunahme an regulatorischen T-Zellen.

In der Kontrollgruppe wurden an Tag 0 (perioperativ) und Tag 4 20mg des IL-2R $\alpha$ -Antikörpers Basiliximab i. v. appliziert. Dieser chimäre monoklonale Antikörper wirkt hemmend auf die T-Zell-Proliferation. Durch die Bindung an das CD25-Antigen wird die Aktivierung von T-Zellen durch IL-2 blockiert [113]. Bei einer Halbwertszeit von ca. sieben Tagen verhindert die zweimalige Administration von 20mg Basiliximab die T-Zell-Vermehrung wirksam. Bis zu 60 Tagen wird die CD25-Expression von T-Zellen dadurch beeinflusst [114]. Inwiefern es dabei zu einer Suppression der CD25+ T-Zellen kommt, verbleibt in nachfolgenden Untersuchungen zu klären. In der Kontrollgruppe war nach Basiliximab-Administration der prozentuale Anteil der CD3+CD4+ T-Zellen nicht vermindert. Im Gegensatz dazu kam es aber zu einer Depletion der T-Lymphozyten durch Thymoglobulin. Hierbei ist erstaunlich, dass die wenigen nicht-depletierten T-Zellen der Patienten der Thymoglobulin-Gruppe eine verstärkte Expression für CD25+<sup>high</sup> zeigten.

Da nierentransplantierte Patienten, die nach Standard-Protokoll therapiert wurden, einen kürzeren stationären Aufenthalt ( $16,33 \pm 4,88$  Tage) im Vergleich zu den P/NTx- und DDTx-Patienten hatten ( $45,44 \pm 22,24$  Tage), konnte in der FACS- und PCR-Analyse nicht immer von derselben Patientenzahl ausgegangen werden. Darüber hinaus konnten die Zellpopulationen der gesamten Kohorte nicht an allen Analysetagen vollständig bestimmt werden. Die Vergleichbarkeit der ermittelten Werte beider Gruppen muss deshalb an aufgeführter Stelle kritisch betrachtet werden.

Zusammengefasst konnten in dieser Arbeit vorliegende Veröffentlichungen bestätigt und die immunmodulatorischen Effekte des Thymoglobulins an *in vivo* generierten Daten demonstriert

werden. Nach immunsuppressiver Thymoglobulin-Therapie kommt es primär zur Depletion von T- und NK-Zellen. Im Verlauf zeigt sich dabei eine prozentuale Expressions-Zunahme an CD3+CD4+CD25+<sup>high</sup> CD127<sup>low</sup>/ FoxP3+ T-Zellen. Die Marker FoxP3 und CD127<sup>low</sup> helfen hier bei der Identifizierung CD25+<sup>high</sup> T-Zellen mit regulatorischen Eigenschaften. Durch die Ergebnisse konnte *in vivo* die bisher *in vitro* untersuchte Expansion von Tregs nach Inkubation mit Thymoglobulin bestätigt werden. Eine abschließende Bewertung der suppressiven Eigenschaft dieser Zellpopulation steht noch aus.

### 5.3 Herkunft der regulatorischen T-Zellen

Tregs lassen sich in zwei Subtypen klassifizieren: in angeborene (naive) regulatorische Thymus-T-Zellen und adaptive, in der Peripherie generierte Tregs [76]. Die naiven, aus dem Thymus stammenden Tregs sind die einzigen seit der Geburt im peripheren Blut präsenten T-Zellen mit regulatorischer Eigenschaft. Sie sind durch die Expression von CD25<sup>high</sup>, FoxP3 und dem Fehlen der CD127 Expression gekennzeichnet [115]. Haas et al. [116] unterschieden zwischen aus dem Thymus stammenden CD4+CD45RA+CD31+ T-Zellen und in der Peripherie expandierten, naiven CD4+CD45RA+CD31- T-Helferzellen. Sie unterscheiden sich durch ihre CD31-Expression von den CD45RO+ T-Gedächtniszellen. CD45RO findet sich hauptsächlich auf Thymozyten und einer Subpopulation von CD4+ und CD8+ T-Zellen (T-Gedächtniszellen). Ruhende T-Zellen tragen überwiegend CD45RA auf der Oberfläche, das bei der Aktivierung durch Alloantigene verloren geht und durch CD45RO ersetzt wird. Pearl et al. [117] beschrieben, dass sich nach T-Zell-Depletion durch polyklonale Antikörpern vermehrt T-Zellen mit dem Phänotyp von Gedächtniszellen entwickelten. Die T-Zell-Depletion führt demnach zu einer homeostatischen Proliferation von T-Zellen und einer Konversion in alloreaktive T-Gedächtniszellen – diese homeostatische Proliferation kann sogar eine Transplantat-Toleranz verhindern [118]. Konträr dazu ist in anderen Studien das Korrelat peripherer toleranzinduzierender Tregs beschrieben worden, die sich aus einem „Pool“ von T-Gedächtniszellen ableiten [119]. In der vorliegenden Studie wurden Oberflächenfärbungen für die Identifizierung von T-Gedächtniszellen in das Färbeprotokoll nicht aufgenommen. Eine Aufschlüsselung und weitere Differenzierung der expandierten CD3+CD4+CD25+<sup>high</sup> CD127<sup>low</sup>/ FoxP3+ T-Zellpopulation erfolgte insofern nicht.

Im Versuch mit Affen war bereits die dosisabhängige depletierende Wirkung von ATG auf Lymphozyten-Populationen im Blut, in der Milz und in den Lymphknoten festgestellt worden. Die Lymphozyten im Thymus blieben von diesem Effekt hingegen unberührt [120]. Im Gegensatz zum Thymus kam es im Blut und in einem geringeren Ausmaß auch in den peripheren Lymphorganen zur Bindung von ATG-Antikörpern und damit zur Depletion der T-Zellen. Ausschließlich bei ATG-Höchstdosierungen von 20mg/kg (dies entspricht einer Dosis von 3,5mg/kg beim Menschen) wurden die polyklonalen Antikörper von den Thymozyten gebunden. Im intravasalen Raum werden die Lymphozyten durch die Antikörper opsoniert, wohingegen Zellen, wie die B-Lymphozyten, der Depletion entkommen, da sie weniger Antikörper binden. Lymphozyten die durch Antikörper opsoniert werden, unterliegen der Depletion und migrieren nicht länger in die peripheren Lymphorgane. Sie werden durch die Makrophagen der Leber, Milz und Lunge eliminiert. Aus diesem Grund ist die Korrelation zwischen T-Zellzahlen im Blut und denen in den Lymphorganen fragwürdig. In den wenigen nach ATG-Administration nicht-depletierten T-Zellen konnte eine funktionelle Änderung beobachtet werden, die in einer reduzierten Antwort in der „mixed lymphocyte reaction“ resultierte [120]. Da in der vorliegenden Studie Thymoglobulin-Konzentrationen von 1,5mg/kg eingesetzt wurden, kann davon ausgegangen werden, dass eine Antikörper-T-Zell-Interaktion im Thymus ausblieb. Entsprechend der Hypothese könnte es sich bei den peripheren regulatorischen T-Zellen folglich um nicht-depletierte aus dem Thymus oder teils aus peripheren Lymphorganen emigrierte Tregs handeln.

Alternativ dazu kam es laut Minamimura et al. [121] im Mausmodell nach Behandlung mit Anti-Lymphozyten-Serum (ALS) zur Proliferation muriner CD4+CD25+ T-Zellen, die den T-Gedächtniszellmarker CD44 exprimierten. Natürliche CD4+CD25+ T-Zellen wurden nach ALS-Administration weniger depletiert als CD4+CD25- T-Zellen, dies ließ eine gewisse Resistenz der CD25 exprimierenden T-Zellen gegenüber polyklonalen Antikörpern vermuten. Die Autoren erklärten dies mit einer erhöhten Expression des Anti-Apoptosegens Bcl-XL. Die der Milz und den Lymphknoten entnommenen CD4+CD25+ T-Zellen zeigten eine Expression von FoxP3, phänotypisch war eine Konversion zu CD44+ T-Gedächtniszellen zu beobachten. Die immunsuppressiven Eigenschaften dieser Zellen konnten *in vitro* nachgewiesen werden. Den vorliegenden Ergebnissen zufolge wäre demnach ein Teil der CD3+CD4+CD25+ T-Zellen resistent gegenüber der Depletion durch Thymoglobulin gewesen und hätte in den peripheren Lymphorganen überleben können. Es lässt sich hypothetisch annehmen, dass die CD3+CD4+CD25+ T-Zellen homöostatisch proliferieren, und es von den Lymphorganen

---

ausgehend zu einer Expansion von Zellen mit dem phänotypischen Marker von CD127<sup>low</sup>/FoxP3+ Tregs gekommen ist.

Andere Studien [122] deuten daraufhin, dass FoxP3 eine Konversion von naiven T-Zellen zu Tregs in der Peripherie begünstigt. Interessanterweise kommt es dabei *in vivo* im Vergleich zu Versuchen *in vitro* zu einer langsameren Generierung von Tregs. *In vivo* präsentieren sich diese Zellen als langlebiger und verfügen über eine stabilere FoxP3-Expression. Dass es sich bei dieser Zellpopulation nicht um expandierte aus dem Thymus in die peripheren Lymphorgane ausgewanderte regulatorische T-Zellen handelt, ließ sich anhand der Treg-Neu-Induktion in Mäusen zeigen, deren CD4+ T-Zellen initial keinen Treg-Phänotyp aufwiesen. Im Thymus können Tregs durch die Exposition gegenüber TCR-Agonisten und Selbst-Antigenen induziert werden. Im Gegensatz dazu inhibieren kostimulatorische Signale die extrathymische Konversion von naiven T-Zellen zu Tregs.

Als Mechanismus für die Generierung der Tregs wird eine Vielzahl von Stimuli diskutiert. So werden Tregs z. B. durch die Zytokine IL-10 und TGF- $\beta$  induziert [123]. Gegen CD3 gerichtete monoklonale Antikörper [96] und Immunsuppressiva [124] können ebenfalls zu einer vermehrten Generierung von Tregs führen. Roncarolo et al. [125] benennen die peripher induzierten regulatorischen T-Zellen, Tregs vom Typ 1 (T<sub>R</sub>1). Ihren Untersuchungen entsprechend führt das IL-10-Signal demzufolge lediglich zu einer Induktion dieser Treg-Subpopulation. Die T<sub>R</sub>1-Zellen wirken ihrerseits über die Sekretion von Zytokinen. IL-10 gilt hierbei als eines der essentiellen Effektor-Zytokine, das die suppressive Funktion von Tregs vermittelt. Es wird ebenso wie das immunsuppressiv wirksame Zytokin TGF- $\beta$  von Tregs sezerniert [79]. Im Gegensatz dazu stehen die im Thymus differenzierten natürlichen CD4+CD25+ Tregs, die laut Shevach et al. [77] keine der oben genannten Zytokine sezernieren. Vielmehr verfügen sie nur über einen kontaktabhängigen Wirkmechanismus. Zheng et al. [123] zufolge induzieren IL-2 und TGF- $\beta$  in antigenaktivierten CD4+CD25- T-Zellen die Konversion zu CD4+CD25+ Tregs. Zudem wirken diese beiden Zytokine stimulierend auf natürliche CD4+CD25+ T-Zellen, die nicht proliferieren, sondern ihrerseits CD4+CD25+ Tregs, die über einen kontaktabhängigen, aber zytokinunabhängigen Wirkmechanismus verfügen, expandieren. Die expandierten CD4+CD25+ Tregs produzieren sowohl TGF- $\beta$  als auch IL-10 und führen auf diesem Weg zur Konversion von antigenaktivierten CD4+CD25- T-Zellen zu CD4+CD25+ Tregs. Nach der *in vitro* Inkubation von PBMCs mit ATG detektierten Feng et al. [97] in den Serum-Überständen ein von IL-10 dominiertes Zytokin-Sekretionsprofil. IFN- $\gamma$  wurde ebenso

induziert, die Unterschiede zur Kontrolle erreichten jedoch kein Signifikanzniveau. Um zu überprüfen, ob erhöhte IL-10-Plasmaspiegel zur Generierung von Tregs beigetragen haben könnten, wurde die Messung der IL-10-Konzentrationen im Serum ausgewählter Patienten durchgeführt (Kapitel 4.6). Für den Tag vor Transplantation wie auch für die ersten vier Tage nach OP ist in Abbildung 26 die Analyse der IL-10-Serumspiegel dargestellt. Es war eine Erhöhung von IL-10 an Tag 2 und 4 nach Operation nachzuweisen. Für die Zytokin-Spiegel von IL-2, IL-4, IL-5, TNF und IFN- $\gamma$  konnten keine Unterschiede zwischen Serum-Ausgangskonzentration an Tag 0 und Tag 2 und 4 nach OP festgestellt werden. Ob es zu einer Erhöhung von Zytokinen u.a. im Rahmen eines „cytokine-release-syndromes“ (Kapitel 5.5) während der ersten Stunden nach induktiver Immunsuppression kam, kann aufgrund der gewählten Zeitpunkte nicht ausgesagt werden. Eine signifikant erhöhte CD25 Expression zeigt sich bereits an Tag 5 nach initialer Immunsuppression mit Thymoglobulin. Die prozentualen Anteile der CD25<sup>high</sup>/CD127<sup>low</sup>-Expression unterscheiden sich jedoch im Vergleich zu Tag 0 erst an Tag 15 und 20 signifikant. Demnach kann eine Treg-generierende Wirkung von IL-10 durchaus diskutiert werden. Den vorliegenden Ergebnissen zufolge bleibt es jedoch unklar, warum es zu einer Latenzzeit von ca. 10 Tagen zwischen maximalem IL-10-Spiegel und signifikant erhöhter Treg-Expression kommt. Bei einer kurzen IL-10-Serumhalbwertszeit von wenigen Stunden bleibt die Frage nach dem Treg-Induktions-Mechanismus zu klären.

Zusammenfassend kommt es nach induktiver Thymoglobulin-Therapie zu einer Generierung regulatorischer T-Zellen, die CD25<sup>+</sup>/<sup>high</sup> sind. Es wurde versucht eine Unterscheidung zwischen aktivierten T-Zellen und regulatorischen T-Zellen mittels der Markierung durch CD127 oder FoxP3 zu machen. Dabei scheint, bestätigt durch die vorliegende Zytokin-Analyse, eine Korrelation zwischen erhöhter IL-10-Sekretion und dem relativ erhöhten Anteil regulatorischer T-Zellen zu bestehen. Ein inofgedessen zu diskutierender Erklärungsansatz wäre, ob es im Rahmen der homöostatischen T-Gedächtniszell-Proliferation zu einer Konversion vom CD25<sup>-</sup> zum CD25<sup>+</sup> Treg-Phänotyp gekommen ist. Die Ergebnisse bestätigen die Hypothesen vorheriger Arbeiten [126, 127], dass die Administration eines polyklonalen Antikörpers zu einer Induktion von CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup> zu CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>/<sup>high</sup> CD127<sup>low</sup> Tregs führt.

## 5.4 Die Dosierung von Thymoglobulin und dessen Zell-depletierender Effekt

Trotz des verbreiteten Einsatzes von polyklonalen Antikörpern in der Immuntherapie besteht kein Konsens über die zu verwendende Dosierung, im Hinblick auf die größte Effektivität. Ziel ist es, einen ausreichend hohen Wirkspiegel zu erlangen, ohne dass es zu opportunistischen Infektionen des Patienten und/ oder malignen Entartungen von Zellen kommt. Die depletierende Wirkung polyklonaler Antikörpern ist von einer Vielzahl von Autoren diskutiert worden [40, 128]. Seit ihrer Einführung wurde eine wachsende Anzahl von Antigenen charakterisiert, die als Ziel-Antigene dieser Antikörper-Präparationen erkannt werden [43]. Primär ist nach ATG-Administration eine periphere Depletion von Lymphozyten festzustellen. Nach Preville et al. [120] ist die durch ATG induzierte Lymphopenie dosisabhängig. Bei Konzentrationen von 100-1000 $\mu$ g/ml Wirkstoff im Blut kommt es überwiegend zur komplementvermittelten Lyse von T-Zellen. Eine Konzentration von 1-10 $\mu$ g/ml bedingt eine antikörperabhängige, zellvermittelte Zytotoxizität und induziert die Apoptose aktivierter T-Zellen durch die Fas-Liganden-Interaktion [40]. Wie von unserer Arbeitsgruppe im Jahr 2009 durch Stauch et al. [109] *in vitro* demonstriert wurde, induziert bereits die geringe Konzentration von 0,1 $\mu$ g/ml Thymoglobulin nicht nur die Apoptose von T-Lymphozyten, sondern auch die von NK-Zellen. In Kapitel 4.1, Abbildung 6 wird die apoptotische Wirkung von Thymoglobulin in Form der NK-Zell-Depletion graphisch verdeutlicht. Vor Transplantation beträgt der prozentuale Anteil an CD56+ NK-Zellen 13,24 $\pm$ 10,17% der Gesamt-Lymphozyten. An Tag 5 sind es nur noch 1,25 $\pm$ 1,1% und an Tag 10 1,25 $\pm$ 1,69%. Bei einer Thymoglobulin-Dosierung von 1,5mg/kg konnten am klinischen Beispiel der Knochenmarkstransplantation Serum-Spiegel von 50-100 $\mu$ g/ml gemessen werden [129]. Wie Regan et al. [130] publizierten, wiesen NTx-Patienten, die sich einer Anti-Rejektionstherapie durch Thymoglobulin (1,5mg/kg) über sechs Tage unterzogen, Serum-Wirkspiegel von 66 $\mu$ g/ml während der ersten fünf Tage nach Administration auf. An Tag 30 waren die Serumspiegel auf 25 $\mu$ g/ml abgefallen. In einer der ersten Studien zu ATGs aus dem Jahre 1976 konnte am Beispiel von herztransplantierten Patienten gezeigt werden, dass sich die untersuchte Kohorte anhand von ATG-Eliminationszeiten in zwei Gruppen unterteilen ließ: die eine Gruppe war durch eine durchschnittliche ATG-Halbwertszeit von  $T_{1/2} = 1,6$  Tagen, die andere durch  $T_{1/2} = 11,4$  Tagen charakterisiert [131]. Da jedoch nur 7% des aus Kaninchen gewonnenen Thymoglobulins spezifisch an humane PBMCs bindet, unterschieden Regan et al. [130] zwischen aktiven und inaktiven Antikörpern. Dabei zeigte sich, dass 90% des für humane Zellen spezifischen

Thymoglobulins sehr schnell eliminiert werden. Nur während der ersten drei Wochen nach Behandlung sind Wirkspiegel aktiven Thymoglobulins zu detektieren, danach ist die Konzentration vernachlässigbar gering. Dabei scheint das Thymoglobulin biphasisch eliminiert zu werden. Während der ersten 10 Tage beträgt  $T_{1/2} = 44$  Stunden, danach liegt die Halbwertszeit bei 13,8 Tagen [132]. In der vorliegenden Arbeit betrug die über fünf aufeinander folgende Tage gegebene Dosis an Thymoglobulin 1,5mg/kg. Da allerdings weder die Thymoglobulin-Konzentrationen im Serum bestimmt noch zwischen aktivem und inaktivem Wirkstoff unterschieden wurde, stellt sich nachträglich die Frage, wie hoch der im Blut erreichte Thymoglobulin-Wirkspiegel war. Wegen der im biologischen System durchgeführten Versuche muss jedoch in hohem Maße von interindividuellen Unterschieden ausgegangen werden. Dies mag die partiell großen Standard-Abweichungen in der Verlaufsbeobachtung der Lymphozyten-Populationen bedingen.

Entsprechend der von Bunn et al. [133] beschriebenen Pharmakokinetik kann von einer maximalen Akkumulation von ATG bis zum letzten Tag der intravenösen Infusion (= Tag 5) ausgegangen werden. Nach initialer Immunsuppression mit Thymoglobulin war über den Beobachtungszeitraum von  $28,89 \pm 11,34$  Tagen bei einer andauernden Lymphozytopenie keine vollständige Repopulation der T-Lymphozyten-Population zu beobachten. In der Literatur wird eine Verminderung der CD4+ T-Zellzahlen bis zu einem Jahr nach Immunsuppression durch ATG beschrieben [93, 134]. Entsprechend dem kürzeren Beobachtungszeitraum und den Patientendaten aus Kapitel 4.1 lässt sich die Aussage formulieren, dass es bereits nach  $13,38 \pm 1,21$  Tagen zu einer langsamen Repopulation der T-Lymphozyten kommt. Auch die Verläufe der einzelnen Patienten sprechen für eine Repopulation der T-Zellen ab dem postoperativen zehnten Tag (Kapitel 4.1.1, Abbildung 8). Es verbleibt zu klären, wie hoch die Thymoglobulin-Konzentration im Serum der Patienten während des stationären Aufenthalts und darüber hinaus war. Zwischen der Applikation von Thymoglobulin *in vitro* und der Anwendung *in vivo* ist hierbei als entscheidender Unterschied die im biologischen System stattfindende Elimination (der wenig spezifischen polyklonalen Antikörper) durch Immunglobuline vom Typ IgM und IgG zu sehen [132].

## 5.5 Nebenwirkungsprofil polyklonaler Antikörper

Innerhalb der ersten Stunden nach Administration therapeutischer Antikörper ist häufig das Auftreten eines „cytokine-release-syndromes“ zu beobachten. Dieser adverse Effekt wurde von Guttmann et al. und Hardinger et al. in entsprechenden Studien demonstriert [132, 135]. Das „cytokine-release-syndrom“ manifestiert sich u.a. in Form von Fieber, Schüttelfrost, Hypotension, Magen-Darm- und Atembeschwerden. Es reicht von einer grippeartigen Symptomatik bis hin zur systemischen Entzündungsreaktion. Bevor die Zellen in Apoptose gehen, setzen die durch die Antikörper aktivierten T-Zellen Zytokine frei. Dies spiegelt sich in erhöhten Serum-Konzentrationen von IL-2, IL-3, IL-4, IL-6, TNF- $\alpha$  und IFN- $\gamma$  wider. Durch die intraoperative Infusion von Anti-Histaminika und durch die Therapie mit Glukokortikoiden werden diese adversen Effekte reduziert. Da das Zytokinprofil im Serum der Patienten während der ersten Stunden nach Transplantation nicht bestimmt wurde, kann keine Aussage zu erhöhten Zytokinpiegeln für diesen Zeitraum getroffen werden. Klinisch wurde in der vorliegenden Studie unter Thymoglobulin-Therapie jedoch kein Fall eines „cytokine-release-syndromes“ beobachtet. Während der Messung der Zytokinpiegel ausgewählter Patienten an Tag 2 und 4 waren lediglich erhöhte IL-10-Spiegel zu verzeichnen (Kapitel 4.6 und 5.3).

Nach Immunsuppression stellt sich als Risiko die erhöhte Anfälligkeit für opportunistische Infektionen dar. So untersuchten Schubert et al. [136] die durch EBV hervorgerufenen Infektionen herztransplantierten Kindern. Sie stellten fest, dass die EBV-Last im Blut ein Marker für die Entwicklung einer PTLD ist. In einer ähnlichen Untersuchung beobachteten sie, dass das Risiko für die Entwicklung einer EBV-assoziierten Störung nach Immunsuppression durch Azathioprin und mehr als drei Dosen ATG erhöht war [137]. Baron et al. [138] hingegen wiesen nach, dass sich bei nierentransplantierten Kindern durch die Immunsuppression mit ATG keine PTLD entwickelte. Hierbei lag die Dosierung an drei aufeinander folgenden Tagen nach OP allerdings unter 2mg/kg. Dharnidharka et al. [139] stellten fest, dass bei Kindern ausschließlich die Induktionstherapie mit aus Pferden gewonnenem ATG zu PTLDs führte. Wie Caillard et al. 2005 zeigten [140], war insbesondere die Applikation von ATG als Anti-Rejektionstherapie bei nierentransplantierten Patienten mit einem erhöhten Risiko für PTLDs assoziiert. Retrospektiv betrachtet, manifestierte sich über den Zeitraum eines Jahres bei einem Patienten eine Form der PTLD. Bei einer Patientin wurde eine CMV-Infektion apparent. Dadurch wird die Annahme

gestützt, dass eine immunsuppressive Thymoglobulin-Therapie in einem gewissen Grad auch bei einer Dosierung von 1,5mg/kg das Auftreten adverser Effekte begünstigen kann.

Nach wie vor gilt es, bei induktiver - oder Anti-Rejektionstherapie mit Thymoglobulin, Risiko und Kosten-Nutzen-Verhältnis sorgsam abzuwägen. Durch das postulierte verringerte Risiko akuter Abstoßungen (Kapitel 5.6), können die Krankenhaus-Verweildauer nach Transplantation verkürzt und infolgedessen die Transplantationskosten reduziert werden. Das Risiko des Auftretens von Nebenwirkungen kann durch die Wahl niedriger Dosierungen polyklonaler Antikörper und deren intermittierender Administration verringert werden. Dabei hat sich die Verlaufskontrolle der T-Lymphozytenzahl als geeignetes Mittel für die Dosis-Anpassung in der Thymoglobulin-Therapie erwiesen [60, 61].

## **5.6 Der Einfluss von Thymoglobulin auf das Langzeitüberleben – durch Induktion regulatorischer T-Zellen**

Es wird kontrovers diskutiert, inwiefern polyklonalen Antikörpern ein positiver Effekt auf die Transplantat-Überlebenszeit zukommt. Szczech et al. [57, 58] postulierten, dass die Induktionstherapie durch polyklonale Antikörper mit einem verminderten Risiko einer akuten Abstoßung und einer signifikanten Erhöhung des Transplantatüberlebens einhergeht. Thymoglobulin kommt hinsichtlich dessen ein positiver Effekt bei der Reduzierung des Ischämie-Reperfusionsschadens zu. Dies geht mit einer Verbesserung der frühen Transplantatfunktion („early graft function“) und einer Abnahme der verspäteten Transplantatfunktion („delayed graft function“) einher [56, 141]. Anderen Autoren zufolge konnte im Langzeitverlauf kein signifikanter Unterschied bezüglich des Transplantatüberlebens zwischen mit polyklonalen Antikörpern behandelten Patienten und Kontrolle festgestellt werden [54, 59]. Während des stationären Aufenthalts von  $45,44 \pm 22,24$  Tagen waren in der Thymoglobulin-Gruppe keinerlei Rejektionsepisoden zu verzeichnen. Bis zu einem Jahr nach Transplantation wurde bei einem der Thymoglobulin-Patienten eine späte Form der akuten Rejektion diagnostiziert, die mit einer Urbason-Stoßtherapie behandelt wurde. Ein Dünndarm-transplantierte Patient verstarb, während sich bei einem anderen eine PTLD entwickelte. Im Verlauf eines Jahres fand sich in der Kontrollgruppe ein Patient mit einer durch CNIs bedingte toxische Epithel-Schädigung der Niere. Eine Patientin wies eine Neuinfektion mit CMV auf.

Unter induktiver Thymoglobulin-Therapie war in der vorliegenden Studie eine Depletion von CD3+CD4+ T-Zellen und CD56+ NK-Zellen zu verzeichnen (Kapitel 4.1). Primär dürfte die Depletion immunkompetenter alloreaktiver T-Zellen in diesem Zusammenhang zur Nicht-Rejektion des Transplantats geführt haben. Zeitgleich war die Generierung CD3+CD4+CD25+<sup>high</sup> CD127<sup>low</sup>/ FoxP3+ Tregs zu beobachten. Wie aus Abbildung 24 (Kapitel 4.4.3) ersichtlich, lassen sich CD127<sup>low</sup>-Expressionen von ca. 12% zwei bis drei Wochen nach induktiver Thymoglobulin-Administration detektieren. Da die Patienten-PBMCs lediglich über 28,89±11,34 Tage im FACS analysiert wurden, kann jenseits dieses Zeitraums die Entwicklung der CD3+CD4+CD25+<sup>high</sup> CD127<sup>low</sup>/ FoxP3+ Tregs nicht beurteilt werden. Durch Bloom et al. [142] konnte allerdings die vermehrte Existenz von CD4+CD25+FoxP3+ Tregs im Verlauf von 36 Monaten nach immunsuppressiver Therapie durch Campath-1H bewiesen werden. Nach sechs Monaten lag der prozentuale Anteil an Tregs bei 12% der CD4+ T-Zellen. Nach 24 und 36 Monaten war der prozentuale Anteil zwar rückläufig, befand sich jedoch nach wie vor über dem Ausgangswert. Die Stimulation mit Campath-1H könnte demzufolge zur Generierung oder Expansion von Tregs in peripheren Lymphozyten beigetragen haben. Die Autoren nehmen an, dass es gleichzeitig zu einer Reduktion alloreaktiver T-Effektorzellen kam. Dabei kann von einer Verschiebung des Verhältnisses Tregs/ T-Effektorzellen zu Gunsten der Tregs ausgegangen werden. Es lässt sich vermuten, dass die Administration von Thymoglobulin zu ähnlichen Effekten geführt haben dürfte.

In den letzten Jahren erschienen zahlreiche Publikationen über die Eigenschaften von CD4+CD25+<sup>high</sup> FoxP3+ Tregs und die ihnen zugeschriebene Toleranzentwicklung gegenüber dem Transplantat. Es stellt sich jedoch die Frage, ob nach Transplantation tatsächlich spenderspezifische Tregs generiert werden, die eine Transplantat-Akzeptanz bewirken [143]. Aufgrund der Uneindeutigkeit der Marker und der Instabilität des biologischen Materials sind FACS- und PCR-Analyse von CD25- und FoxP3-Expression als diagnostisches Mittel kritisch zu betrachten. Ein Erklärungsansatz für die prozentuale Erhöhung von T-Zellen regulatorischen Phänotyps könnte lauten, dass die CD25+ T-Zellen nur transient FoxP3 exprimieren. Ihre dauerhafte regulatorische Funktion *in vivo* bleibt daher zu überprüfen. In experimentellen Arbeiten ließen sich Tregs von konventionellen T-Zellen und nicht-regulatorischen FoxP3-exprimierenden T-Zellen durch die Demethylierung der FoxP3-DNA unterscheiden [144]. Natürliche Tregs durchlaufen im Thymus einen Reifungsprozess. Molekulare Mechanismen tragen zur epigenetischen Imprimierung und Differenzierung bei, durch die eine Treg-spezifische DNA-Region demethyliert wird. Die durch TGF-β *de novo* generierten FoxP3+ T-Zellen

verlieren bei ausbleibendem Stimulus ihre regulatorischen Eigenschaften wieder. Eine andauernde Konversion von CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup> T-Zellen zu FoxP3<sup>+</sup> Tregs erfolgt demnach nur bei Demethylierung des FoxP3-Gen-Locus [145]. Die quantitative Analyse des DNA-Methylierungsgrades von FoxP3 scheint sich für unterschiedliche klinische Fragestellungen als „Screening“-Methode zu etablieren, so als Parameter für die Toleranzinduktion nach solider Organtransplantation oder als Malignitäts-Indikator bei Patienten mit bekanntem Tumorleiden. Erst kürzlich veröffentlichten Wieczorek et al. [146] aktuelle Forschungsergebnisse, die diese Annahme stützen.

Auf welchem Weg CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+/high</sup> CD127<sup>low</sup>/ FoxP3<sup>+</sup> Tregs ihre toleranzvermittelnde Funktion ausüben, kann u. a. durch den im vorherigen Abschnitt 5.4 beschriebenen wichtigen Stimulus IL-10 begründet liegen. Eine Toleranzinduktion kann außerdem durch das Unterdrücken der Proliferation und IL-2 Produktion von T-Zellen stattfinden, die reaktiv gegen Spender-Antigene gerichtet sind [143]. Darüber hinaus zeigten Naujokat et al. [147], dass ein Teil der sich im Thymoglobulin befindenden Antikörper depletierend auf empfängereigene Dendritische Zellen wirkt. Es lässt sich vermuten, dass dadurch die Interaktionen zwischen diesen APCs und den T-Zellen gestört ist. Die T-Zellen erhalten fortan nicht mehr das für ihre Aktivierung nötige Primärsignal durch die APC – und auch die CD80/CD86 Interaktion wird verhindert. Mit der Folge, dass die Proliferation alloreaktiver T-Zellen sistiert. Auf Tregs haben APCs zudem eine expandierende Wirkung [148, 149]. In den *in vitro* Versuchen aus Kapitel 4.3 konnten jedoch auch in Abwesenheit von APCs FoxP3<sup>+</sup> Tregs generiert werden. Dadurch wird die Annahme gestützt, dass die Induktion von Tregs auch unabhängig von Dendritischen Zellen erfolgen kann.

Zusammengefasst wurde in der vorliegenden Arbeit eine Generierung von Tregs durch den polyklonalen Antikörper Thymoglobulin beschrieben, die unabhängig von dem jeweils transplantierten Organ war. Über den Beobachtungszeitraum von 45,44±22,24 Tagen trat kein Fall einer akuten Rejektionsepisode in der Gruppe der Thymoglobulin-Patienten auf. Dabei muss allerdings festgehalten werden, dass die primäre Funktion von Tregs in dem Verhindern des Auftretens von Auto-Immunität liegt – nicht von Allo-Immunität. Dennoch kann Thymoglobulin eine entscheidene Rolle beim Ausweiten der Spenderkriterien für solide Organtransplantation zukommen. Laut DSO besteht ein wachsendes Missverhältnis zwischen Organnachfrage und -angebot. Bei einem durch den Einsatz von polyklonalen Antikörpern verbesserten Transplantat- und Patientenüberleben existiert die reelle Möglichkeit, z. B. eine erhöhte Zahl an „HLA-Mismatches“ bei Organtransplantation zu tolerieren. Es scheint trotzdem fraglich, inwiefern die in

der Gruppe der Thymoglobulin-Patienten in geringen prozentualen Anteilen detektierbaren CD3+CD4+CD25+<sup>high</sup> CD127<sup>low</sup>/ FoxP3+ Tregs zur Toleranzvermittlung beigetragen haben. In Langzeituntersuchungen müsste diesbezüglich die Treg-Entwicklung und die Transplantatfunktion über den Krankenhausaufenthalt hinaus eruiert werden.

## 6. Zusammenfassung

Bei der laut Deutsche Stiftung Organtransplantation bestehenden Diskrepanz zwischen Organangebot und Nachfrage kann es heutzutage vermehrt zur Transplantation marginaler Spenderorgane kommen, was ein erhöhtes Abstoßungsrisiko mit sich bringt. Die Verwendung polyklonaler Antikörper kann im Rahmen immunsuppressiver Protokolle bei diesen Risiko-Patienten als etabliert betrachtet werden. In der vorliegenden Arbeit sollten die Effekte dieser polyklonalen Antikörper anhand des Thymoglobulins näher untersucht werden. Hierbei stand die Analyse der Lymphozytenpopulation der T-Zellen im Vordergrund. Es konnte gezeigt werden, dass die induktive Therapie mit Thymoglobulin im Gegensatz zu einer standardisierten Immunsuppression zur anhaltenden Depletion von T- und NK-Zellen führt. Innerhalb der nicht-depletierten T-Zellen kam es zu einer Modulation. Die CD3+CD4+ T-Zellen exprimierten nach der Administration von Thymoglobulin verstärkt das Oberflächenmolekül CD25. In vorangegangenen *in vitro* Versuchen war bereits die Konversion von CD25- zu CD25+ T-Zellen demonstriert worden. Diese Ergebnisse ließen sich in der *in vivo* Analyse organtransplantierte Patienten reproduzieren. Unabhängig von dem zu transplantierten Organ entwickelten sich durch die induktive Thymoglobulin-Therapie CD3+CD4+CD25+ T-Zellen regulatorischen Phänotyps. Inwiefern diese T-Lymphozyten zum Typ der T-Gedächtniszellen zu zählen sind, konnte abschließend nicht geklärt werden. Durch die Ergebnisse anderer Studien zur Immunsuppression mit polyklonalen Antikörpern wird jedoch die Annahme gestützt, dass Thymoglobulin CD3+CD4+CD25+<sup>high</sup> CD127<sup>low</sup>/ FoxP3+ Tregs induziert. Es kann festgehalten werden, dass u.a. der IL-10 Stimulus zur Generierung von Tregs beiträgt. Die vorliegende Arbeit konnte einen ersten Beitrag zu den Effekten der induktiven Thymoglobulin-Therapie und der damit verbundenen Treg-Induktion nach solider Organtransplantation leisten. In nachfolgenden Untersuchungen müsste die isolierte Population CD3+CD4+CD25+<sup>high</sup> CD127<sup>low</sup>/ FoxP3+ Tregs auf ihre immunsuppressive Eigenschaft überprüft werden. Darüber hinaus fehlen detailliertere Studien zum Langzeitverlauf und zur Transplantatakzeptanz nach induktiver Immunsuppression mit Thymoglobulin.

## 7. Literaturverzeichnis

1. Wüthrich RP. Nierentransplantation. Berlin, Heidelberg, New York: Springer 1995.
2. Murray JE, Merrill JP, Harrison JH. Renal homotransplantation in identical twins. 1955. *J Am Soc Nephrol.* 2001 Jan;12(1):201-4.
3. Richet G. Hamburger's achievement with early renal transplants. *Am J Nephrol.* 1997;17(3-4):315-7.
4. Brosig W, Nagel R. [Kidney transplantation]. *Urologia internationalis.* 1966;21(2):97-119.
5. Lillehei RC, Idezuki Y, Uchida H, et al. Pancreatic allotransplantation in the dog and in man. *The British journal of surgery.* 1969 Sep;56(9):699.
6. Deutsche Stiftung Organtransplantation. Organtransplantationen in Deutschland 2007. 2007.
7. Gruessner AC, Sutherland DE. Pancreas transplant outcomes for United States (US) and non-US cases as reported to the United Network for Organ Sharing (UNOS) and the International Pancreas Transplant Registry (IPTR) as of June 2004. *Clinical transplantation.* 2005 Aug;19(4):433-55.
8. Hakim NS, Papalois VE. Small bowel transplantation. *International surgery.* 1999 Oct-Dec;84(4):313-7.
9. Pascher A, Kohler S, Neuhaus P, Pratschke J. Present status and future perspectives of intestinal transplantation. *Transpl Int.* 2008 May;21(5):401-14.
10. Morris PJ, Johnson RJ, Fuggle SV, Belger MA, Briggs JD. Analysis of factors that affect outcome of primary cadaveric renal transplantation in the UK. HLA Task Force of the Kidney Advisory Group of the United Kingdom Transplant Support Service Authority (UKTSSA). *Lancet.* 1999 Oct 2;354(9185):1147-52.
11. Nicholson ML, Metcalfe MS, White SA, et al. A comparison of the results of renal transplantation from non-heart-beating, conventional cadaveric, and living donors. *Kidney international.* 2000 Dec;58(6):2585-91.
12. Koo DD, Welsh KI, McLaren AJ, Roake JA, Morris PJ, Fuggle SV. Cadaver versus living donor kidneys: impact of donor factors on antigen induction before transplantation. *Kidney international.* 1999 Oct;56(4):1551-9.
13. Seron D, Fulladosa X, Moreso F. Risk factors associated with the deterioration of renal function after kidney transplantation. *Kidney Int Suppl.* 2005 Dec(99):S113-7.

14. Yang SL, Wang D, Wu WZ, et al. Comparison of single bolus ATG and Basiliximab as induction therapy in presensitized renal allograft recipients receiving tacrolimus-based immunosuppressive regimen. *Transpl Immunol.* 2008 Jan;18(3):281-5.
15. Joseph JT, Kingsmore DB, Junor BJ, et al. The impact of late acute rejection after cadaveric kidney transplantation. *Clinical transplantation.* 2001 Aug;15(4):221-7.
16. Almond PS, Matas A, Gillingham K, et al. Risk factors for chronic rejection in renal allograft recipients. *Transplantation.* 1993 Apr;55(4):752-6; discussion 6-7.
17. Hayry P, Myllarniemi M, Calderon Ramirez L, et al. Immunobiology and pathology of chronic rejection. *Transplant Proc.* 1997 Feb-Mar;29(1-2):77-8.
18. Racusen LC, Solez K, Colvin RB, et al. The Banff 97 working classification of renal allograft pathology. *Kidney international.* 1999 Feb;55(2):713-23.
19. Drachenberg CB, Odorico J, Demetris AJ, et al. Banff schema for grading pancreas allograft rejection: working proposal by a multi-disciplinary international consensus panel. *Am J Transplant.* 2008 Jun;8(6):1237-49.
20. Kusne S, Furukawa H, Abu-Elmagd K, et al. Infectious complications after small bowel transplantation in adults: an update. *Transplant Proc.* 1996 Oct;28(5):2761-2.
21. Sigurdsson L, Reyes J, Putnam PE, et al. Endoscopies in pediatric small intestinal transplant recipients: five years experience. *The American journal of gastroenterology.* 1998 Feb;93(2):207-11.
22. Sayegh MH, Turka LA. The role of T-cell costimulatory activation pathways in transplant rejection. *The New England journal of medicine.* 1998 Jun 18;338(25):1813-21.
23. Morris RE, Wang J, Blum JR, et al. Immunosuppressive effects of the morpholinoethyl ester of mycophenolic acid (RS-61443) in rat and nonhuman primate recipients of heart allografts. *Transplant Proc.* 1991 Apr;23(2 Suppl 2):19-25.
24. Placebo-controlled study of mycophenolate mofetil combined with cyclosporin and corticosteroids for prevention of acute rejection. *European Mycophenolate Mofetil Cooperative Study Group. Lancet.* 1995 May 27;345(8961):1321-5.
25. Waldmann TA, O'Shea J. The use of antibodies against the IL-2 receptor in transplantation. *Current opinion in immunology.* 1998 Oct;10(5):507-12.
26. Riechmann L, Clark M, Waldmann H, Winter G. Reshaping human antibodies for therapy. *Nature.* 1988 Mar 24;332(6162):323-7.
27. 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 Sep 1;100(5):1715-20.

28. Knechtle SJ, Fernandez LA, Pirsch JD, et al. Campath-1H in renal transplantation: The University of Wisconsin experience. *Surgery*. 2004 Oct;136(4):754-60.
29. Kaufman DB, Leventhal JR, Gallon LG, Parker MA. Alemtuzumab induction and prednisone-free maintenance immunotherapy in simultaneous pancreas-kidney transplantation comparison with rabbit antithymocyte globulin induction - long-term results. *Am J Transplant*. 2006 Feb;6(2):331-9.
30. Kaufman DB, Leventhal JR, Axelrod D, Gallon LG, Parker MA, Stuart FP. Alemtuzumab induction and prednisone-free maintenance immunotherapy in kidney transplantation: comparison with basiliximab induction--long-term results. *Am J Transplant*. 2005 Oct;5(10):2539-48.
31. Todd PA, Brogden RN. Muromonab CD3. A review of its pharmacology and therapeutic potential. *Drugs*. 1989 Jun;37(6):871-99.
32. Bonnefoy-Berard N, Vincent C, Revillard JP. Antibodies against functional leukocyte surface molecules in polyclonal antilymphocyte and antithymocyte globulins. *Transplantation*. 1991 Mar;51(3):669-73.
33. Bourdage JS, Hamlin DM. Comparative polyclonal antithymocyte globulin and antilymphocyte/antilymphoblast globulin anti-CD antigen analysis by flow cytometry. *Transplantation*. 1995 Apr 27;59(8):1194-200.
34. Monaco AP, Abbott WM, Othersen HB, et al. Antiserum to lymphocytes: prolonged survival of canine renal allografts. *Science (New York, NY)*. 1966 Sep 9;153(741):1264-7.
35. Starzl TE, Marchioro TL, Hutchinson DE, Porter KA, Cerilli GJ, Brettschneider L. The clinical use of antilymphocyte globulin in renal homotransplantation. *Transplantation*. 1967 Jul;5(4):Suppl:1100-5.
36. Beatty JD, Friesen E, Linford JH, Israels LG. Antithymocyte globulin (ATG) and trenimon (TR): effects on T cells and graft rejection. *Surg Forum*. 1977;28:327-9.
37. Bonnefoy-Berard N, Revillard JP. Mechanisms of immunosuppression induced by antithymocyte globulins and OKT3. *J Heart Lung Transplant*. 1996 May;15(5):435-42.
38. Brennan DC, Flavin K, Lowell JA, et al. A randomized, double-blinded comparison of Thymoglobulin versus Atgam for induction immunosuppressive therapy in adult renal transplant recipients. *Transplantation*. 1999 Apr 15;67(7):1011-8.
39. Bonnefoy-Berard N, Genestier L, Flacher M, et al. Apoptosis induced by polyclonal antilymphocyte globulins in human B-cell lines. *Blood*. 1994 Feb 15;83(4):1051-9.
40. Genestier L, Fournel S, Flacher M, Assossou O, Revillard JP, Bonnefoy-Berard N. Induction of Fas (Apo-1, CD95)-mediated apoptosis of activated lymphocytes by polyclonal antithymocyte globulins. *Blood*. 1998 Apr 1;91(7):2360-8.

41. Dubey S, Nityanand S. Involvement of Fas and TNF pathways in the induction of apoptosis of T cells by antithymocyte globulin. *Annals of hematology*. 2003 Aug;82(8):496-9.
42. Merion RM, Howell T, Bromberg JS. Partial T-cell activation and anergy induction by polyclonal antithymocyte globulin. *Transplantation*. 1998 Jun 15;65(11):1481-9.
43. Mohty M. Mechanisms of action of antithymocyte globulin: T-cell depletion and beyond. *Leukemia*. 2007 Jul;21(7):1387-94.
44. Crosnier J, Kreis H, Descamps JM, Mansouri R. Are there non-steroid-dependent rejection episodes? *Proceedings of the European Dialysis and Transplant Association*. 1980;17:391-5.
45. Lange H, Muller TF, Ebel H, et al. Immediate and long-term results of ATG induction therapy for delayed graft function compared to conventional therapy for immediate graft function. *Transpl Int*. 1999;12(1):2-9.
46. Kaden J. Eleven years intraoperative ATG bolus. A list of successes. *Ann Transplant*. 2002;7(3):4-10.
47. Kaden J, May G, Strobelt V, Groth J, Muller P. Intraoperative T-cell depletion prior to completion of anastomoses by high-dose single ATG bolus as a new approach to improve long-term results after kidney transplantation. *Transplant Proc*. 1997 Feb-Mar;29(1-2):344-7.
48. Schulak J, May E, Post A, Fasola C, Mulligan D, Sterling R. Reduction of early rejection in adult liver transplantation with ATG induction therapy. *Transplantation proceedings*. 1997 Feb-Mar;29(1-2):555-6.
49. Tchervenkov J, Flemming C, Guttman RD, des Gachons G. Use of thymoglobulin induction therapy in the prevention of acute graft rejection episodes following liver transplantation. *Transplant Proc*. 1997 Nov;29(7A):13S-5S.
50. Starzl TE, Murase N, Abu-Elmagd K, et al. Tolerogenic immunosuppression for organ transplantation. *Lancet*. 2003 May 3;361(9368):1502-10.
51. Basara N, Baurmann H, Kolbe K, et al. Antithymocyte globulin for the prevention of graft-versus-host disease after unrelated hematopoietic stem cell transplantation for acute myeloid leukemia: results from the multicenter German cooperative study group. *Bone marrow transplantation*. 2005 May;35(10):1011-8.
52. Charpentier B, Rostaing L, Berthoux F, et al. A three-arm study comparing immediate tacrolimus therapy with antithymocyte globulin induction therapy followed by tacrolimus or cyclosporine A in adult renal transplant recipients. *Transplantation*. 2003 Mar 27;75(6):844-51.
53. Varghese Z, Abudher MN, Fernando ON, Moorhead JF. Induction therapy with bolus ATG increases cyclosporine sensitivity in renal transplant recipients. *Transplant Proc*. 2001 May;33(3):2251-3.

54. Belitsky P, MacDonald AS, Cohen AD, et al. Comparison of antilymphocyte globulin and continuous i.v. cyclosporine A as induction immunosuppression for cadaver kidney transplants: a prospective randomized study. *Transplant Proc.* 1991 Feb;23(1 Pt 2):999-1000.
55. Shield CF, Edwards EB, Davies DB, Daily OP. Antilymphocyte induction therapy in cadaver renal transplantation: a retrospective, multicenter United Network for Organ Sharing Study. *Transplantation.* 1997 May 15;63(9):1257-63.
56. Mehrabi A, Mood Zh A, Sadeghi M, et al. Thymoglobulin and ischemia reperfusion injury in kidney and liver transplantation. *Nephrol Dial Transplant.* 2007 Sep;22 Suppl 8:viii54-viii60.
57. Szczech LA, Berlin JA, Aradhye S, Grossman RA, Feldman HI. Effect of anti-lymphocyte induction therapy on renal allograft survival: a meta-analysis. *J Am Soc Nephrol.* 1997 Nov;8(11):1771-7.
58. Szczech LA, Berlin JA, Feldman HI. The effect of antilymphocyte induction therapy on renal allograft survival. A meta-analysis of individual patient-level data. Anti-Lymphocyte Antibody Induction Therapy Study Group. *Annals of internal medicine.* 1998 May 15;128(10):817-26.
59. Kasiske BL, Johnson HJ, Goerdt PJ, et al. A randomized trial comparing cyclosporine induction with sequential therapy in renal transplant recipients. *Am J Kidney Dis.* 1997 Nov;30(5):639-45.
60. Abouna GM, Kumar MS, al-Abdullah IH, et al. Induction immunosuppression with antithymocyte globulin in renal transplantation using a variable dose according to the absolute number of CD3+ T cells. *Transplant Proc.* 1995 Oct;27(5):2676-8.
61. Buchler M, Thibault G, al Najjar A, et al. Monitoring of ATG therapy by flow cytometry and lymphocyte counts in renal transplantation. *Transplant Proc.* 1996 Oct;28(5):2817-8.
62. Janeway CA, Travers P, Walport M, Shlomchik M. *Immunobiology.* 6th ed. New York: Garland Science Publishing 2006.
63. Nickerson P, Steurer W, Steiger J, Zheng X, Steele AW, Strom TB. Cytokines and the Th1/Th2 paradigm in transplantation. *Current opinion in immunology.* 1994 Oct;6(5):757-64.
64. Moore KW, O'Garra A, de Waal Malefyt R, Vieira P, Mosmann TR. Interleukin-10. *Annual review of immunology.* 1993;11:165-90.
65. Takeuchi T, Lowry RP, Konieczny B. Heart allografts in murine systems. The differential activation of Th2-like effector cells in peripheral tolerance. *Transplantation.* 1992 Jun;53(6):1281-94.
66. Mottram PL, Han WR, Purcell LJ, McKenzie IF, Hancock WW. Increased expression of IL-4 and IL-10 and decreased expression of IL-2 and interferon-gamma in long-surviving

- mouse heart allografts after brief CD4-monoclonal antibody therapy. *Transplantation*. 1995 Feb 27;59(4):559-65.
67. Daniel V, Arzberger J, Melk A, et al. Predictive indicators of rejection or infection in renal transplant patients. *Transplant Proc*. 1999 Feb-Mar;31(1-2):1364-5.
68. Krensky AM. Molecular biology of transplantation. *Nephron*. 2000 Nov;86(3):260-5.
69. Kilshaw PJ, Brent L, Pinto M. Suppressor T cells in mice made unresponsive to skin allografts. *Nature*. 1975 Jun 5;255(5508):489-91.
70. Nishizuka Y, Sakakura T. Thymus and reproduction: sex-linked dysgenesis of the gonad after neonatal thymectomy in mice. *Science (New York, NY)*. 1969 Nov 7;166(906):753-5.
71. Penhale WJ, Farmer A, McKenna RP, Irvine WJ. Spontaneous thyroiditis in thymectomized and irradiated Wistar rats. *Clinical and experimental immunology*. 1973 Oct;15(2):225-36.
72. Sakaguchi S, Wing K, Miyara M. Regulatory T cells - a brief history and perspective. *European journal of immunology*. 2007 Nov;37 Suppl 1:S116-23.
73. Sakaguchi S. Regulatory T cells: key controllers of immunologic self-tolerance. *Cell*. 2000 May 26;101(5):455-8.
74. Sakaguchi S, Sakaguchi N, Asano M, Itoh M, Toda M. Immunologic self-tolerance maintained by activated T cells expressing IL-2 receptor alpha-chains (CD25). Break-down of a single mechanism of self-tolerance causes various autoimmune diseases. *J Immunol*. 1995 Aug 1;155(3):1151-64.
75. Suri-Payer E, Amar AZ, Thornton AM, Shevach EM. CD4+CD25+ T cells inhibit both the induction and effector function of autoreactive T cells and represent a unique lineage of immunoregulatory cells. *J Immunol*. 1998 Feb 1;160(3):1212-8.
76. Cottrez F, Groux H. Specialization in tolerance: innate CD(4+)CD(25+) versus acquired TR1 and TH3 regulatory T cells. *Transplantation*. 2004 Jan 15;77(1 Suppl):S12-5.
77. Shevach EM. CD4+ CD25+ suppressor T cells: more questions than answers. *Nature reviews*. 2002 Jun;2(6):389-400.
78. Shevach EM, DiPaolo RA, Andersson J, Zhao DM, Stephens GL, Thornton AM. The lifestyle of naturally occurring CD4+ CD25+ Foxp3+ regulatory T cells. *Immunological reviews*. 2006 Aug;212:60-73.
79. Bluestone JA, Abbas AK. Natural versus adaptive regulatory T cells. *Nature reviews*. 2003 Mar;3(3):253-7.
80. Fontenot JD, Gavin MA, Rudensky AY. Foxp3 programs the development and function of CD4+CD25+ regulatory T cells. *Nature immunology*. 2003 Apr;4(4):330-6.

81. Khattri R, Cox T, Yasayko SA, Ramsdell F. An essential role for Scurfin in CD4+CD25+ T regulatory cells. *Nature immunology*. 2003 Apr;4(4):337-42.
82. Hori S, Nomura T, Sakaguchi S. Control of regulatory T cell development by the transcription factor Foxp3. *Science (New York, NY)*. 2003 Feb 14;299(5609):1057-61.
83. Yong Z, Chang L, Mei YX, Yi L. Role and mechanisms of CD4+CD25+ regulatory T cells in the induction and maintenance of transplantation tolerance. *Transpl Immunol*. 2007 Feb;17(2):120-9.
84. McHugh RS, Whitters MJ, Piccirillo CA, et al. CD4(+)CD25(+) immunoregulatory T cells: gene expression analysis reveals a functional role for the glucocorticoid-induced TNF receptor. *Immunity*. 2002 Feb;16(2):311-23.
85. Liu W, Putnam AL, Xu-Yu Z, et al. CD127 expression inversely correlates with FoxP3 and suppressive function of human CD4+ T reg cells. *The Journal of experimental medicine*. 2006 Jul 10;203(7):1701-11.
86. Hartigan-O'Connor DJ, Poon C, Sinclair E, McCune JM. Human CD4+ regulatory T cells express lower levels of the IL-7 receptor alpha chain (CD127), allowing consistent identification and sorting of live cells. *Journal of immunological methods*. 2007 Jan 30;319(1-2):41-52.
87. Waldmann H, Adams E, Fairchild P, Cobbold S. Infectious tolerance and the long-term acceptance of transplanted tissue. *Immunological reviews*. 2006 Aug;212:301-13.
88. Shevach EM. From vanilla to 28 flavors: multiple varieties of T regulatory cells. *Immunity*. 2006 Aug;25(2):195-201.
89. Roncarolo MG, Bacchetta R, Bordignon C, Narula S, Levings MK. Type 1 T regulatory cells. *Immunological reviews*. 2001 Aug;182:68-79.
90. Mills KH. Regulatory T cells: friend or foe in immunity to infection? *Nature reviews*. 2004 Nov;4(11):841-55.
91. Simon T, Opelz G, Weimer R, et al. The effect of ATG on cytokine and cytotoxic T-lymphocyte gene expression in renal allograft recipients during the early post-transplant period. *Clinical transplantation*. 2003 Jun;17(3):217-24.
92. van de Linde P, Tysma OM, Medema JP, et al. Mechanisms of antibody immunotherapy on clonal islet reactive T cells. *Human immunology*. 2006 Apr-May;67(4-5):264-73.
93. Weimer R, Staak A, Susal C, et al. ATG induction therapy: long-term effects on Th1 but not on Th2 responses. *Transpl Int*. 2005 Feb;18(2):226-36.
94. Bonnefoy-Berard N, Fournel S, Genestier L, Flacher M, Quemeneur L, Revillard JP. In vitro functional properties of antithymocyte globulins: clues for new therapeutic applications? *Transplant Proc*. 1998 Dec;30(8):4015-7.

95. Lopez M, Clarkson MR, Albin M, Sayegh MH, Najafian N. A novel mechanism of action for anti-thymocyte globulin: induction of CD4+CD25+Foxp3+ regulatory T cells. *J Am Soc Nephrol.* 2006 Oct;17(10):2844-53.
96. Walker MR, Kasprovicz DJ, Gersuk VH, et al. Induction of FoxP3 and acquisition of T regulatory activity by stimulated human CD4+CD25- T cells. *The Journal of clinical investigation.* 2003 Nov;112(9):1437-43.
97. Feng X, Kajigaya S, Solomou EE, et al. Rabbit ATG but not horse ATG promotes expansion of functional CD4+CD25highFOXP3+ regulatory T cells in vitro. *Blood.* 2008 Apr 1;111(7):3675-83.
98. Higuchi R, Dollinger G, Walsh PS, Griffith R. Simultaneous amplification and detection of specific DNA sequences. *Bio/technology (Nature Publishing Company).* 1992 Apr;10(4):413-7.
99. Higuchi R, Fockler C, Dollinger G, Watson R. Kinetic PCR analysis: real-time monitoring of DNA amplification reactions. *Bio/technology (Nature Publishing Company).* 1993 Sep;11(9):1026-30.
100. Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods (San Diego, Calif.* 2001 Dec;25(4):402-8.
101. Chirgwin JM, Przybyla AE, MacDonald RJ, Rutter WJ. Isolation of biologically active ribonucleic acid from sources enriched in ribonuclease. *Biochemistry.* 1979 Nov 27;18(24):5294-9.
102. Hannet I, Erkeller-Yuksel F, Lydyard P, Deneys V, DeBruyere M. Developmental and maturational changes in human blood lymphocyte subpopulations. *Immunology today.* 1992 Jun;13(6):215, 8.
103. Comans-Bitter WM, de Groot R, van den Beemd R, et al. Immunophenotyping of blood lymphocytes in childhood. Reference values for lymphocyte subpopulations. *The Journal of pediatrics.* 1997 Mar;130(3):388-93.
104. Baecher-Allan C, Brown JA, Freeman GJ, Hafler DA. CD4+CD25high regulatory cells in human peripheral blood. *J Immunol.* 2001 Aug 1;167(3):1245-53.
105. Baecher-Allan C, Viglietta V, Hafler DA. Human CD4+CD25+ regulatory T cells. *Seminars in immunology.* 2004 Apr;16(2):89-98.
106. Theodorakis J, Schneeberger H, Illner WD, Stangl M, Zanker B, Land W. Aggressive treatment of the first acute rejection episode using first-line anti-lymphocytic preparation reduces further acute rejection episodes after human kidney transplantation. *Transpl Int.* 1998;11 Suppl 1:S86-9.
107. Lopez M. ATG induziert regulatorische Tregs aus Cd4+CD25- T-Zellen. 2006.

108. Bestard O, Cruzado JM, Mestre M, et al. Achieving donor-specific hyporesponsiveness is associated with FOXP3+ regulatory T cell recruitment in human renal allograft infiltrates. *J Immunol.* 2007 Oct 1;179(7):4901-9.
109. Stauch D, Dernier A, Sarmiento Marchese E, et al. Targeting of natural killer cells by rabbit antithymocyte globulin and campath-1H: similar effects independent of specificity. *PLoS ONE.* 2009;4(3):e4709.
110. Louis S, Audrain M, Cantarovich D, et al. Long-term cell monitoring of kidney recipients after an antilymphocyte globulin induction with and without steroids. *Transplantation.* 2007 Mar 27;83(6):712-21.
111. Ardalan MR, Maljaei H, Shoja MM, et al. Calcitriol started in the donor, expands the population of CD4+CD25+ T cells in renal transplant recipients. *Transplant Proc.* 2007 May;39(4):951-3.
112. Allan SE, Passerini L, Bacchetta R, et al. The role of 2 FOXP3 isoforms in the generation of human CD4+ Tregs. *The Journal of clinical investigation.* 2005 Nov;115(11):3276-84.
113. Amlot PL, Rawlings E, Fernando ON, et al. Prolonged action of a chimeric interleukin-2 receptor (CD25) monoclonal antibody used in cadaveric renal transplantation. *Transplantation.* 1995 Oct 15;60(7):748-56.
114. Kovarik JM, Rawlings E, Sweny P, et al. Pharmacokinetics and immunodynamics of chimeric IL-2 receptor monoclonal antibody SDZ CHI 621 in renal allograft recipients. *Transpl Int.* 1996;9 Suppl 1:S32-3.
115. Monti P, Scirpoli M, Maffi P, et al. Rapamycin monotherapy in patients with type 1 diabetes modifies CD4+CD25+FOXP3+ regulatory T cells. *Diabetes.* 2008 Jun 16.
116. Haas J, Fritzsching B, Trubswetter P, et al. Prevalence of newly generated naive regulatory T cells (Treg) is critical for Treg suppressive function and determines Treg dysfunction in multiple sclerosis. *J Immunol.* 2007 Jul 15;179(2):1322-30.
117. Pearl JP, Parris J, Hale DA, et al. Immunocompetent T-cells with a memory-like phenotype are the dominant cell type following antibody-mediated T-cell depletion. *Am J Transplant.* 2005 Mar;5(3):465-74.
118. Wu Z, Bensinger SJ, Zhang J, et al. Homeostatic proliferation is a barrier to transplantation tolerance. *Nature medicine.* 2004 Jan;10(1):87-92.
119. Vukmanovic-Stejic M, Zhang Y, Cook JE, et al. Human CD4+ CD25hi Foxp3+ regulatory T cells are derived by rapid turnover of memory populations in vivo. *The Journal of clinical investigation.* 2006 Sep;116(9):2423-33.
120. Preville X, Flacher M, LeMauff B, et al. Mechanisms involved in antithymocyte globulin immunosuppressive activity in a nonhuman primate model. *Transplantation.* 2001 Feb 15;71(3):460-8.

121. Minamimura K, Gao W, Maki T. CD4+ regulatory T cells are spared from deletion by antilymphocyte serum, a polyclonal anti-T cell antibody. *J Immunol.* 2006 Apr 1;176(7):4125-32.
122. Apostolou I, Verginis P, Kretschmer K, Polansky J, Huhn J, von Boehmer H. Peripherally Induced Treg: Mode, Stability, and Role in Specific Tolerance. *Journal of clinical immunology.* 2008 Oct 8.
123. Zheng SG, Wang JH, Gray JD, Soucier H, Horwitz DA. Natural and induced CD4+CD25+ cells educate CD4+CD25- cells to develop suppressive activity: the role of IL-2, TGF-beta, and IL-10. *J Immunol.* 2004 May 1;172(9):5213-21.
124. Battaglia M, Stabilini A, Migliavacca B, Horejs-Hoeck J, Kaupper T, Roncarolo MG. Rapamycin promotes expansion of functional CD4+CD25+FOXP3+ regulatory T cells of both healthy subjects and type 1 diabetic patients. *J Immunol.* 2006 Dec 15;177(12):8338-47.
125. Roncarolo MG, Gregori S, Battaglia M, Bacchetta R, Fleischhauer K, Levings MK. Interleukin-10-secreting type 1 regulatory T cells in rodents and humans. *Immunological reviews.* 2006 Aug;212:28-50.
126. Liu Z, Fang Y, Wang X, Wang P, Yun P, Xu H. Upregulation of molecules associated with T-regulatory function by thymoglobulin pretreatment of human CD4+ cells. *Transplantation.* 2008 Nov 27;86(10):1419-26.
127. LaCorcia G, Swistak M, Lawendowski C, et al. Polyclonal rabbit antithymocyte globulin exhibits consistent immunosuppressive capabilities beyond cell depletion. *Transplantation.* 2009 Apr 15;87(7):966-74.
128. Beiras-Fernandez A, Thein E, Hammer C. Induction of immunosuppression with polyclonal antithymocyte globulins: an overview. *Exp Clin Transplant.* 2003 Dec;1(2):79-84.
129. Lowsky R, Takahashi T, Liu YP, et al. Protective conditioning for acute graft-versus-host disease. *The New England journal of medicine.* 2005 Sep 29;353(13):1321-31.
130. Regan JF, Lyonnais C, Campbell K, Smith LV, Buelow R. Total and active thymoglobulin levels: effects of dose and sensitization on serum concentrations. *Transpl Immunol.* 2001 Oct;9(1):29-36.
131. Bieber CP, Griep RB, Oyer PE, Wong J, Stinson EB. Use of rabbit antithymocyte globulin in cardiac transplantation. Relationship of serum clearance rates to clinical outcome. *Transplantation.* 1976 Nov;22(5):478-88.
132. Guttman RD, Caudrelier P, Alberici G, Touraine JL. Pharmacokinetics, foreign protein immune response, cytokine release, and lymphocyte subsets in patients receiving thymoglobulin and immunosuppression. *Transplant Proc.* 1997 Nov;29(7A):24S-6S.

133. Bunn D, Lea CK, Bevan DJ, Higgins RM, Hendry BM. The pharmacokinetics of anti-thymocyte globulin (ATG) following intravenous infusion in man. *Clinical nephrology*. 1996 Jan;45(1):29-32.
134. Muller TF, Grebe SO, Neumann MC, et al. Persistent long-term changes in lymphocyte subsets induced by polyclonal antibodies. *Transplantation*. 1997 Nov 27;64(10):1432-7.
135. Hardinger KL. Rabbit antithymocyte globulin induction therapy in adult renal transplantation. *Pharmacotherapy*. 2006 Dec;26(12):1771-83.
136. Schubert S, Renner C, Hammer M, et al. Relationship of immunosuppression to Epstein-Barr viral load and lymphoproliferative disease in pediatric heart transplant patients. *J Heart Lung Transplant*. 2008 Jan;27(1):100-5.
137. Schubert S, Abdul-Khaliq H, Lehmkuhl HB, et al. Diagnosis and treatment of post-transplantation lymphoproliferative disorder in pediatric heart transplant patients. *Pediatric transplantation*. 2008 Jun 1.
138. Baron PW, Ojogho ON, Yorgin P, et al. Comparison of outcomes with low-dose anti-thymocyte globulin, basiliximab or no induction therapy in pediatric kidney transplant recipients: a retrospective study. *Pediatric transplantation*. 2008 Feb;12(1):32-9.
139. Dharnidharka VR, Stevens G. Risk for post-transplant lymphoproliferative disorder after polyclonal antibody induction in kidney transplantation. *Pediatric transplantation*. 2005 Oct;9(5):622-6.
140. Caillard S, Dharnidharka V, Agodoa L, Bohlen E, Abbott K. Posttransplant lymphoproliferative disorders after renal transplantation in the United States in era of modern immunosuppression. *Transplantation*. 2005 Nov 15;80(9):1233-43.
141. Goggins WC, Pascual MA, Powelson JA, et al. A prospective, randomized, clinical trial of intraoperative versus postoperative Thymoglobulin in adult cadaveric renal transplant recipients. *Transplantation*. 2003 Sep 15;76(5):798-802.
142. Bloom DD, Chang Z, Fechner JH, et al. CD4+ CD25+ FOXP3+ regulatory T cells increase de novo in kidney transplant patients after immunodepletion with Campath-1H. *Am J Transplant*. 2008 Apr;8(4):793-802.
143. Baan CC, Velthuis JH, van Gurp EA, et al. Functional CD25(bright+) alloresponsive T cells in fully immunosuppressed renal allograft recipients. *Clinical transplantation*. 2007 Jan-Feb;21(1):63-71.
144. Baron U, Floess S, Wieczorek G, et al. DNA demethylation in the human FOXP3 locus discriminates regulatory T cells from activated FOXP3(+) conventional T cells. *European journal of immunology*. 2007 Sep;37(9):2378-89.
145. Polansky JK, Kretschmer K, Freyer J, et al. DNA methylation controls Foxp3 gene expression. *European journal of immunology*. 2008 Jun;38(6):1654-63.

146. Wiczorek G, Asemissen A, Model F, et al. Quantitative DNA methylation analysis of FOXP3 as a new method for counting regulatory T cells in peripheral blood and solid tissue. *Cancer research*. 2009 Jan 15;69(2):599-608.
147. Naujokat C, Berges C, Fuchs D, Sadeghi M, Opelz G, Daniel V. Antithymocyte globulins suppress dendritic cell function by multiple mechanisms. *Transplantation*. 2007 Feb 27;83(4):485-97.
148. Yamazaki S, Inaba K, Tarbell KV, Steinman RM. Dendritic cells expand antigen-specific Foxp3+ CD25+ CD4+ regulatory T cells including suppressors of alloreactivity. *Immunological reviews*. 2006 Aug;212:314-29.
149. Tarbell KV, Yamazaki S, Steinman RM. The interactions of dendritic cells with antigen-specific, regulatory T cells that suppress autoimmunity. *Seminars in immunology*. 2006 Apr;18(2):93-102.

## 8. Anhang

### 8.1 Tabellen- und Abbildungsverzeichnis

Tab. 1: Häufigste Ursachen der Niereninsuffizienz [1]

Tab. 2: Banff 97-Kategorien für die Diagnose allogener Nierentransplantat-Bioptate [18]

Tab. 3: Klassifikation der Pankreasbiopsien nach Banff [19]

Tab. 4: Liste von in Deutschland verwendeten Anti-Lymphozyten-Seren

Tab. 5: Bekannte Ziel-Antigene von ATGs [43]

Tab. 6: Patienten-Demographie

Tab. 7: Immunsuppressions-Protokoll bei kombinierter P/NTx

Tab. 8: Emissionsspektrum „FACSCalibur

Tab. 9: Fluorochrome und Antikörper

Tab. 10: Verwendete TaqMan-Panel

Tab. 11: cDNA-Synthese-Schema

Abb. 1: TCR einer naiven T-Zelle [62].

Abb. 2: Hauptpopulationen CD4+ und CD8+ regulatorischer T-Zellen [90]

Abb. 3: „Gating-Strategie“ für T-, B- und NK-Zellpopulationen

Abb. 4: Thymoglobulin depletiert T- und NK-Zellen

Abb. 5: Thymoglobulin depletiert CD3+CD4+ T-Zellen

Abb. 6: Depletion der CD56+ NK-Zellen durch Thymoglobulin

Abb. 7: B-Lymphozyten werden nicht durch Thymoglobulin depletiert

Abb. 8: Depletion der T- und NK-Zellen nach Thymoglobulin-Administration am Beispiel eines P/NTx-Patienten

Abb. 9: Anti-Rejektionstherapie mit Thymoglobulin am Beispiel eines NTx-Patienten

Abb. 10: Die Standard-Immunsuppression depletiert die CD3+CD4+ T-Zellen nicht

Abb. 11: Keine Veränderungen der prozentualen B-Zell-Anteile in der Kontrollgruppe

Abb. 12: Abnahme der NK-Zell-Expression unter Standard-Immunsuppression

Abb. 13: Die Standard-Immunsuppression führt zu keiner verminderten Expression der T-, B- oder NK-Zellen

Abb. 14: Die Expression von CD25 und FoxP3 auf T-Zellen ist Thymoglobulin-dosisabhängig

- Abb. 15: Expansion der CD3+CD4+CD25+ T-Zellen nach Thymoglobulin-Therapie
- Abb. 16: Signifikant unterschiedliche Expressionen für CD25+ auf CD3+CD4+T-Zellen in beiden Gruppen nach Immunsuppression
- Abb. 17: Depletion der CD3+CD4+ T-Zellen durch Thymoglobulin bei gleichzeitiger Expansion CD25+ T-Zellen
- Abb. 18: Expansion der CD3+CD4+CD25+/<sup>high</sup> T-Zellpopulation am Beispiel eines P/NTx-Patienten nach Thymoglobulin-Administration
- Abb. 19: Keine Zunahme der CD25+/<sup>high</sup>-Expression auf CD3+CD4+ T-Zellen nach Standard-Immunsuppression.
- Abb. 20: Thymoglobulin führt zu einem Anstieg der CD25<sup>high</sup>-Expression
- Abb. 21: Abnahme der prozentualen CD25<sup>high</sup>-Expression unter Standard-Immunsuppression
- Abb. 22: „Gating-Strategie“ für CD3+CD4+CD25<sup>high</sup>CD127<sup>low</sup> T-Zellen am Beispiel eines Thymoglobulin-behandelten Patienten
- Abb. 23: Expressions-Verschiebung der CD3+CD4+CD25+/<sup>high</sup> T-Zellen von CD127<sup>low</sup> zu CD127+
- Abb. 24: Immunsuppression mit Thymoglobulin führt zur vermehrten Expression von CD127<sup>low</sup> T-Zellen
- Abb. 25: Signifikant erhöhte FoxP3-Expression nach Thymoglobulin-Therapie
- Abb. 26: Erhöhte IL-10-Konzentrationen im Serum Thymoglobulin-behandelter Patienten

## **8.2 Curriculum vitae**

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

---

### 8.3 Publikationsliste

“In vivo expansion of CD4+CD25+FOXP3+ regulatory T cells after ATG induction therapy”. Katja Kotsch, Arne Földner, **Götz-Christian Melloh**, Diana Stauch, Andreas Pascher, Hans-Dieter Volk, Peter Neuhaus and Johann Pratschke. AST 2008, Poster.

“In vivo expansion of CD4+CD25+FOXP3+ regulatory T cells after ATG induction therapy”. Katja Kotsch, Arne Földner, **Götz-Christian Melloh**, Diana Stauch, Andreas Pascher, Hans-Dieter Volk, Peter Neuhaus and Johann Pratschke. DGTI 2008, Vortrag.

“In vivo expansion of CD4+CD25+FOXP3+ regulatory T cells after ATG induction therapy”. Katja Kotsch, Diana Stauch, Arne Földner, **Götz-Christian Melloh**, Ali Yayahzadeh, Hans-Dieter Volk, Andreas Pascher, Peter Neuhaus and Johann Pratschke. DTG 2008, Vortrag.

“In vivo induction of CD4+CD25+FOXP3+ regulatory T cells following induction therapy with polyclonal antithymocyte globulin is reflected at the epigenetic level”. Diana Stauch, Mustafa Solmaz, **Götz-Christian Melloh**, Arne Földner, Ali Yayahzadeh, Constanze Schönemann, Udo Baron, Sven Olek, Johann Pratschke and Katja Kotsch. Paper eingereicht.

## **8.4 Selbstständigkeitserklärung**

„Ich, Götz-Christian Melloh, erkläre, dass ich die vorgelegte Dissertationsschrift mit dem Thema: „Untersuchungen zum Einfluss von Thymoglobulin auf Lymphozyten-Populationen nach solider 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.“

Berlin, Juni 2010

## 8.5 Danksagung

Zuerst möchte ich meinem Doktorvater Herrn Prof. Dr. med. Johann Pratschke für die Überlassung der interessanten Thematik danken. Besondere Beachtung verdient hierbei meine nimmermüde Betreuerin PD Dr. rer. nat. Katja Kotsch, die jederzeit versuchte mir ein Ohr zu leihen und die Arbeit vorantrieb.

Des Weiteren danke ich allen Mitgliedern der Arbeitsgruppe Kotsch, die mir bei den Labortätigkeiten mit Rat und Tat zur Seite standen. Ganz besonders hervorheben möchte ich meinen Leidensgenossen, Freund und Mitbewohner Arne Földner – gemeinsam sind wir stark! Zudem bin ich Diana Stauch zu großem Dank verpflichtet. Sie hat mir viele der Labortätigkeiten nahe gebracht und – wenn auch nicht immer im Eigeninteresse – einen Großteil der Versuche mitgetragen.

Nicht zuletzt wäre diese Arbeit wohl nie ohne die finanzielle Unterstützung meiner Eltern, die aufbauenden und um Verständnis bemühten Worte meiner Geschwister und Freunde zu realisieren gewesen. Danke!