UNIVERSITÄTSKLINIKUM HAMBURG-EPPENDORF

Klinik für Hepatobiliäre Chirurgie und Transplantationschirurgie

Kommissarischer Klinikdirektor:
Prof. Dr. med. Fischer

Effekte der B-Zelldepletion auf die Transplantatabstoßung: Untersuchung in einem MHC-inkompatiblen Rattenmodell

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
an der Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg

vorgelegt von:

Anja Maja Röske
aus Hamburg

Hamburg 2018

Angenommen von der Medizinischen Fakultät am: 20.07.2018

Veröffentlicht mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg

Prüfungsausschuss, der/die Vorsitzende: Prof. Dr. Martina Koch

Prüfungsausschuss, 2. Gutachter/in: Prof. Dr. Friedrich Thaiss

Inhaltsverzeichnis

Tabellenverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis

1. Einleitung

1.1. Nierentransplantation in Deutschland 1
1.2. Nierentransplantatabstoßung 4
1.3. Das MHC-inkompatible Rattenmodell 7
1.4. Bedeutung von Rituximab in der Immunologie 9
1.5. Fragestellungen 11

2. Material und Methoden

2.1. Versuchstiere 12
2.1.1. Genehmigung der Tierversuche 12
2.1.2. Nierentransplantiertes Rattenmodell 12
2.1.3. Versuchsgruppen 13
2.2. Beurteilung der Nierenfunktion 16
2.2.1. Klinischer Zustand und Abbruchkriterien 16
2.2.2. Untersuchung des Serumkreatinins 17
2.2.3. Messung des Albumins im Urin durch ELISA 17
2.3. Tötung der Versuchtstiere und Organentnahme 18
2.4. FACS-Analyse der Lymphozytensubpopulationen im peripheren Blut und in den lymphatischen Organen 20
2.4.1. Retrobulbäre Blutentnahme 20
2.4.2. Lymphozytenisolierung aus dem peripheren Blut 20
2.4.3. Lebenzellzahlbestimmung mittels Trypanblau 21
2.4.4. Lymphozytenisolierung aus den Lymphknoten 21
2.4.5. Lymphozytenisolierung aus der Milz 21
2.4.6. Lymphozytenisolierung aus dem Knochenmark 22
2.4.7. Leukozytenzählung mittels Türks-Lösung 22
2.4.8. Pappenheimfärbung der Blutausstriche 23
2.4.9. Färbung der Lymphozyten 23
2.4.10. Durchflusszytometrische Analyse der Lymphozytensubpopulationen 25

2.5. Histologische Untersuchung der NTx-Nieren 26
2.5.1 Histopathologische Beurteilung 26
2.5.2. Banff 1997 diagnostische Kategorien für Nierentransplantatbiopsien Banff '09 Update 26
2.5.3. Anfertigung von Gefrierschnitten 28
2.5.4. Immunhistochemische Färbung der transplantatinfiltrierenden Zellen 29
2.5.5. Auswertung der Histologie 32
2.6. Statistische Auswertung 33

3. Ergebnisse

3.1. Überleben 34
3.1.1. Versuchsgruppe "αCD20 i.v." 34
3.1.2. Versuchsgruppe "Iso" 34
3.1.3. Versuchsgruppe "Allo Akut" 35
3.1.4. Versuchsgruppe "Allo αCD20 i.v." 35
3.2. Klinische Befunde 37
3.2.1. Körpergewicht 37
3.2.2. Serumkreatinin 39
3.2.3. Albumin im Urin 41
3.3. Durchflusszytometrische Analysen der Lymphozyten im peripheren Blut Kontrollgruppe "αCD20 i.v." 42
3.3.1. Gesamtlymphozyten 42
3.3.2. CD3+-Zellen: T-Lymphozyten 43
3.3.3. CD3+CD4+-Zellen: T-Helferzellen 44
3.3.4. CD3+CD8+-Zellen: Zytotoxische T-Zellen 44
3.3.5. CD45RA+IgG+-Zellen: B-Zellen 45
3.3.6. CD3+CD161+-Zellen: NKT-Zellen 47
3.3.7. CD3–CD161^{high+}-Zellen: NK-Zellen 47
3.3.8. CD4+CD25+: "Aktivierte T-Zellen" 48
3.3.9. CD4+FoxP3+: "Regulatorische T-Zellen" 48
3.4. Durchflusszytometrische Analysen der Lymphozyten des peripheren Bluts der transplantierten Gruppen 49
3.4.1. Gesamtlymphozyten 49
3.4.2. CD3+-Zellen: T-Lymphozyten 50

3.4.3. CD3+CD4+-Zellen: T-Helferzellen 51
3.4.4. CD3+CD8+-Zellen: Zytotoxische T-Zellen 52
3.4.5. CD45RA+IgG+-Zellen: B-Zellen 53
3.4.6. CD3+CD161+-Zellen: NKT-Zellen 55
3.4.7. CD3–CD161^{high+}-Zellen: NK-Zellen 56
3.4.8. CD4+CD25+: "Aktivierte T-Zellen" 57
3.4.9. CD4+FoxP3+: "Regulatorische T-Zellen" 58
3.5. Durchflusszytometrische Analysen der Lymphozyten der lymphatischen Organe 59
3.5.1. CD3+-Zellen: T-Lymphozyten 59
3.5.2. CD3+CD4+-Zellen: T-Helferzellen 60
3.5.3. CD3+CD8+-Zellen: Zytotoxische T-Zellen 61
3.5.4. CD45RA+IgG+-Zellen: B-Zellen 62
3.5.5. CD3+CD161+-Zellen: NKT-Zellen 63
3.5.6. CD3–CD161^{high+}Zellen: NK-Zellen 63
3.6. Pathologische Beurteilung der NTx-Nieren 64
3.7. Immunhistochemische Analyse Nierentransplantate 66
3.7.1. Transplantatinfiltrierende T-Zellen 66
3.7.2. Transplantatinfiltrierende CD8+-Zellen 68
3.7.3. Transplantatinfiltrierende NK-Zellen 70
3.7.4. Transplantatinfiltrierende Makrophagen und Monozyten 72
3.7.5. Transplantatinfiltrierende B-Zellen 74

4. Diskussion 76

5. Zusammenfassung 85

Quellenverzeichnis

Lebenslauf

Danksagung

Eidesstattliche Versicherung

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1 MHC-Haplotypen kongener LEW-Stämme

Tabelle 2 Verwendete Antikörper in der durchflusszytometrischen Messung

Tabelle 3 Grade und Eigenschaften morphologischer Korrelate der Transplantatabstoßung

Tabelle 4 Verwendete Primärantikörper in der immunhistochemischen Färbung

Tabelle 5 Transplantatpathologie Allo Akut + Allo aCD20 i.v. d7

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1 Anmeldungen und Nierentransplantationen in Deutschland

Abbildung 2 Ausprägung der Antikörper im Verlauf der B-Zellentwicklung

Abbildung 3 Übersicht über die Versuchsgruppen

Abbildung 4 Überleben nach Nierentransplantation "Allo Akut" und "Allo αCD20 i.v."

Abbildung 5 Verlauf des Körpergewicht nach isogener NTx und αCD20-Injektion

Abbildung 6 Verlauf des Körpergewicht nach NTx "Iso", "Allo.Akut" und "Allo αCD20 i.v"

Abbildung 7 Serumkreatinin nach Nierentransplantation im Verlauf

Abbildung 8 Verlauf des Urinalbumins nach NTx/ αCD20 i.v. Gabe

Abbildung 9 Verlauf der prozentualen und absoluten CD45+CD3+-Zellen im peripheren Blut "αCD20 i.v."

Abbildung 10 Verlauf der prozentualen CD45+CD3+CD4+-Zellen im peripheren Blut "αCD20 i.v."

Abbildung 11 Verlauf der prozentualen CD45+CD3+CD8+-Zellen im peripheren Blut "αCD20 i.v."

Abbildung 12 Dotplot der Färbung mit CD45+CD45RA+IgG1+-Zellen im peripheren Blut "αCD20 i.v." prae injektionem und Woche 1

Abbildung 13 Verlauf der prozentualen und absoluten CD45+CD45RA+IgG+-Zellen im peripheren Blut "αCD20 i.v."

Abbildung 14 Verlauf der prozentualen CD45+CD3–CD161++-Zellen im peripheren Blut "αCD20 i.v."

Abbildung 15 Verlauf der prozentualen und absoluten CD45+CD4+CD25+-Zellen im peripheren Blut "αCD20 i.v."

Abbildung 16 (A) Verlauf der absoluten Lymphozytenanzahl im peripheren Blut "Iso", "Allo Akut" und "Allo αCD20 i.v"

Abbildung 17 (A) Verlauf der prozentualen CD45+CD3+-Zellen im peripheren Blut "Iso", "Allo Akut" und "Allo αCD20 i.v" (B) Verlauf der absoluten CD45+CD3+-Zellen im peripheren Blut "Iso", "Allo Akut" und "Allo αCD20 i.v"

Abbildung 18 (A) Verlauf der prozentualen CD45+CD3+CD4+-Zellen im peripheren Blut "Iso", "Allo Akut" und "Allo αCD20 i.v", (D) Verlauf der absoluten CD45+CD3+CD4+-Zellen im peripheren Blut "Iso", "Allo Akut" und "Allo αCD20 i.v"

Abbildung 19 (A) Verlauf der prozentualen CD45+CD3+CD8+-Zellen im peripheren Blut "Iso", "Allo Akut" und "Allo αCD20 i.v" (B) Verlauf der absoluten CD45+CD3+CD8+-Zellen im peripheren Blut "Iso", "Allo Akut" und "Allo αCD20 i.v"

Abbildung 20 (A) Verlauf der prozentualen CD45+CD45RA+IgG+-Zellen im peripheren Blut "Iso", "Allo Akut" und "Allo αCD20 i.v" (B) Verlauf der absoluten CD45+CD45RA+IgG+-Zellen im peripheren Blut "Iso", "Allo Akut" und "Allo αCD20 i.v"

Abbildung 21 (A) Verlauf der prozentualen CD45+CD3+CD161+-Zellen im peripheren Blut "Iso", "Allo Akut" und "Allo αCD20 i.v" (B) Verlauf der absoluten CD45+CD3+CD161+-Zellen im peripheren Blut "Iso", "Allo Akut" und "Allo αCD20 i.v"

Abbildung 22 (A) Verlauf der prozentualen CD45+CD3–CD161++-Zellen im peripheren Blut "Iso", "Allo Akut" und "Allo αCD20 i.v" (B) Verlauf der absoluten CD45+CD3–CD161++-Zellen im peripheren Blut "Iso", "Allo Akut" und "Allo αCD20 i.v"

Abbildung 23 (A) Verlauf der prozentualen CD45+CD4+CD25+-Zellen im peripheren Blut "Iso", "Allo Akut" und "Allo αCD20 i.v" (B) Verlauf der absoluten CD45+CD4+CD25+-Zellen im peripheren Blut "Iso", "Allo Akut" und "Allo αCD20 i.v"

Abbildung 24 (A) Verlauf der prozentualen CD45+CD4+FoxP3+-Zellen im peripheren Blut "Iso", "Allo Akut" und "Allo αCD20 i.v" (B) Verlauf der absoluten CD45+CD4+FoxP3+-Zellen im peripheren Blut "Iso", "Allo Akut" und "Allo αCD20 i.v"

Abbildung 25 Verlauf der prozentualen CD45+CD3+-Zellen der lymphatischen Organe. LK=Lymphknoten, Milz, KM=Knochenmark in "Iso", "Allo Akut" und "Allo αCD20 i.v" zum Zeitpunkt des Todes

Abbildung 26 Verlauf der prozentualen CD45+CD3+CD4+-Zellen der lymphatischen Organe. LK=Lymphknoten, Milz, KM=Knochenmark in "Iso", "Allo Akut" und "Allo αCD20 i.v" zum Zeitpunkt des Todes

Abbildung 27 Verlauf der prozentualen CD45+CD3+CD8+-Zellen der lymphatischen Organe. LK=Lymphknoten, Milz, KM=Knochenmark in "Iso", "Allo Akut" und "Allo αCD20 i.v" zum Zeitpunkt des Todes

Abbildung 28 Verlauf der prozentualen CD45+CD45RA+IgG+-Zellen der lymphatischen Organe. LK=Lymphknoten, Milz, KM=Knochenmark in "Iso", "Allo Akut" und "Allo αCD20 i.v" zum Zeitpunkt des Todes

Abbildung 29 Verlauf der prozentualen CD45+CD3+CD161+-Zellen der lymphatischen Organe. LK=Lymphknoten, Milz, KM=Knochenmark in "Iso", "Allo Akut" und "Allo αCD20 i.v" zum Zeitpunkt des Todes

Abbildung 30 Humorale Abstoßung der NTx-Nieren in "Allo αCD20 i.v."

Abbildung 31 T-Lymphozyteninfiltrate der NTx-Niere in "Allo Akut" und "Allo αCD20 i.v."

Abbildung 32 T-Zellinfiltrate der NTx-Niere in "Allo Akut" (A) d7, (B) d21

Abbildung 33 CD8+–Zellinfiltrate der NTx-Niere in "Allo Akut" und "Allo αCD20 i.v"

Abbildung 34 CD8+–Zellinfiltrate der NTx-Niere in "Allo Akut" (A) d7, (B) d21; "Allo αCD20 i.v." (C) d7, (D) d21

Abbildung 35 NK–Zellinfiltrate der NTx-Niere in "Allo Akut" und "Allo αCD20 i.v"

Abbildung 36 NK-Zellinfiltrate der NTx-Niere in "Allo Akut" (A) d7, (B) d21, "Allo αCD20 i.v." (D) d7, (E) d21

Abbildung 37 Makrophagen/Monozyten-Infiltrate der NTx-Niere in "Allo Akut" und "Allo αCD20 i.v"

Abbildung 38 Makrophagen/Monozyten-Infiltrate der NTx-Niere in "Allo Akut" (A) d21; "Allo αCD20 i.v." (B) d7, (C) d21

Abbildung 39 B-Zell-Infiltrate der NTx-Niere in "Allo Akut" und "Allo αCD20 i.v"

Abbildung 40 B-Zellinfiltrate der NTx-Niere "Allo Akut" (A) d7, (B) d21, "Allo αCD20 i.v." (C) d21

Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
AB0i	AB0 incompatible
αCD20	Anti CD20
AEC	3-Amino-9-ethylcarbazol,
Allo	allogen
ADCC	Antikörperabhängige zellvermittelte Zytotoxizität
AP	Aminoperoxidase
Aqua dest.	Destilliertes Wasser
B-Zellen	B-Lymphozyten
BSA	Bovine serum albumin
°C	Grad Celsius
Ca.	circa
CD	Cluster of Differentiation
d	dezi
d	Tag
DSA	Donor spezifische Antikörper
DSO	Deutsche Stiftung für Organtransplantation
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
Et al.	et alii
FACS	Fluorescence activated cell sorter
FBS	Fetal bovine serum
FDA	Food and Drug Administration (dt. Behörde für Lebens- und Arzneimittel)
FITC	Fluorescein-Isothyocyanat
Fix/Perm	Fixation & Permeabilization Kit

FOXP3	Forkhead-Box-Protein P3
FSC	Forward Scatter
GFR	Glomeruläre Filtrationsrate
g	gramm
h	Stunde
HLA	Human Leucocyte Antigen
HLAi	HLA incompatible
HPF	High power field
Ig	Immunglobulin
Iso	Isogen
i.v.	intravenös
kg	Kilogramm
KM	Knochenmark
L	Liter
LEW	Lewis
LK	Lymphknoten
m	Milli
m	Meter
M	Molar (mol/L)
MHC	Major Histocompatibility Complex
µ	mikro
min	Minute(n)
Mio	Millionen
Mrd	Milliarden
n	Anzahl

n	nano
NK-Zellen	Natürliche Killer Zellen
NKT-Zellen	Natürliche Killer-T-Lymphozyten
NRS	Normal Rattenserum
NTx	Nierentransplantation
Nx	Nierenexplantation
OP	Operation
PAS	Periodic Acid-Schiff
PBS	Phosphate buffered saline
PE	Phycoerythrin
pH	negativer dekadischer Logarithmus der Wasserstoffionenkonzentration
RT	Raumtemperatur
sec	Sekunden
SSC	Side scatter
T-reg	Regulatorische T-Lymphozyten
T-Zellen	T-Lymphozyten
Tab.	Tabelle
TBS	Tris-buffered saline
TCR	T-Zell Rezeptor
Tx	Transplantation
W	Woche
z.B.	Zum Beispiel

1. Einleitung

1.1. Nierentransplantation in Deutschland

Die Nierentransplantation ist bei der terminalen Niereninsuffizienz der Goldstandard und heute ein etabliertes und erfolgreiches Verfahren. Sie ist der Dialyse überlegen: sie erzeugt im Langzeitverlauf niedrigere Kosten und zeigt gegenüber der Dialyse eine geringere Mortalität (Schieppati und Remuzzi, 2005; Jensen, Sorensen und Petersen, 2014; Schold *et al.*, 2014).
Hinzukommend bietet sie eine höhere Lebensqualität, da die Patienten nicht an die Dialysezeiten und Orte gebunden sind, womit die soziale Integration während der Erkrankung deutlich gefördert wird.
Die häufigsten primären Ursachen für eine terminale Niereninsuffizienz der Wartelistenpatienten auf eine Nierentransplantation sind Diabetes, die hypertensive Nierenkrankheit, Glomerulonephritis und die zystische Nierenkrankheit (Protzel, Fuhrer und Hakenberg, 2015).
Klinische Merkmale einer Verschlechterung der Nierenfunktion sind steigende Nierenretentionsparameter im Serum, wie das Kreatinin, Cystatin C und Harnstoff (Gourishankar et al., 2008).

Im Jahre 2016 wurden in Deutschland nach Angaben der deutschen Stiftung Organtransplantation (DSO) insgesamt 2094 Nieren transplantiert, die Niere ist somit das häufigste Organ, welches transplantiert wird. Davon waren 1497 (71,5 %) transplantierte Nieren nach postmortaler Spende und 597 (28,5 %) nach Lebendspende, 3075 Nierentransplantationen wurden in diesem Jahr angemeldet (Deutsche Stiftung Organtransplantation, 2016). 7781 Patienten standen Ende 2015 auf der Warteliste für eine Nierentransplantation (Eurotransplant, 2016). Diese Zahlen verdeutlichen eine erhebliche Disparität zwischen Angebot und Nachfrage von Spenderorganen.

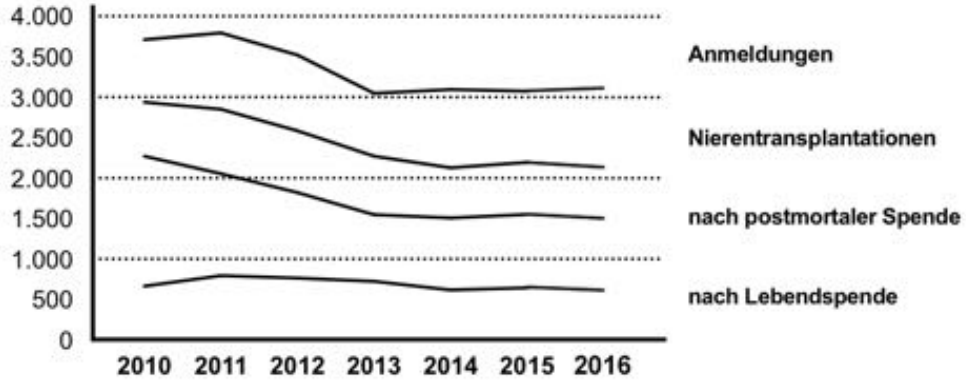


Abbildung 1: Anmeldungen und Nierentransplantationen in Deutschland
Quelle: (Deutsche Stiftung Organtransplantation, 2016)

Diese Gegebenheiten machen es umso wichtiger, dass die Nierentransplantate möglichst lange und gut funktionieren.
Zwischen 1986-1990 lag das 1-Jahres-Überleben von Nierentransplantaten bei 83,7 % und das 5-Jahres-Überleben bei 68,2 %. Im Vergleich dazu lag das 1-Jahres-Überleben 2006-2008 bei 92,6 % und das 5-Jahres-Überleben bei 80 %, welches eine deutliche Verbesserung des Transplantatüberlebens zeigt (L'Agence de la biomédecine, 2014).

Eine Nierentransplantation setzt eine lebenslange immunsuppressive Therapie voraus, welche wiederum Akut- und Langzeitnebenwirkungen haben kann. Die Relevantesten sind eine erhöhte Infektanfälligkeit und eine erhöhte Rate an Tumorerkrankungen im Verlauf (Salvadori und Bertoni, 2003). Durch die Immunsuppression ist jedoch kein lebenslanger Transplantaterhalt garantiert.
Aus diesem Grund und da Immunsuppressiva ein enges therapeutisches Fenster besitzen, ist eine hohes Maß an Compliance seitens der Patienten gefordert.
Häufig nach wird nach Nierentransplantation die Triple-Drug Therapie eingesetzt, welche sich aus Prednisolon, Calcineurininhibitoren (Ciclosporin/Tacrolimus) und Mycophenolatmofetil zusammensetzt.
Es gibt bereits viele Immunsuppressiva, die sich gegen die T-Zelle richten, wie das Ciclosporin A, Tacrolimus und Sirolimus. (Beimler und Zeier, 2007).

Aktuelle Immunsuppressiva fokussieren sich auf die Wirkung auf T-Zellen. Durch diese Immunsuppressiva werden B-Zellen jedoch wenig beeinflusst.
Die B-Zelle repräsentiert das humorale Immunsystem und spielt eine große Rolle in der Transplantatabstoßung. Rituximab hat im humoralem System in der „off-label“ Nutzung eine große Bedeutung.

Der Gegenstand der aktuellen Forschung ist es neue und effektivere Immunsuppressiva zu erschaffen. Durch Immunsuppressiva, die effektiver sind als bisher und gleichzeitig weniger Nebenwirkungen hervorrufen, soll eine Verbesserung des langfristigen Transplant (Tx) –Überlebens erreicht werden.

1.2. Nierentransplantatabstoßung

Eine Transplantatabstoßung wird durch die Immunantwort des Empfängers auf Alloantigene auf dem Spenderorgan hervorgerufen.
Die T-Zellen reagieren auf den hoch polymorphen Major Histocompatibility Complex (Haupthistokompatibilitätskomplex (de.), MHC) -Moleküle (im Menschen korrespondierend HLA genannt) und triggern eine Antwort gegen das gespendete als fremd erkannte Organ (Cornell, Smith und Colvin, 2008).
Es wird zwischen drei unterschiedlichen Hauptformen von Abstoßung differenziert: Die hyperakute, akute und chronische Abstoßung.

Bei der hyperakuten Abstoßung lösen präformierte Alloantikörper des Empfängers gegen Blutgruppenantigene oder polymorphe MHC-Antigene eine schnelle (hyperakute) Abstoßung des transplantierten Organs mittels Komplement-abhängigen Reaktionen aus, welche innerhalb von Minuten nach Transplantation stattfinden (Colvin und Smith, 2005).

Die allogene Transplantation, führt dazu, dass das Transplantat zunächst überlebt, jedoch nach 10-13 Tagen nach Transplantation abgestoßen wird. Diese Abstoßung wird akute Abstoßung genannt. (Murphy, 2012)
Diverse Komponenten des Immunsystems führen zu vaskulären, glomerulären und tubulären Schäden und sind an der hochkomplexen Pathophysiologie der akuten renalen Transplantatabstoßung beteiligt (Koch et al., 2013).
Es gibt ein angeborenes Immunsystem, welches unspezifisch ist und durch Granulozyten, Makrophagen und Natürliche Killer (NK) -Zellen repräsentiert wird. Das erworbene Immunsystem ist wiederum zellulär und einer der Hauptbarrieren von Organtransplantationen. Es zerstört Spenderorgane durch eine adaptive Immunantwort auf fremde Proteine. Diese Antwort kann durch CD8-positive T-Zellen oder CD4-positive T-Zellen getriggert werden (Murphy, 2012).

Bevor naive alloreaktive T-Zellen sich in Effektor-T-Zellen entwickeln können, welche eine akute Abstoßung herbeiführen, müssen sie durch Antigen-präsentierende Zellen, welche MHC- und kostimulatorische Moleküle des Spenderorgans tragen, aktiviert werden. Diese verlassen das Transplantat und

migrieren zu sekundär lymphatischen Organen des Empfängers, wie der Milz und den Lymphknoten, wo sie Empfänger T-Zellen mit korrespondierenden T-Zell-Rezeptoren aktivieren können. Da die lymphatische Drainage des Spenderorgans durch die Transplantation gestört ist, erfolgt die Migration der Spender Antigen-repräsentierenden Zellen durch das Blutsystem. Die aktivierten alloreaktiven Effektor-T-Zellen können dann das Spenderorgan erreichen und es direkt angreifen (Murphy, 2012).

Eine wichtige Komponente des späten Transplantatversagens ist die chronische Vaskulopathie. Diese zeigt sich durch konzentrische Arteriosklerose in den Transplantatgefäßen, welche zu Hypoperfusion des Transplantats sowie Fibrose und Atrophie führen. Verschiedenste Mechanismen, einschließlich rezidivierender akuter Abstoßungen, zirkulierenden allospezifischen Antikörpern gegen das Endothel des Spenderorgans können ebenfalls zum späten Transplantatversagen führen. Außerdem führen einige Formen der immunsuppressiven Therapie (z.B. Calcineurininhibitoren, wie das Cyclosporin) zu Transplantatschäden.
Diese Reaktionen können innerhalb von Monaten bis Jahren nach Transplantation auftreten und sind mit fortschreitender Transplantdysfunktion assoziiert. Zusätzlich können auch Virusinfektionen durch eine Immunsuppression entstehen oder die das ursprüngliche Organ zerstörende Erkrankung im Transplantat wieder auftreten (Womer, Vella und Sayegh, 2000).

Antikörper spielen nicht nur bei hyperakuter Abstoßung, sondern vor allem bei humoraler Abstoßung eine Rolle. Sie werden von Plasmazellen produziert, die sich aus B-Zellen entwickeln können. Es wird zwischen verschiedenen Reifegraden der B-Zellen unterschieden (siehe Abbildung 2.). B-Zellen können durch eine Komplementkaskade eine Komplement-assoziierte Zytotoxizität auslösen. Des Weiteren können sie durch Makrophagen erkannt werden und dadurch Phagozytose und Antikörper abhängige zellvermittelte Zytotoxizität (ADCC) initiieren. Sie können außerdem auch durch eine NK-Zell-Interaktion ADCC auslösen. B-Zellen sollen des Weiteren einen Effekt auf die Ausbildung von tertiär lymphatischen Organen haben und einen modulierenden Effekt auf chronische Abstoßung haben (Barnett, 2013).

Die B-Zellen der Ratten tragen wie beim Menschen neben CD20, CD45RA auch IgG1.

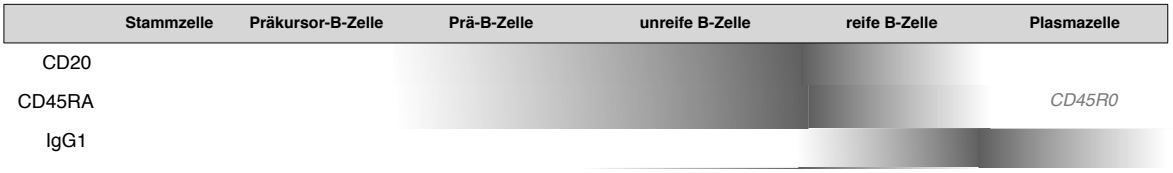


Abbildung 2: Ausprägung der Antikörper im Verlauf der B-Zellentwicklung
Quelle: Dianova (Dianova GmbH, no date) / Murphy (Murphy, 2012)/ Tedder & Engel (Tedder und Engel, 1994).

1.3. Das MHC-inkompatible Rattenmodell

Beim Menschen gibt es zu vielen Einflussgrößen, um eine Nierentransplantatabstoßung standardisiert untersuchen zu können. Ein Rattenmodell bietet standardisierte Bedingungen, wie auch ein sehr ähnlich funktionierendes Immunsystem. Eine weitere Voraussetzungen ist die MHC-Inkompatibilität bei jedoch genetisch gleichem Hintergrund (Poehnert et al., 2010).

Ein großer Gewinn in der Analyse der Histokompatibilität war die Etablierung der Inzucht Ratten Stämme, welches generell nach 20 Generationen Inzucht durch Kreuzen von Brüdern und Schwestern erreicht wird. Individuen eines Inzuchtstammes haben dann die Wahrscheinlichkeit von nahezu 99% homozygot an einem bestimmtem Locus zu sein (Günther, 1998).

Bereits 1967 erfolgte der Versuch ein Rattenmodell zur Untersuchung von Nierentransplantatabstoßung zu generieren, welches einige inkompatible MHC-Loci besitzt (Lindquist, Guttmann und Merrill, 1967). Das voll MHC-inkompatible Rattenmodell der akuten Abstoßung bei allogener Nierentransplantation wurde jedoch erst vor einigen Jahren durch die Arbeitsgruppe Koch erfolgreich etabliert (Koch et al., 2013). Dies gibt die Möglichkeit eine akute Abstoßung bei allogener Transplantation klinisch wie auch immunologisch zu überwachen.

Durch diverse Trigger, wie z.B. einer Transplantation werden MHC-Moleküle hochreguliert (Metzger, Mempel und Joppich, 2000).
In der MHC-Klasse I Familie wird zwischen Klasse Ia and Ib Haplotypen unterschieden. Der MHC Ia Haplotyp ist hoch polymorph und seine Genprodukte sind verantwortlich für die allgemeine Antigenpräsentation. Der MHC Ib Haplotyp ist mono- oder oligomorph und zeigt eine eingeschränkte Expression und hat möglicherweise speziellere Funktionen (Gunther und Walter, 2000).

Der MHC der Ratte ist der RT1-Komplex, welcher homolog zum HLA (Human Leucocyte Antigen)-Locus des Menschen ist. Der RT1-Komplex befindet sich auf Chromosom 20, während der HLA sich auf Chromoson 6 befindet (Pöhnert,

2008). RT1-CM ist die telomere Klasse I Region und RT1A die zentromere Klasse I Region (Gunther und Walter, 2000). MHC I wird auf den meisten immunkompetenten Zellen exprimiert. MHC II-Klasse Moleküle wurden auf allen Zellen ausgebildet, die den B-Zell-Marker tragen, welches ungefähr über 15% der Zellen ausmacht. Außerdem ist MHC II auch in der äußeren Zone des proximalen Nierentubulus zu finden.

Die Lymphozyten der Ratte werden wie im Menschen im Knochenmark gebildet. Danach wandern die T-Lymphozyten in den Thymus, während die B-Lymphozyten sich im Knochenmark zu reifen, naiven B-Zellen entwickeln. In der Ratte gibt es einen höheren Anteil an hämatopoetischen Stammzellen und Vorläufer B-Zellen im Knochenmark als beim Menschen (Deenen, Hunt und Opstelten, 1987).

1.4 Bedeutung von Rituximab in der Immunologie

Rituximab ist ein monoklonaler, B-Zell depletierender Antikörper, der sich primär gegen CD20-exprimierende Zellen richtet. Dieses CD-Antigen stellt ein transmembranöses, nicht glykolysiertes Phosphoprotein dar, welches auf unreifen, wie auch reifen B-Zellen exprimiert wird. Es reguliert die transmembrane Calciumfreisetzung und die Proliferation und Differenzierung von B-Zellen. Das Rituximab Fab bindet an die Fc-Domäne und löst dadurch immune Effektorfunktionen aus.
Rituximab führt innerhalb von 1-3 Tagen zur Reduktion der B-Zellen im Menschen und kompletter Depletion innerhalb von 1-6 Wochen. Es wird vermutet, dass durch die Depletion der B-Zellen ein vermehrter CD-8-positiver T-Zell „Recall“, eine vermehrte CD4-T-Zell-Aktivierung und eine Inaktivierung von T-Zellen initiiert wird (Barnett, Dorling und Mamode, 2011).
Rituximab soll keinen direkten Effekt auf Plasmazellen haben (Barnett, 2013).

Rituximab wurde erstmals 1997 durch die FDA genehmigt (Sood und Hariharan, 2017) und wird seitdem erfolgreich in der Therapie von NHL, insbesondere des follikulären Lymphoms und B-Zell Non-Hodgkin-Lymphoms (Feugier, 2015). Des Weiteren wird es in der Therapie der rezidivierenden oder refraktären chronisch lymphatischen Leukämie und rheumatoiden Arthritis (Smolen et al., 2007) eingesetzt. Ein weiteres Einsatzgebiet stellt die Granulomatose mit Polyangiitis und mikoskopische Polyangiitis dar (Roche Pharma GmbH, 2018).

Da momentan die Anwendung von Rituximab in der Nierentransplantation nicht genehmigt ist, erfolgt sie als sogenannte „off-label“-Nutzung. Die Nutzung ist nicht lizenziert, ungeachtet dessen ist sie Bestandteil in einigen Induktionsprotokollen in HLA-Antikörper inkompatiblen Transplantationen (Takagi et al., 2010), insbesondere in Desensibilisierungsprotokollen für hoch sensibilisierte Empfänger (Vo et al., 2008) und der Behandlung akuter Abstoßung (Kaposztas et al., 2009).
Rituximab wird ebenfalls bei der posttransplantärer lymphoproliferativer Erkrankung eingesetzt (Elstrom et al., 2006; Sood und Hariharan, 2017).

Rituximab wird nachgesagt öfter zu infektiösen Komplikationen zu führen, jedoch gibt es dafür noch wenig Evidenz (Barnett, 2013).
Nebenwirkungen können u.a. ein Cytokin Release Syndrome, Thrombozytopenie wie auch Neutropenie sein. Es wird außerdem mit erhöhtem Vorkommen von progressiver multifokaler Leukenzephalopathie und plötzlichem Herztod assoziiert (Jordan und Kahwaji, 2011).

1.5. Fragestellungen

Zielsetzung der vorliegenden Arbeit ist es Auswirkungen der B-Zell Depletion im Rahmen einer Nierentransplantation im Tiermodel zu untersuchen.

Wie wirkt sich die B-Zell-Depletion auf die Lymphozytensubpopulationen im Blut und in den lymphatischen Organen aus?
Inwiefern werden die transplantatinfiltrienden Zellen dadurch beeinflusst?

Wie wird das Outcome nach Nierentransplantation und das Transplantatüberleben durch die B-Zell Depletion beeinflusst?

2. Material und Methoden

2.1. Versuchstiere

2.1.1. Genehmigung der Tierversuche

Die Tierversuche und die damit zusammenhängenden experimentellen Schritte wurden vor dem Projektbeginn gemäß dem Tierschutzgesetz unter dem Aktenzeichen G11/046 von der Behörde für Soziales, Familie, Gesundheit- und Verbraucherschutz Lebensmittelsicherheit und Veterinärwesen Hamburg genehmigt und nach den Richtlinien der EU durchgeführt.
Die Promovendin hat zuvor im April 2013 erfolgreich den Kursus „Tierexperimentelles Arbeiten mit der Maus“ der Versuchstierhaltung des UKE absolviert. Eine Ausnahmegenehmigung für die erforderlichen Eingriffe an den Tieren, die durch Frau Prof. Dr. Koch und Frau Christiansen durchgeführt wurden lag unter dem Aktenzeichen G11/046 zu Beginn der Versuche vor.

2.1.2. Nierentransplantiertes Rattenmodell

Als Tiermodell diente ein bereits durch Poehnert et al. (2010) und Koch et al. (2013) etabliertes Rattenmodell.
Männliche Lewis (LEW) Ratten (RT1.A^l B/D^l C^l) von den Unternehmen „Charles River“ und „Janvier“ erhielten ein Nierentransplantat von alters- und gewichtsentsprechenden LEW.1W (RT1.A^u B/D^u C^u) Ratten aus dem zentralen Tierlaboratorium der medizinischen Hochschule Hannover. Die Versuchstiere waren zum Zeitpunkt der Nierentransplantation (NTx) durchschnittlich 250 g schwer und zwei Monate alt. Sie teilen einen gemeinsamen genetischen Hintergrund, unterschieden sich jedoch komplett in ihren MHC-Haplotypen. Diese MHC I und II Inkompatibilität führte zur akuten Abstoßung (Poehnert et al., 2010).
Die NTx erfolgte, wie zuvor beschrieben durch Koch et al. (2005). Als Inhalationsnarkose diente 3%-iges Isofluran mit einer Sauerstoffflussrate von 0,8 l/min. Das Versuchstier erhielt zur Analgesie intraoperativ Novaminsulfon (100 mg/ kg KG s.c.). Die Ischämiezeit begrenzte sich auf 30 min. Während der

NTx erfolgte links die Nephrektomie (Nx) der Eigenniere und ein Antikörper bzw. NaCl wurden i.v. injiziert. Nach 5 (±1) Tagen erfolgte die kontralaterale Nx der zweiten Eigenniere. Perioperativ erhielten die Versuchstiere zusätzlich Novaminsulfon (125 mg/ 200 ml) zum Trinkwasser beigesetzt. Als Kontrollgruppe dienten Versuchstiere, die isogen transplantiert wurden (LEW → LEW).

Tabelle 1: **MHC-Haplotypen kongener LEW-Stämme**

Stamm	**MHC I RT1.A**	**MHC II RT1.B/D**	**MHC I RT1.C**	**Genetischer Hintergrund**
LEW	l	l	l	LEW
LEW.1W	u	u	u	LEW

2.1.3. Versuchsgruppen

Die Versuchstierhaltung des UKE (Leitung: Dr. rer. nat. Andreas Haemisch) sorgte für die artgerechte Haltung der Versuchstiere, konstante zirkadiane Rhythmik, sowie freien Zugang zu Trinken, Nahrung und eine standardisierte Umgebung.

Es wurden insgesamt vier Versuchsgruppen generiert:

Versuchsgruppe 1 (n = 3) αCD20 i.v.

Die Versuchstiere der Gruppe "αCD20 i.v." erhielten an Tag 0 einen B-Zell-depletierenden Antikörper „αCD20“ i.v. (1 mg/kg KG). Diese Gruppe diente zur Analyse des Ausmaßes der B-Zell-Depletion im Verlauf. Nach elf Wochen war die ursprüngliche B-Zell-Population im Blut wieder regeneriert, weswegen der Versuch zu dem Zeitpunkt beendet wurde.

Versuchsgruppe 2 (n = 11) Iso

Bei den Versuchstieren der Gruppe "Iso" erfolgte die linksseitige Nx sowie die linksseitige isogene NTx (LEW → LEW). Nach 5 (±1) Tagen wurde die kontralaterale Eigenniere entfernt. Die Gruppe wurde zur Kontrolle zu den

folgenden zwei allogentransplantierten Gruppen generiert. Ihr Versuchende war mit 24 Wochen definiert.

Versuchsgruppe 3 (n = 18) Allo Akut

Bei der Versuchsgruppe "Allo akut" erfolgte die linksseitige Nx sowie die linksseitige allogene NTx (LEW → LEW). Nach 5 (±1) Tagen wurde die kontralaterale Eigenniere entfernt. Intraoperativ wurde den Versuchstieren NaCl i.v. verabreicht. Die allogene NTx führte zu einer akuten Abstoßung. Das Versuchsende wurde mit Erreichen des Versuchsziels von 30 Tagen oder dem Erfüllen der Abbruchkriterien durch vorzeitige Verschlechterung des klinischen Zustands definiert und führte zur Tötung des Versuchstieres.

Versuchsgruppe 4 (n = 15) Allo αCD20 i.v

Das Vorgehen in der Gruppe "Allo αCD20 i.v" entsprach der Versuchsgruppe 3, jedoch erhielten die Versuchstiere statt des intravenösen NaCl, intraoperativ einen intravenösen B-Zell-depletierenden Antikörper „αCD20“ (Tag 0). An Tag 14 post OP erfolgte eine 2. i.v. Injektion (1 mg/kg KG).

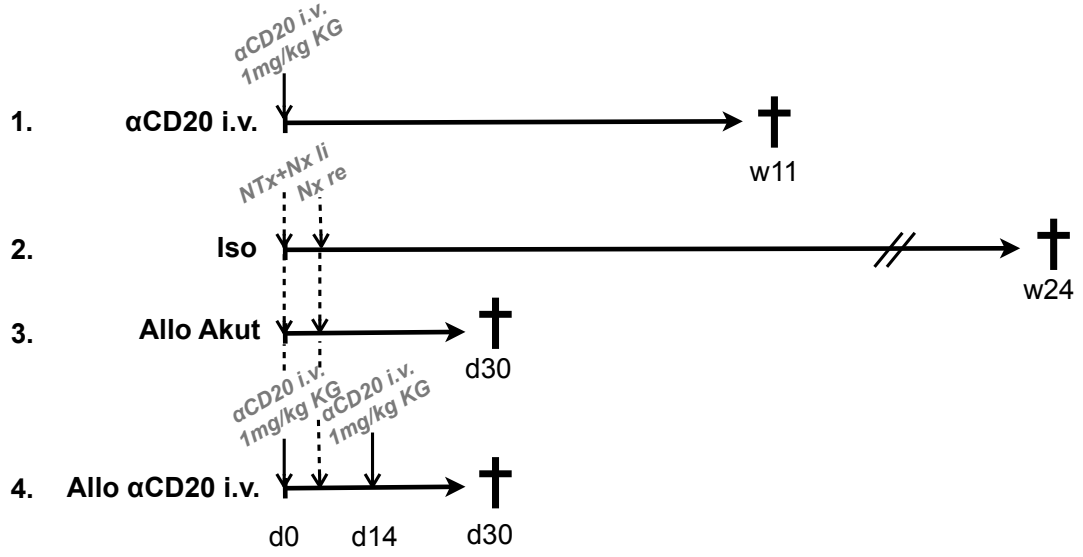


Abbildung 3: Übersicht über die Versuchsgruppen

Den Versuchsgruppen 1 und 4 wurde ein mouse anti-rat CD20-Antikörper (αCD20), der von der Firma Genentech in der Ausgangskonzentration 29 mg/ml zur Verfügung gestellt und wurde in einer Dosis von 1 mg/kg KG in einer Konzentration von 1/10 i.v. verabreicht. Der Antikörper führte zur Depletion der B-Zellen.

Mouse anti-rat CD20-Antikörper:

29 mg/ml
Verdünnung 1:10
CD20, ID: OR-211486
anti-mouse CD20mLgG2a 5D2
Lagerung bei -80°C
Injektion bei RT

Material:

NaCl 0,9 % Kochsalzlösung	B.Braun, Deutschland
Heparin Natrium Injektionslösung 25.000 I.E.	B.Braun, Deutschland
Novaminsulfontropfen (500 mg/ml)	Ratiopharm, Deutschland
Novaminsulfon Injektionslösung 1 g/ 2 ml	Ratiopharm, Deutschland
Anti-rat CD20 Antikörper	Genentech, USA
Sterican 27 G	B.Braun, Deutschland
Isofluran Forene	Abbott, USA
Tabotamp resorbierbares Hämotyptikum	Johnson & Johnson USA
Ethicon Ethilon 10-0	Johnson & Johnson USA
Ethicon Ethilon 8-0	Johnson & Johnson USA
Ethicon Vicryl 3-0	Johnson & Johnson USA
Naturseide-schwarz 6-0, nicht resorbierbar	Catgut GmbH, Germany
Vasofix safety 20 G	B.Braun, Deutschland

2.2. Beurteilung der Nierenfunktion

2.2.1. Klinischer Zustand und Abbruchkriterien

Vor der NTx wurde das Gewicht, Serumkreatinin und Urin-Albumin (im weiteren beschrieben) der Versuchstiere bestimmt. Nach der Transplantation erfolgte anfangs täglich und nach Stabilisierung jeden zweiten Tag, bei der Kontrollgruppe wöchentlich, die Kontrolle des Gewichts sowie der im folgenden Abschnitten genannten Parameter. Der Allgemeinzustand wurde täglich durch die Analyse der Körperhaltung, der Bewegung, der Fellbeschaffenheit, des Gewichts und des Trink-/Urin-/Stuhlgangverhaltens beschrieben.
Entsprechend den nach dem Tierversuchsantrag festgelegten Belastungsscores erfolgte die Bestimmung von Körpergewicht, Allgemeinzustand, Spontanverhalten und versuchsspezifischen Kriterien, welche z.B. Ausscheidung, Platzbauch, Hämatom am Auge und Serumkreatinin erfassten. Ab einem Gewichtsverlust von über 20 %, einem Serumkreatininwert über 5 mg/dl oder schwerwiegenden anderen Beeinträchtigungen, die eine hochgradige Belastung für das Tier darstellten, wurde der Versuch abgebrochen und das Tier eingeschläfert.

2.2.2. Untersuchung des Serumkreatinins

Jeden zweiten Tag wurde den Versuchstieren, zur Untersuchung des Serumkreatinins, 35 µl Blut durch Punktion der Schwanzvenen entnommen und mittels Blutanalysegerät (Reflovet Plus, Roche USA) gemessen. Bei den Kontrollgruppen erfolgte die Messung wöchentlich. Die untere Messgrenze lag bei 0,5 mg/dl.

<u>Material:</u>

Reflovet Plus	Roche Diagnostics, Schweiz
Sterican 21G	B.Braun, Deutschland
Reflotron Creatinin Teststreifen	Roche Diagnostics, Schweiz
Mircovette® CB 300	Sarstedt, Deutschland

2.2.3. Messung des Albumins im Urin durch ELISA

Jede zweite Woche wurde der 24 Stunden-Urin der Versuchstiere mittels Stoffwechselkäfigen aufgefangen. Dieser wurde abgemessen, durch Zentrifugation gereinigt und anschließend bei -20 °C bis zur Messung aufbewahrt.
Die Messung der aufgetauten Proben erfolgte mittels der vom Hersteller empfohlener Standardprozedur (Messbereich 1,5-100 mg/dl) als Doppelbestimmung. Mit der 1:10 verdünnten Probe wurde ein antikörperbeschichtetes Well des Nephrat® II ELISA Kits beimpft und anschließend mit dem Antikörper des Kits inkubiert. Nach Waschen und Farbentwicklung erfolgte die Probenmessung mittels ELISA Tecan infinite M200 bei 450 nm. Die Farbintensität stellte sich umgekehrt proportional zum Logarithmus der Albuminkonzentration dar.
Als Vergleich diente eine Verdünnungsreihe mit Standard Rattenalbumin. Ausreißer über 100 mg/dl wurden in einer Verdünnung von 1:50 erneut in einem ELISA bestimmt.

Material:

Centrifuge 5810 R	Eppendorf, Deutschland
Nephrat® II ELISA Kit	Exocell, Inc., USA
ELISA Tecan infinite M200	Tecan, Schweiz

2.3. Tötung der Versuchtstiere und Organentnahme

Durch eine CO_2-Narkose wurde beim Versuchstier ein Atemstillstand herbeigeführt. Die daraufhin durchgeführte Herzpunktion und Aspiration des Blutes führte zum Tod des Versuchstieres. Nach Fixierung auf einer Korkmatte, wurde es mit 70 %-igen Ethanol desinfiziert. Die Kutis und die Subkutis wurden nacheinander bis zum Rippenbogen eröffnet.

Nach gründlicher Analyse erfolgte die Präparation der NTx-Niere, welche von Ihrer Kapsel befreit und mit einem sterilen Skalpell transversal seziert wurde. Die eine Hälfte der Niere wurde für pathologische Untersuchungen auf Formalin (4 %) gelegt, die andere Hälfte wurde für immunhistochemische Zwecke in Nunc-Röhrchen mit Stickstoff kryokonserviert.
Daraufhin erfolgte die Entnahme und Portionierung der Milz. 2/5 der Milz wurden für immunhistochemische Untersuchungen in Nunc-Röhrchen mit Stickstoff kryokonserviert, 3/5 der Milz wurden weiter zerkleinert und mit Medium 199 kräftig durch ein 70 µm Cellstrainer gedrückt. Bis zur Weiterverarbeitung erfolgte die Lagerung der Zellen auf Eis.
An Hals, Achseln, Darm und Hauptgefäßen erfolgte die Suche und Extraktion von Lymphknoten aus dem Subkutangewebe. In einer sterilen Petrischale wurden die Kapseln der ca. 20 Lymphknoten sofort nach Entnahme mit zwei sterilen Pinzetten aufgeschlossen, wodurch sich die Lymphozyten der Lymphknoten im Medium 199 lösten. Die so gewonnene Lymphozytensuspension wurde durch kräftiges Reiben der glatten Seite des Stempels einer 2 ml Spritze durch ein 70 µm Cellstrainer gedrückt und anschließend bis zur Weiterverarbeitung auf Eis gelagert.
Um Lymphozyten aus dem Knochenmark zu gewinnen wurden die amputierten Oberschenkel von Muskeln, Gelenken und Bandapparat befreit. Es erfolgte die Spülung des Femursschaftes mittels PBS + 0,1 % FBS und Filtration der Zellsuspension durch ein 40 µm Cellstrainer. Schließlich wurden die gewonnen Lymphozyten mittels Falkonröhrchen aufgefangen und auf Eis gelagert.

Material:

70 % Ethanol	Greyer, Deutschland
Medium 199 (1x) Gibco	Thermo Scientific, USA
Kryo-Röhrchen	Thermo Scientific, USA
Cellstrainer 40 µm, 70 µm	BD Falcon, USA
PBS	PAA, Österreich
Einwegspritze 2 ml, 5 ml, 10 ml	Braun, Deutschland
Petrischalen	Nunc, Dänemark
Formalin 4%	Zur Verfügung gestellt von Prof. Wiech, Nephropathologie, UKE

2.4. FACS-Analyse der Lymphozytensubpopulationen im peripheren Blut und in den lymphatischen Organen

2.4.1. Retrobulbäre Blutentnahme

Unter kurzer Isoflurannarkose (3-5 %, Sauerstoffflussrate von 0,8 l/min), wurde nach Anstauen der Halsvenen mittels Nackengriff mit einer Glaskapillare in den inneren Augenwinkel gestochen und Blut aus dem retrobulbären Venenplexus entnommen. Das Blut wurde mit einem EDTA-Röhrchen aufgefangen. Danach erfolgte die Entstauung der Venen und zur Prophylaxe von Hämatomen die Kompression der Punktionsstelle.

Material:

Isofluran	Abbott, USA
Glaskapillare	Brand, Deutschland
EDTA-Probengefäß	Sarstedt, Deutschland

2.4.2. Lymphozytenisolierung aus dem peripheren Blut

200-500 µl des mit 1:10 in Erylysepuffer verdünnten EDTA-Vollblutes inkubierten 5 min bei 4 °C. Nach zehnminütigem Zentrifugieren bei 1500 rpm/ 4 °C wurde der Überstand verworfen, das Pellet gelöst und mit 7 ml Medium 199 aufgefüllt. Danach folgten zwei Waschschritte der Zellen mit Medium 199. Die Lagerung der Zellen bis zur Anfärbung für die FACS-Analyse erfolgte bei 4 °C.

Erylysepuffer

NH_4Cl	155 mM
$KHCO_3$	10 mM
EDTA	1 mM
Aqua dest.	ad 1000 ml

2.4.3. Lebenzellzahlbestimmung mittels Trypanblau

Um die Lebendzellzahl zu bestimmen wurden 10 µl des in 2 ml gelösten Zellpellets in Trypanblau 1:10 verdünnt und 10 µl davon in eine Neubauer-Zählkammer pipettiert. Bei der Auszählung von vier Eckquadraten konnten die toten Zellen aufgrund der blauen Färbung ausgeschlossen werden. Um die Zellzahl pro ml Zellsuspension zu errechnen wurde die durchschnittliche Zellzahl der vier Eckquadrate mit dem Verdünnungsfaktor (1:10) und dem Kammerfaktor (10^4) multipliziert.

2.4.4. Lymphozytenisolierung aus den Lymphknoten

Die Lymphozyten aus den Lymphknoten wurden, wie zuvor in Kapitel 2.3. beschrieben, gewonnen. Die folgenden Schritte erfolgten bei einer Temperatur von 4 °C unter einer Cleanbench. Nach 10-minütiger Zentrifugation bei 1500 rpm wurde der Überstand verworfen und das Zellpellet zweimalig mit 25 ml Medium 199 gewaschen. Mittels der Lebenszellzahlbestimmung (Kapitel 2.4.3.) wurden durchschnittlich 2 x 10^8 Zellen detektiert. Danach erfolgte die Anfärbung der Zellen für die durchflusszytometrische Analyse (Kap. 2.4.10.).

2.4.5. Lymphozytenisolierung aus der Milz

Die Lymphozyten aus der Milz wurden wie zuvor in Kapitel 2.3. beschrieben gewonnen. Die folgenden Schritte erfolgten bei einer Temperatur von 4 °C unter einer Cleanbench. Nach 10-minütigen Zentrifugation bei 1500 rpm, wurde der Überstand verworfen und das Zellpellet in 25 ml Erylyse-Puffer gelöst. Es folgte eine 5-minütige Inkubation im Dunkeln. Daran schlossen sich zwei Waschschritte mit Medium 199 an. Mittels der Lebenszellzahlbestimmung (Kapitel 2.4.3.) wurden durchschnittlich 5 x 10^8 Zellen detektiert. Danach erfolgte die Anfärbung der Zellen für die durchflusszytometrische Analyse (Kap. 2.4.10).

2.4.6. Lymphozytenisolierung aus dem Knochenmark

Die Lymphozyten aus dem Knochenmark wurden wie zuvor in Kapitel 2.3. beschrieben gewonnen. Die folgenden Schritte erfolgten bei einer Temperatur von 4 °C unter einer Cleanbench. Nach einer 10-minütigen Zentrifugation bei 1500 rpm wurde der Überstand verworfen, das Zellpellet in 5 ml Erylyse-Puffer gelöst und 10 min im Dunkeln inkubiert. Nach Zugabe von 25 ml PBS + 0,1 % FBS erfolgte erneutes 10-minütiges Zentrifugieren. Der Überstand wurde verworfen. Danach schlossen sich zwei Waschschritte mit 20 ml PBS + 0,1 % FBS und die Lebenszellzahlbestimmung an (Kapitel 2.4.2). Es wurden durchschnittlich 5 x 10^7 Zellen isoliert. Danach erfolgte die Färbung der Zellen für die durchflusszytometrische Analyse (Kap. 2.4.10.).

Material:

Trypanblau	Invitrogen Life Technologies, USA
Neubauer-Zählkammer	Marienfeld, Deutschland
Lichtmikroskop Wilovert S	Hund, Deutschland
Centrifuge 5810 R	Eppendorf, Deutschland
Cleanbench HeraSafe	Heraeus, Deutschland
Falkon-PP-Röhrchen 15 ml/ 50 ml	Greiner Bio-One, Österreich
PBS	PAA, Österreich

2.4.7. Leukozytenzählung mittels Türks-Lösung

Unter dem Abzug wurde das Vollblut 1:20 mit der Türks-Lösung verdünnt. Eine Neubauer-Zählkammer wurde mit 10 µl beschickt und wie in Kapitel 2.4.3. bereits beschrieben ausgezählt und berechnet, hier jedoch mit einem Verdünnungsfaktor von 1:20.

Material:

Türks-Lösung	Merck, Deutschland
Neubauer-Zählkammer	Marienfeld, Deutschland
Lichtmikroskop Wilovert S	Hund, Deutschland

2.4.8. Pappenheimfärbung der Blutausstriche

Die Anfertigung eines Blutausstriches erfolgte durch das Aufbringen von 5 µl Vollblut auf einen Objektträger und dem schnell und geraden Ausstreichen mit einem Deckgläschen in einem flachen Winkel zum Objektträger. Der getrocknete Blutausstrich wurde für 3 min mit May-Grünwald-Lösung gefärbt. Danach erfolgte das Waschen mit Aqua dest. und Färbung mit Giemsa-Lösung (5 % Gebrauchslösung mit Aqua dest.) für 25 min. Nach erneutem Waschen wurden die Blutausstriche luftgetrocknet und mit Entellan und eingedeckt. Am Lichtmikroskop erfolgte die Auszählung von 100 Zellen, hierbei wurde zwischen Granulozyten, Lymphozyten und Monozyten differenziert. Daraus ließ sich der Anteil der Lymphozyten an Blutzellen bestimmen.

Material:

Objekträger	Hecht Assistent, Deutschland
Deckgläschen für Haemacytometer	Thermo Scientific, USA
May-Grünwald-Lösung	Merck, Deutschland
Giemsa Stammlösung	Carl Roth, Deutschland
Entellan	Merck, Deutschland
Deckgläschen	Roth, Deutschland
Olympus Mikroskop CX41	Olympus, Deutschland

2.4.9. Färbung der Lymphozyten

Oberflächenfärbung der Marker: CD45, CD3, CD4, CD8, CD25, CD161, IgG, CD45RA

Nach Pelletierung der Zellen durch Zentrifugation und Lösung des Zellpellets mit FACS-Waschpuffer wurden eine 96-Well-Kulturzellplatte mit Zellsuspension beschickt ($1x10^5$ - $1x10^6$ Zellen/ Well). Nach einem 90 sekündigem Zentrifugationsschritt, erfolgte die Inkubation des Antikörpers in der optimalen Verdünnung für 15 min bei 4 °C. Das gefärbte Zellpellet wurde zweimalig mit FACS-Waschpuffer gewaschen, zentrifugiert und der Überstand verworfen. Zur

Messung erfolgte die Lösung des Zellpellets in Waschpuffer und die Lagerung bei 4 °C. Zwischen den Antikörperfärbungen von GtαRt IgG FITC und CD45RA PE wurde zusätzlich mit Mausserum (1:2) geblockt.

Intrazelluläre Färbung des Markers: FoxP3

Nach abgeschlossener Oberflächenfärbung konnte mit der intrazellulären Färbung fortgefahren werden. Es erfolgte eine 20-minütige Inkubation mit FIX/Perm Puffer, in einer Verdünnung von 1:4, bei RT im Dunkeln. Nach zwei Waschschritten wurde 15 min mit Perm-Puffer (1:10) bei RT im Dunkeln inkubiert. Nach zweimaligem Waschen erfolgte die Inkubation mit dem optimal, mit Perm Puffer verdünnten, intrazellulär färbenden Antikörpern für 15 min bei RT im Dunkeln. Nach weiterem zweimaligen Waschen wurden die Zellen zur Messung in FACS-Röhrchen überführt. Die Messung vollzog wurde sofort im Anschluss durchgeführt. Die intrazelluläre Färbung wurde ausschließlich im peripheren Blut angewandt.

FACS- Waschmedium

PBS	9,55 g
BSA	5g
NaN_3	1g
Aqua dest.	ad 1000 ml

Material:

96-Well Mikrotest Platte	Sarstedt, Deutschland
Falkon-PP-Röhrchen 15 ml/ 50 ml	Greiner Bio-One, Österreich
Mix-Mate	Eppendorf, Deutschland
FACS-Röhrchen	Sarstedt, Deutschland
FoxP3 Fix/Perm Puffer Set	Biolegend, USA
Medium 199 (1x) Gibco	Thermo Fisher Scientific, USA
Centrifuge 5810 R	Eppendorf, Deutschland
Mausserum	Sigma-Aldrich, USA
Serologische Pipetten, Falcon	BD, Biosciences®, USA

Antigen	Farbstoff	Klon	Firma	Konzentration	Volumen	Verdünnung
CD3	FITC	1F4	BioLegend	0,5 mg/ml	10 µl	1:40
CD4	PE	W3/25	BioLegend	0,2 mg/ml	10 µl	1:200
CD4	FITC	W3/25	BioLegend	0,5 mg/ml	10 µl	1:80
CD8a	APC	OX-8	BioLegend	0,2 mg/ml	10 µl	1:40
CD25	PE	OX-39	BioLegend	0,2 mg/ml	10 µl	1:20
CD45	PE/Cy7	OX-1	BioLegend	0,2 mg/ml	10 µl	1:40
CD161	APC	10/78	BioLegend	0,5 mg/ml	10 µl	1:40
IgG	FITC	Polyklonal	Dianova	1,5 mg/ml	10 µl	1:40
CD45RA	PE	OX-33	BioLegend	0,2 mg/ml	10 µl	1:100
IgG1	PE	MOPC-21	BioLegend	0,2 mg/ml	10 µl	1:20
IgG1	AlexaFluor647	MOPC-21	BioLegend	0,5 mg/ml	5 µl	1:20
FoxP3	AlexaFluor647	150D	BioLegend	50 µg/ml	5 µl	1:2

Tabelle 2: Verwendete Antikörper in der durchflusszytometrischen Messung

2.4.10. Durchflusszytometrische Analyse der Lymphozytensubpopulationen

Die Messung der Lymphozytensubpopulationen erfolgte mittels Durchflusszytometrie, durch das FACS Gerät FACS Canto und wurde mit FACSDiva und FlowJo ausgewertet.

Hierbei wurde der longitudinale Verlauf analysiert: In sogenannten Dot-Plots stellt sich die Qualität und prozentuale Quantität der in der Probe gemessenen Zellen dar. Die Rohwerte wurden nach dem Gating der Zellen in Relation zu den Gesamtlymphozyten (Gesamtheit der CD45+ Zellen) gezogen. Zur Berechnung der absoluten Zellzahlen wurde die prozentuale Lymphozytensubpopulationenanzahl auf die absoluten Lymphozytenanzahl angewandt. Diese berechneten sich aus der mittels Türks-Lösung bestimmten Leukozytenzahl und mittels Blutausstrich gezählten prozentualen Lymphozytenzahl.

<u>Material:</u>

FACS Canto BD, Biosciences®, USA

FACSDiva BD, Biosciences®, USA

FlowJo Tree Star® Inc., USA

2.5. Histologische Untersuchung der NTx-Nieren

2.5.1 Histopathologische Beurteilung

Für die histopathologische Untersuchung wurde, wie in Kap. 2.3. (Tötung der Versuchstiere und Organentnahme) beschrieben die NTx-Niere entnommen und in Formalin (4 %) fixiert. Dr. Noriega (Nephropathologie, Institut für Pathologie, Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf, Prof. Dr. Wiech) arbeitete das Gewebe auf und wertete diese unter verblindeten Bedingungen anhand der Banff Klassifikation(Haas *et al.*, 2014) (siehe 2.4.2.) aus. Hierzu wurden an Tag 7 planmäßig getötete Versuchstiere aus der Gruppe 3 3 "Allo Akut" (n=4) und 4 "Allo αCD20 i.v." (n=5) ausgewählt. NTx-Nieren von an Tag 7 planmäßig getöteten isogentransplantierten Versuchstieren dienten zur Kontrolle.

2.5.2. Banff 1997 diagnostische Kategorien für Nierentransplantatbiopsien Banff '09 Update(Sis *et al.*, 2010)

1. Normal
2. Antikörper vermittelte Veränderungen (kann mit 3,4,5 und 6 einhergehen)
Bedingt Zirkulation donorspezifischer Antikörper (DSA+),
Komplementdeposition (C4d+) und typische Transplantatpathologie

Akute Antikörper vermittelte Abstoßung: Komplementdeposition (C4d+), Vorhandensein donorspezifischer Antikörper (DSA+) und morphologische Evidenz akuter Gewebsschädigung wie:

1. Leichte Tubulusnekrose-ähnliche Entzündung
2. Kapilläre und/oder glomeruläre Entzündung (ptc/g > 0) und/oder Thrombosen
3. Transmurale intimale Arteriitis (v3)

Chronisch aktive Antikörper vermittelte Abstoßung: Komplementdeposition (C4d+), Vorhandensein donorspezifischer Antikörper (DSA+) und morphologische Evidenz chronischer Gewebsschädigung wie:

- Doppelkonturen der glomerulären Kapillaren
und/oder Lamellierung der Basalmembranen der peritubulären Kapillaren
und/oder interstitielle Fibrose/ tubuläre Atrophie

und/oder intimale Fibrose den Arterien

3. Borderline Veränderungen: "Verdächtig auf" akute T-Zell vermittelte Abstoßung (kann mit 2,5 und 6 einhergehen), wird angewendet falls fokale Tubulitis aber keine intimale Arteriitis vorliegt (t1, t2, t3) mit geringer interstitieller Infiltration (i0, i1) oder
interstitieller Infiltration (i2, i3) mit milder Tubulitis (t1)

4. T-Zell vermittelte Abstoßung (kann mit 2, 5 und 6 einhergehen)

Akute T-Zell vermittelte Abstoßung

IA. Interstitielle Infiltration (i2, i3) und fokal moderate Tubulitis (t2)

IB. wie IA nur starke Tubulitis (t3) anstatt moderater Tubulitis (t2)

IIA. leichte bis moderate intimale Arteriitis (v1)

IIB. schwere intimale Arteriitis (<25 % Gefäßeinengung, v2)

III. transmurale intimale Arteriitis und/oder fibrinöse Veränderungen der Arterie und Nekrose der glatten Muskelzellen mit lymphozytärer Entzündung (v3)

Chronisch aktive T-Zell vermittelte Abstoßung: Arterielle intimale Fibrose mit mononukleärer Zellinfiltration, Fibrose, Formation einer Neointima

5. Interstitielle Fibrose und tubuläre Atrophie, keine Anzeichen einer spezifischen Ätiologie (kann nichtspezifische vaskuläre und glomeruläre Sklerose beinhalten, aber die Schwere richtet sich nach tubulointerstitiellen Eigenschaften

I. Milde interstitielle Fibrose und tubuläre Atrophie (<25 % der Rinde)
II. Moderate interstitielle Fibrose und tubuläre Atrophie (26-50 % der Rinde)
III. Starke interstitielle Fibrose und tubuläre Atrophie/ Verlust (>50 % der Rinde)

6. Andere: Veränderungen, die nicht durch eine akute oder chronische Abstoßung bedingt sind (kann isolierte g, cg oder cv Läsionen beinhalten, kann mit 2,3,4 und 5 einhergehen)

Tabelle 3: **Grade und Eigenschaften morphologischer Korrelate der Transplantatabstoßung**

t	Tubulitis
i	Interstitielle Infiltration
v	Intimale Arteriitis
g	Glomerulitis
ptc	Peritubuläre Kapillaritis
	0 = nicht vorhanden, 1 = mild, 2 = moderat, 3 = stark

2.5.3. Anfertigung von Gefrierschnitten

Für die immunhistologische Unterschung wurde ein Teil der Niere bei -15 °C mittels Tissue Tek® an der Schneidescheibe fixiert und mit einer Klingentemperatur von -25 °C 5 µm dicke Kryoschnitte angefertigt. Der auf einem Objektträger aufgenommene Gewebeschnitt trocknete über Nacht bei RT. Bis zur Weiterverarbeitung wurden die Schnitte bei -20 °C eingefroren. Das gleiches Prozedere erfolgte für die Milz mit selber Klingentemperatur, jedoch einer konstanten Probentemperatur von -16 °C.

Material:

Objektträger	Assistent, Deutschland
Deckgläschen	Roth,
Deutschland	
Kryostat Klingen	Feather, Japan
CryoStar NX70	Thermo Scientific,
USA	
Tissue Tek	Sakura, Niederlande

2.5.4. Immunhistochemische Färbung der transplantatinfiltrierenden Zellen

Einfachfärbung: TCR

Nach 10-minütiger Fixierung in eiskaltem Aceton wurden die Organpräparate 10 min bei RT getrocknet. Das mittels Dakopen umrandete Gewebe musste zur Vermeidung unspezifischer Hintergrundfärbungen, 60 min mit hitzeinaktiviertem NRS (1:10) in einer Feuchtekammer geblockt werden. Daran schloss sich ein Waschschritt mit PBS und die Inkubation des Primärantikörpers über Nacht bei 4 °C an. Als Negativkontrolle diente ein Präparat, welches mit PBS statt mit dem Primärantikörper inkubiert wurde.
Nach zweimaligem Waschen mit PBS, erfolgte die Inkubation mit dem Peroxidase-konjugiertem Ratte-anti-Maus IgG (=RAM, Sekundärantikörper) für 1 h bei 4 °C, welcher mit PBS und 1:50 NRS verdünnt wurde. Der Sekundärantikörper wurde zur Positivkontrolle mit Substratlösung versetzt. Es erfolge wiederum zweimaliges Waschen mit PBS, woraufhin die Schnitte mit der Substratlösung (3-Amino-9-Ethylcarbazol) inkubiert wurden. Durch die Enzym-Substrat-Reaktion der Peroxidase mit AEC bildete sich der als bräunliche Färbung erkennbare Niederschlag. Der Substratlösung (s. AEC - Substratlösung für Peroxidase) wurde Wasserstoffperoxid beigesetzt, um die endogene Peroxidaseaktivität zu hemmen. Nachdem die Schnitte ausreichende gefärbt waren, wurde die Enzymreaktion mit Leitungswasser gestoppt. Es erfolgte die 1-2-minütige Kerngegenfärbung der Schnitte mittels Hämatoxylin nach Mayer. Die Schnitte wurden daraufhin in Leitungswasser gewaschen und dort 10 min zum Nachbläuen belassen. Nach dem Trocknen erfolgte das Eindecken mit Aquatex. Die Präparate wurden bei 4 °C gelagert.

Einfachfärbung: Ratten-Pan-B-Lymphozyt, CD8, CD161, CD68

Die immunhistochemische Einfachfärbung erfolgte wie zuvor bei der "Einfachfärbung: TCR" beschrieben, jedoch mit dem Unterschied, dass die Präparate nur 10 min mit NRS geblockt wurden und die Inkubationszeit des Primärantikörpers nur 45 min betrug.

Tabelle 4: **Verwendete Primärantikörper in der immunhistochemischen Färbung**

Antigen*[1]	**Klon**	**Firma**	**Konzentration**	**Verdünnung**	**Sekundärer Antikörper*[2]**
Rat TCR α/β	R73(Hünig *et al.*, 1989)	Biolegend	0,5 mg/ml	1:5000	RAM 1:20
CD8b	3.4.1.(Hirji, Lin and Befus, 1997)	Bd Biosciences	0,5 mg/ml	1:10	RAM 1:20
CD161	10/78(Li *et al.*, 2003)	AbD Serotec	1 mg/ml	1:5000	RAM 1:20
CD68	ED1(Dijkstra *et al.*, 1985)	AbD Serotec	1 mg/ml	1:5000	RAM 1:20
Rat-Pan-B-Lymphocyte	Ki-B1R	Dianova	0,1 mg/ml	1:10	RAM 1:20

Verdünnung: *[1]Primärantikörper mit PBS, *[2]Sekundärantikörper mit PBS + 1:50 Normalrattenserum

Material:

Aceton 99,5%	Greyer, Deutschland
Dako-Pen	Dako, Dänemark
PBS Dulbecco	Biochrom, Deutschland
Mayer's Hämatoxylin	Sigma-Aldrich, USA
Aquatex	Merck, Deutschland
Peroxidase-conjugated Rat anti-Mouse IgG	Dianova, Deutschland
3-Amino-9-Ethylcarbazol	Dako, Dänemark
N-N-Dimethylformamid	Sigma-Aldrich, USA
Hydrogen Peroxide 30%	Merck, Deutschlan

AEC - Stammlösung für Peroxidase:

3-Amino-9-Ethylcarbazol	40 mg	Sigma-Aldrich, USA
N-N-Dimethylformamid	10 ml	Sigma-Aldrich, USA

Die Lösung wurde nach dem Mischen filtriert.

AEC - Substratlösung für Peroxidase:

AEC - Stammlösung	1 ml	
Na-Acetat-Puffer	14 ml	Sigma-Aldrich, USA
H_2O_2 30 %	15 µl	Merck, Deutschland

Die immer frisch angesetzte Lösung wurde nach dem Mischen filtriert.

2.5.5. Auswertung der Histologie

Immunhistochemie

Die transplantatinfiltrierenden Zellen in der Nierenrinde wurden durch Auszählung von zehn Hauptgesichtsfeldern (400x Vergrößerung) pro Histologie quantifiziert und als Mittelwert mit Standardabweichung dargestellt. Die Untersuchung fand unter verblindeten Bedingungen statt. Hierfür wurden je sieben Versuchstiere der Versuchsgruppe "Allo Akut" und "Allo αCD20 i.v.", welche an Tag 7 oder 21 getötet wurden ausgewählt. Zusätzlich wurden vier weitere Versuchstiere der Versuchsgruppe "Allo Akut", welche Tag 30 überlebt haben und in der Arbeitsgruppe bereits generiert wurden ausgewertet und mit den anderen Daten verglichen.

Immunfluoreszenz

Anhand der spezifische Färbung wurden die transplantatinfiltrierenden B-Zellen näher differenziert. Zusätzlich zur Quantität und Farbintensität, wurde außerdem die Lokalisation der Färbung (Infiltriende Zellen, Glomeruli, Tubuli) beurteilt.

Material:

Olympus Mikroskop CX41	Olympus, Deutschland
CellSens Standard, 2010 (PC)	Olympus, Deutschland
Mikroskop Axio Observer.Z1	Zeiss, Deutschland
Axio Vision LE Release 4.8, 2009 (PC)	Zeiss, Deutschland

2.6. Statistische Auswertung

Die statistischen Analysen wurden mithilfe der Software GraphPad Prism (USA), Version 6.0 (Mac OS X) durchgeführt. Der direkte Vergleich zweier Gruppen erfolgte mittels unabhängigen T-Tests. Die Software berechnete unter Verwendung einer einarmigen ANOVA und Bonferroni Korrektion multiple Gruppenvergleiche. Signifikante Unterschiede wurden bei $p<0,05$ festgestellt.

3. Ergebnisse

3.1. Überleben

3.1.1. Versuchsgruppe "αCD20 i.v."

Für die Versuchsgruppe "αCD20 i.v." wurden zwei Versuchstiere generiert. Zudem lagen von einem weiteren Versuchstier bereits Daten vor.
Da alle drei Versuchstiere ihr Versuchsziel von elf Wochen erreichten, liegen zum Überleben dieser Versuchstiergruppe noch keine Langzeitergebnisse vor.

3.1.2. Versuchsgruppe "Iso"

Für die Versuchgruppe „Iso“ wurden acht Versuchstiere generiert. Daten drei weiterer Versuchstiere lagen bereits vor.
11 von 11 Tieren erreichten ihr Versuchsende. Bei fünf Versuchstieren wurde das Versuchsende mit 24 Wochen definiert und es erfolgte alle zwei Wochen eine regelmäßige durchflusszytometrische Analyse des Blutes.

Sechs weitere Tiere wurden als zusätzlicher Vergleich zu den Versuchsgruppen "Allo Akut" und „Allo αCD20 i.v.“ generiert und wöchentlich durchflusszytometrisch gemessen. Davon wurden drei Versuchstiere 30 Tage und drei weitere Versuchstiere sieben Tage beobachtet.

3.1.3. Versuchsgruppe "Allo Akut"

Für die Versuchsgruppe "Allo Akut" wurden acht Versuchstiere generiert. Von weiteren zehn Versuchstieren lagen bereits Daten vor.

11 von 18 Versuchstieren der allogentransplantierten Versuchsgruppe „Allo Akut“ überlebten bis zum Versuchsende: Fünf Versuchstiere erreichten ihr definiertes Versuchsende von 30 Tagen, vier Versuchstiere wurden als zusätzlicher Vergleich in den immunhistologischen Analysen zur Versuchsgruppe "Allo αCD20 i.v.“ an Tag 7 und 2 Versuchstiere an Tag 21 geplant getötet.

7 von 18 Versuchstieren mussten vor dem Versuchsende wegen schlechten Allgemeinzustandes, zu hohem Serumkreatinin oder Gewichtsverlustes von über 20% zwischen Tag 8 und 26 getötet werden. Zwei von ihnen wurden tot aufgefunden.

Das mittlere Überleben der Versuchsgruppe betrug nach Kaplan-Meier-Analyse 45% und die Ratten lebten durchschnittlich 26 Tage.

3.1.4. Versuchsgruppe "Allo αCD20 i.v."

Für die Versuchsgruppe "Allo αCD20 i.v." wurden zehn Versuchstiere generiert. Daten von fünf weiteren Versuchstieren lagen bereits vor.

In der transplantierten und gespritzten Versuchsgruppe „Allo αCD20 i.v.“ erreichten 7 von 15 Tieren ihr Versuchsende: fünf Versuchstiere wurden für immunhistologische Analysen an Tag 7 und 2 Versuchstiere an Tag 21 und 23 geplant getötet.

8 von 15 Versuchstieren erreichten das Versuchsziel nicht und wurden zwischen Tag 8 und 21 getötet. Davon wurden fünf Versuchstiere tot aufgefunden.

Das mittlere Überleben der Versuchsgruppe betrug nach Kaplan-Meier-Analysen

21 % und die Tiere überlebten durchschnittlich elf Tage.

Das Überleben der Versuchsgruppe "Allo αCD20 i.v." war im Vergleich zu dem Überleben der Versuchsgruppe 3 "Allo Akut" nach dem Log-Rank-Test signifikant vermindert (p<0,05). Daten zum Langzeitüberleben liegen noch nicht vor.

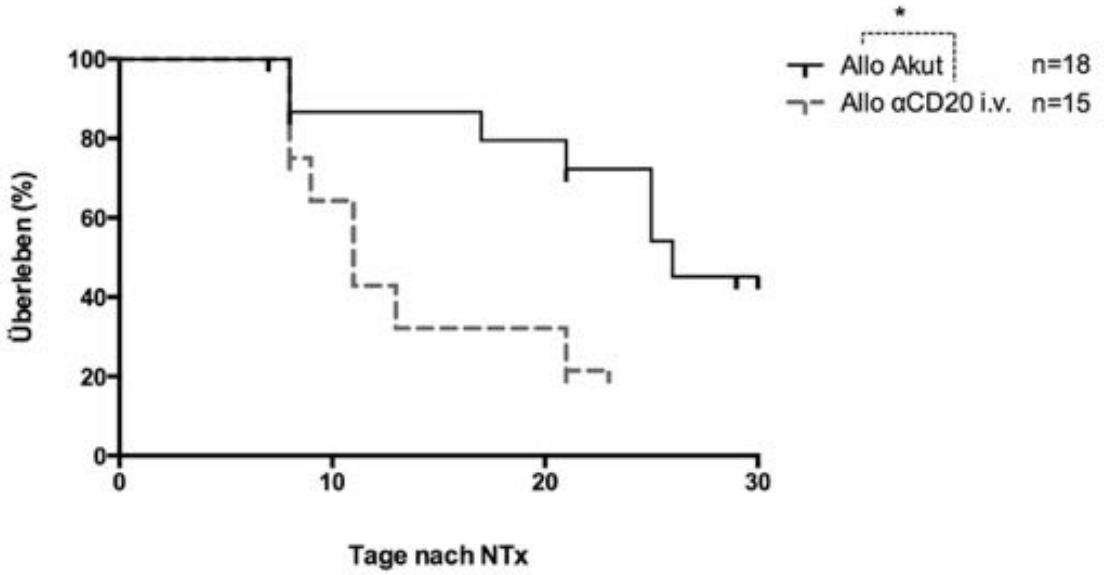


Abbildung 4: Überleben nach Nierentransplantation "Allo Akut" und "Allo αCD20 i.v.". Versuchtiergruppe 3 „Allo Akut“ (schwarze Linie, n=18), Versuchstiergruppe 4 „Allo αCD20 i.v.“ (graue gestrichelte Linie, n=15), vertikale Linien weisen auf ein Versuchsabbruch hin. Das Erreichen des Versuchsendpunktes wurde zensiert. (*p<0,05; NTx=Nierentransplantation)

3.2. Klinische Befunde

Zur Beurteilung der Nierenfunktionen wurden regelmäßig Körpergewicht, Serumkreatinin sowie Urinalbumin gemessen.

3.2.1. Verlauf des Körpergewichtes

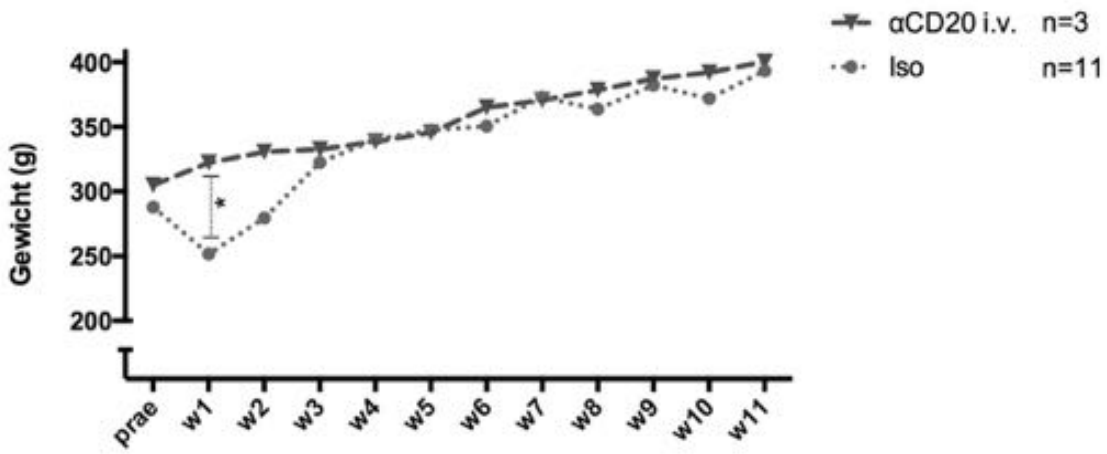


Abbildung 5: Verlauf des Körpergewicht nach isogener NTx und αCD20-Injektion. Versuchsgruppe „αCD20 i.v.“ (graue gestrichelte Linie, n=3), Versuchsgruppe „Iso“ (hellgraue gepunktete Linie, n=11). (*=p<0,05) NTx=Nierentransplatation; Nx=Nephrektomie

Nach der Transplantation erfolgte anfangs täglich und nach Stabilisierung jeden zweiten Tag, bei der Kontrollgruppe wöchentlich, die Kontrolle des Gewichts.

Die Versuchstiere der isogentransplantierten Versuchsgruppe nahmen postoperativ an Gewicht ab (Woche 1 Vgl. "αCD20 i.v.": $p<0,05$ s. Abb 5). Dies änderte sich jedoch ab dem 7. post-OP-Tag, wo sie an Gewicht zunahmen.

Die Versuchstiere der Versuchsgruppe „αCD20 i.v.“, die nicht transplantiert wurden, jedoch den Antikörper erhielten, verhielten sich bezüglich des Gewichtsverlaufs wie unbehandelte gesunde Versuchstiere. Die isogentransplantierten Versuchstiere glichen sich ebenfalls ab der 4. Woche post-OP diesem Gewichtsverlauf an.

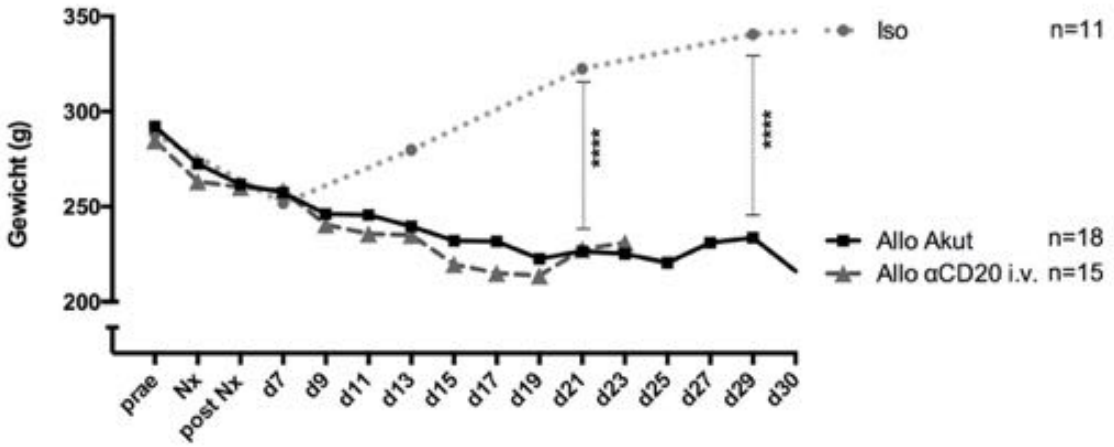


Abbildung 6: Verlauf des Körpergewicht nach NTx "Iso", "Allo.Akut" und "Allo αCD20 i.v". Versuchstiergruppe 2 „Iso“ (hellgraue gepunktete Linie, n=11), Versuchtiergruppe 3 „Allo Akut“ (schwarze Linie, n=18), Versuchstiergruppe 4 „Allo αCD20 i.v.“ (dunkelgraue gestrichelte Linie, n=15). (***p<0,001; ****p<0,0001); NTx=Nierentransplantation; Nx=Nephrektomie

Nach der OP nahm das Gewicht in der Versuchsgruppe „Allo Akut“, sowie auch in Versuchsgruppe „Allo αCD20 i.v.“ im Verlauf kontinuierlich ab (Abb 6). An Tag 30 betrug das Gewicht in der Versuchsgruppe "Allo Akut" 234 ±18 g und lag 35 g unter dem mittleren Gewicht post-Nx, welches einer 15 %-igen Differenz entspricht.
Zwischen den Versuchsgruppen "Allo Akut" und "Allo αCD20 i.v." ergaben sich im Gewichtsverlauf keine signifikanten Unterschiede.

Zwischen der Versuchsgruppe "Iso" und "Allo Akut" kam es jedoch in Woche 3 (p<0,01) und Woche 4 (p<0,001) zu einem signifikanten Unterschied.
In Woche 3 bestand ebenfalls ein signifikanter Unterschied (p<0,01) zwischen den Versuchsgruppen „Iso“ und „Allo αCD20 i.v.“.

3.2.2. Verlauf des Serumkreatinins

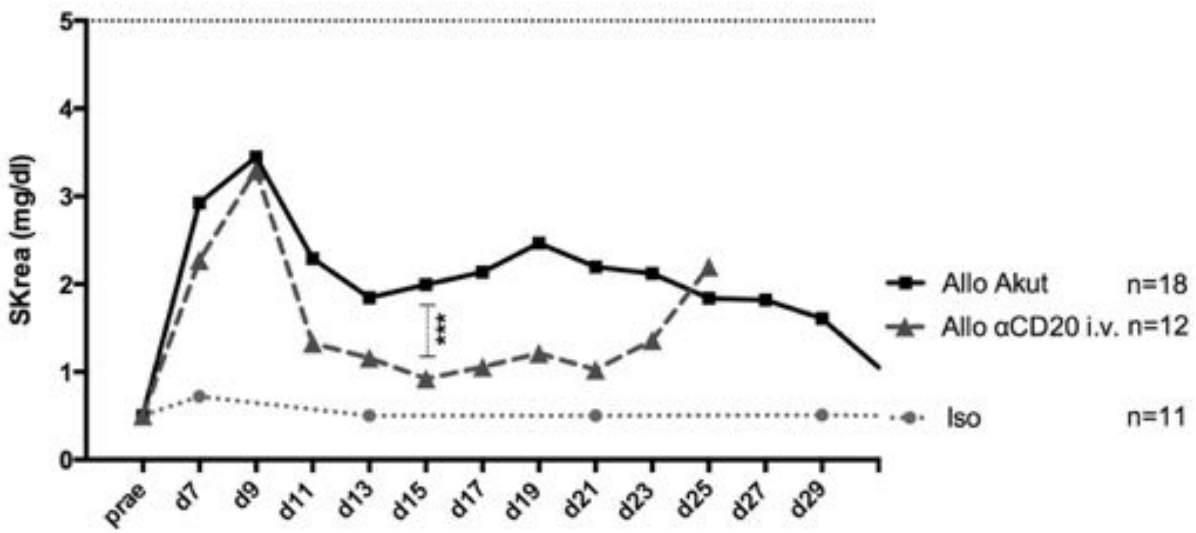


Abbildung 7: Serumkreatinin nach Nierentransplantation im Verlauf. Versuchsgruppe „Iso“ (hellgraue gepunktete Linie, n=5), Versuchsgruppe „Allo Akut“ (schwarze Linie, n=18), Versuchsgruppe „Allo αCD20 i.v.“ (dunkelgraue gestrichelte Linie, n=10). SKrea = Serumkreatinin (***p<0,001)

Die Serum-Kreatininkonzentration wurde alle zwei Tage gemessen.

Die isogentransplantierte Versuchsgruppe wies ab dem 7. Tag post-OP einen konstanten Serumkreatininwert von <0,5 mg/dl auf. Es liegen lediglich dreimalige sich bis 0,6 mg/dl belaufende Abweichungen vor.

Die Versuchsgruppe „αCD20 i.v.“ zeigte, bis auf eine Ausnahme bei einem Versuchstier in Woche 10 (2,49 mg/dl) ebenfalls elf Wochen durchgehende konstante Serumkreatininwerte mit Werten unter 0,5 mg/dl auf.

Eine Woche post-OP, unmittelbar zwei Tage nach der Eigennephrektomie, stieg das Serumkreatinin der Versuchsgruppen „Allo Akut“ und „Allo αCD20 i.v.“ kurzfristig deutlich an. Es erreichte in beiden allogentransplantierten Versuchsgruppen sein Maximum am 9. Tag (*Allo Akut:* 3,12 ±0,81 mg/dl; *Allo αCD20 i.v.:* 3,19 ± 0,96 mg/dl). Im Verlauf fiel das Serumkreatinin in "Allo Akut" langsam bis zu einem Wert von 1,05 ±0,27 mg/dl an Tag 30.

Das Serumkreatinin der Versuchsgruppe "Allo αCD20 i.v.“ fiel noch stärker als in "Allo Akut" und pendelte sich schließlich zwischen Tag 11 und 23 auf leicht erhöhtem Niveau ein (Mittelwert: 1,15 ±0,43 mg/dl). Daraufhin stieg es bis Tag 23 wieder an.

An Tag 13 post-OP war das Serumkreatinin der Versuchsgruppe „Allo αCD20 i.v.“ (1,16 ±0,58 mg/dl) im Vergleich zu „Allo Akut“ (1,85 ±0,53 mg/dl, $p<0,001$), signifikant erniedrigt.
Das Serumkreatinin zum Todeszeitpunkt der beiden allogentransplantierten Versuchsgruppen lag bei 1,39 ± 0,35 mg/dl (Allo Akut) und 3,1 ±0,97 mg/dl (Allo αCD20 i.v.“), welches sich nicht signifikant unterschied.

Zwischen den Versuchsgruppen "Iso" und "Allo Akut" lag ein signifikanter Unterschied an Tag 7, 13, 21 und 29 ($p<0,0001$) vor.

3.2.3. Albumin im Urin im Verlauf

Jede zweite Woche wurde die Albuminkonzentration der Versuchstiere gemessen. Die Versuchsgruppe "αCD20 i.v." wies durchschnittlich Werte unter 30 mg/dl auf. Dies trifft für die Versuchsgruppe "Iso" bis einschließlich Woche 10 ebenfalls zu.
Im Vergleich hierzu konnten in den allogentransplantierten Gruppen „Allo Akut“, sowie „Allo αCD20 i.v.“ post transplantationem eine deutliche Albuminurie festgestellt werden. Die Urin-Albuminwerte der Gruppe „Allo Akut“ sind in Woche 3 gegenüber den Werten der Gruppe "Iso" signifikant erhöht ($p<0,05$).

Zwischen den Versuchsgruppen "Allo Akut" und "Allo αCD20 i.v." bestand hinsichtlich der Urin-Albuminkonzentrationen jedoch kein signifikanter Unterschied.

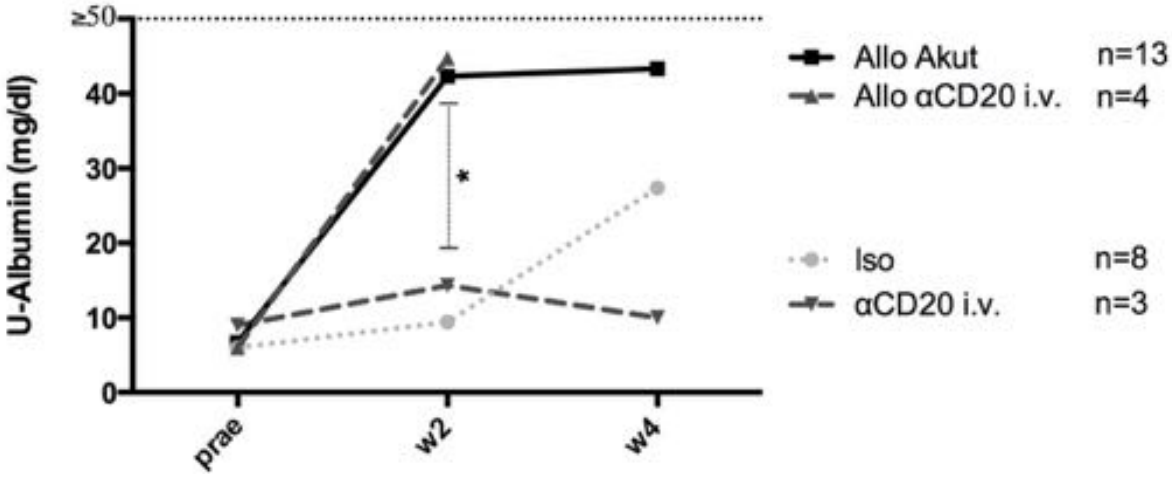


Abbildung 8: Verlauf des Urinalbumins nach NTx/ αCD20 i.v. Gabe. Versuchsgruppe „αCD20 i.v.“ (graue gestrichelte Linie, n=3), Versuchsgruppe „Iso“ (hellgraue gepunktete Linie, n=8), Versuchsgruppe „Allo Akut“ (schwarze Linie, n=13), Versuchsgruppe „Allo αCD20 i.v.“ (graue gestrichelte Linie, n=4). (*$p<0,05$)

3.3. Durchflusszytometrische Analysen der Lymphozyten des peripheren Bluts der Kontrollgruppe "αCD20 i.v."

Um die Effekte der B-Zell-Depletion zu untersuchen wurden die Lymphozytensubpopulationen im peripheren Blut dreier B-Zell depletierter Versuchstiere (αCD20 i.v. d0+ d14), die keine Transplantation erhielten elf Wochen lang untersucht. Um eine konstante Depletion zu ermöglichen wurde an Tag 14 eine erneute αCD20 i.v. Injektion vorgenommen. Die Werte post injektionem wurden mit Messungen vor der Injektion verglichen.

3.3.1. Gesamtlymphozyten

Hinsichtlich der relativen sowie absoluten Gesamtlymphozytenanzahlen gab es bei der Versuchsgruppe "αCD20 i.v." über 11 Wochen im Vergleich zu den prae-Injektionswerten keine statistisch signifikanten Veränderungen.

3.3.2. CD3+-Zellen: T-Lymphozyten

Die prozentualen T-Lymphozytenanzahlen zeigten in den folgenden zehn Wochen nach Injektion eine signifikante Erhöhung gegenüber den prae Werten auf. Diese Veränderung zeigte sich in den ersten vier Wochen stärker als in der 5. – 10. Woche, wo die relative T-Lymphozytenanzahl annähernd konstant blieb. Die absoluten T-Lymphozyten wiesen im Vergleich dazu, bis auf eine leichte Vermehrung in Woche 5, keine signifikanten Veränderungen auf (Abb 9).

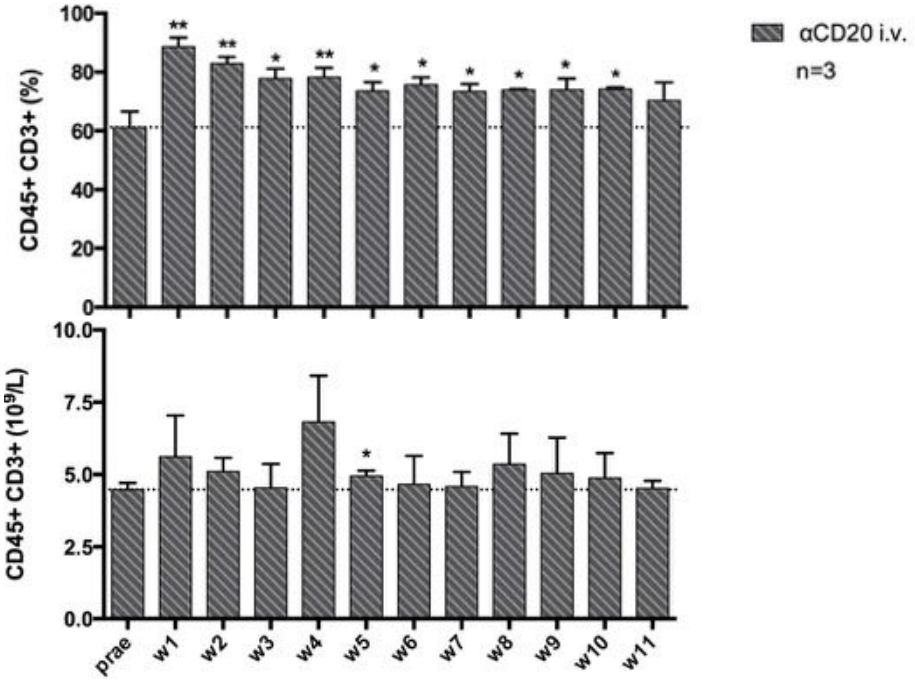


Abbildung 9: Verlauf der prozentualen und absoluten CD45+CD3+-Zellen im peripheren Blut "αCD20 i.v.". Versuchsgruppe 1 „αCD20 i.v.“ (gestreifter Balken), w=Woche, Vgl. horizontale Linie Normalwert (*p<0,05; **p<0,01).

3.3.3. CD3+CD4+-Zellen: T-Helferzellen

Die prozentualen T-Helferzellzahlen zeigten in den neun Wochen post injektionem eine signifikante Erhöhung gegenüber den prae-Werten auf, welche in den ersten vier Wochen stärker ausgeprägt war, als in der 5. – 9. Woche (Abb 10).

Die absoluten T-Lymphozytenanzahlen wiesen im Vergleich dazu keine signfikanten Veränderungen auf.

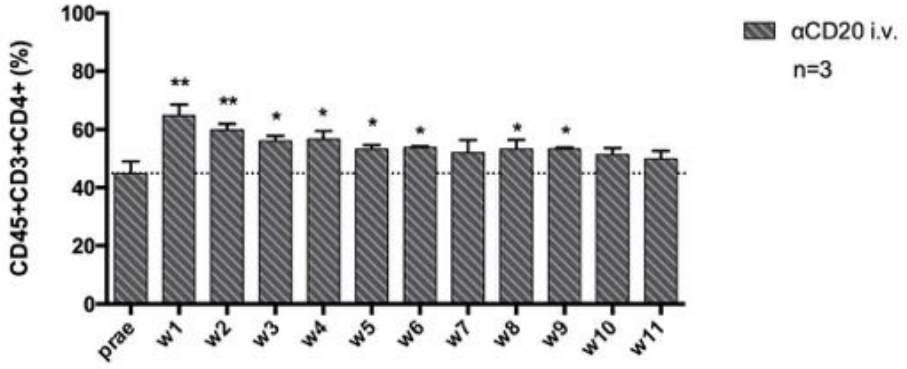


Abbildung 10: Verlauf der prozentualen CD45+CD3+CD4+-Zellen im peripheren Blut "αCD20 i.v.". Versuchsgruppe „αCD20 i.v.“ (gestreifter Balken), w=Woche, Vgl. horizontale Linie Normalwert (*p<0,05; **p<0,01).

3.3.4. CD3+CD8+-Zellen: Zytotoxische T-Zellen

Die prozentualen zytotoxischen T-Zellanzahlen zeigten sich in Woche 1, 2, 3, 6, 7 und 10 signifikant erhöht im Vergleich zu den Werten prae injektionem. Die absoluten zytotoxischen T-Zellanzahlen stellten sich im Vergleich dazu unverändert dar.

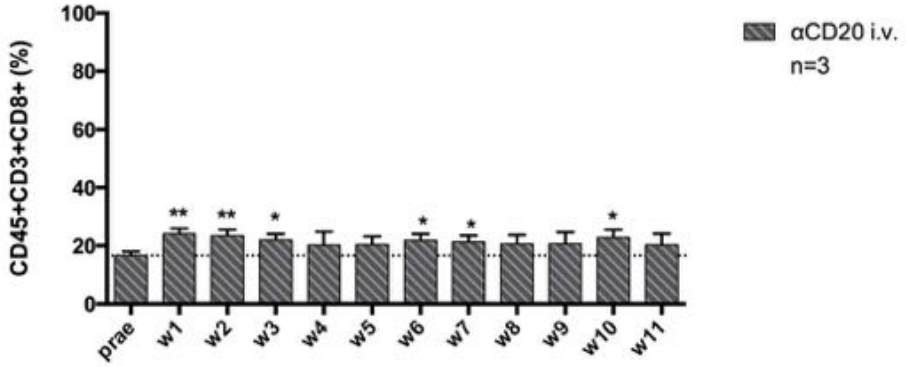


Abbildung 11: Verlauf der prozentualen CD45+CD3+CD8+-Zellen im peripheren Blut "αCD20 i.v.". Versuchsgruppe „αCD20 i.v.“ (gestreifter Balken), w=Woche, Vgl. horizontale Linie Normalwert (*p<0,05; **p<0,01)

3.3.5. CD45RA+IgG+-Zellen: B-Zellen

Die absoluten sowie relativen B-Zellzahlen wurden im Vergleich zu prae-Injektion erfolgreich depletiert (absolut $p<0,01$; relativ $p<0,001$; Abb. 12). Die Depletion der relativen Anzahl der B-Zellen war bis einschließlich Woche 7, die absolute Anzahl bis einschließlich Woche 5 signifikant sichtbar. In Woche 11 lagen die absoluten sowie relativen B-Zellen wieder fast vollständig beim Ausgangswert prae-injectionem.

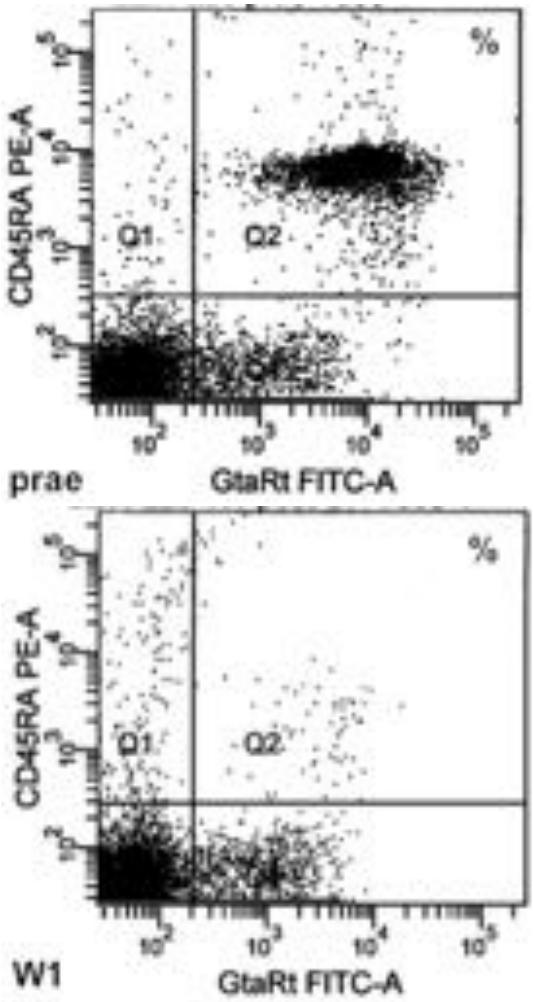


Abbildung 12: Dotplot der Färbung mit CD45+CD45RA+IgG1+-Zellen im peripheren Blut "αCD20 i.v." prae injektionem und Woche 1. Vor der Injektion (Abbildung links) lagen bei einem "αCD20 i.v." Versuchstier 18,02 % ≙ 1,21 10^9/L Zellen vor. Eine Woche nach der Depletion (Abbildung rechts) waren nur noch 0,4 % ≙ 0,02 10^9/L vorhanden.

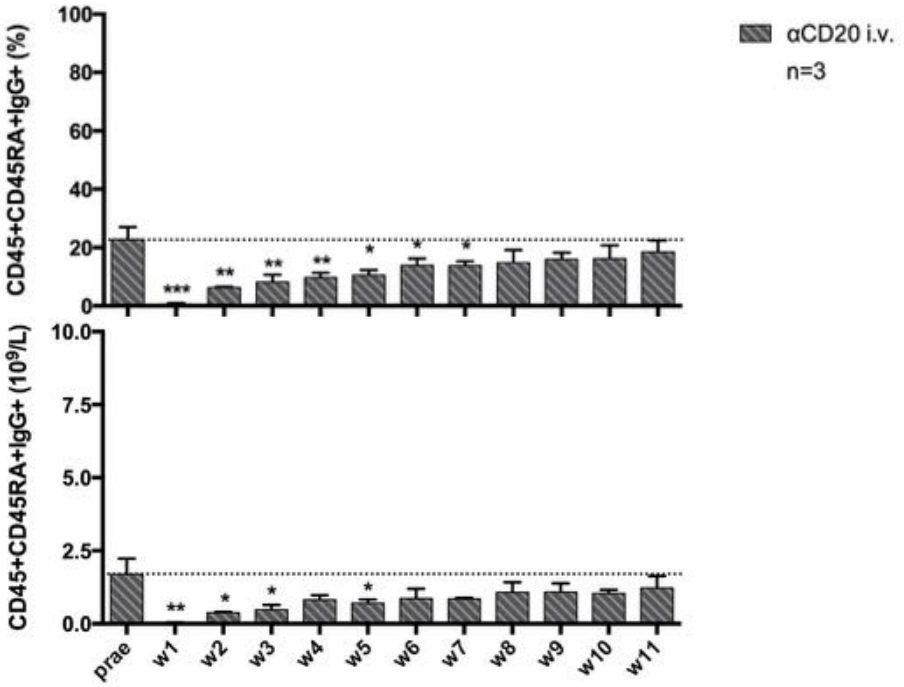


Abbildung 13: Verlauf der prozentualen und absoluten CD45+CD45RA+IgG+-Zellen im peripheren Blut "αCD20 i.v.". Versuchsgruppe „αCD20 i.v.“ (gestreifter Balken), w=Woche, Vgl. horizontale Linie Normalwert (*p<0,05; **p<0,01; ***p<0,001).

3.3.6. CD3+CD161+-Zellen: NKT-Zellen

Hinsichtlich der relativen sowie absoluten NKT-Zellen gab es bei der Versuchsgruppe "αCD20 i.v." über die elf Wochen im Vergleich zu den prae-Injektionswerten keine signifikanten Veränderungen.

3.3.7. CD3–CD161^{high+}-Zellen: NK-Zellen

Die prozentuale NK-Zellzahl zeigten in Woche 1 und 3 einen signifikanten Anstieg im Vergleich zu den prae-Werten (Abb. 14). Die absolute NK-Zellzahl stellte sich im Vergleich dazu unverändert dar.

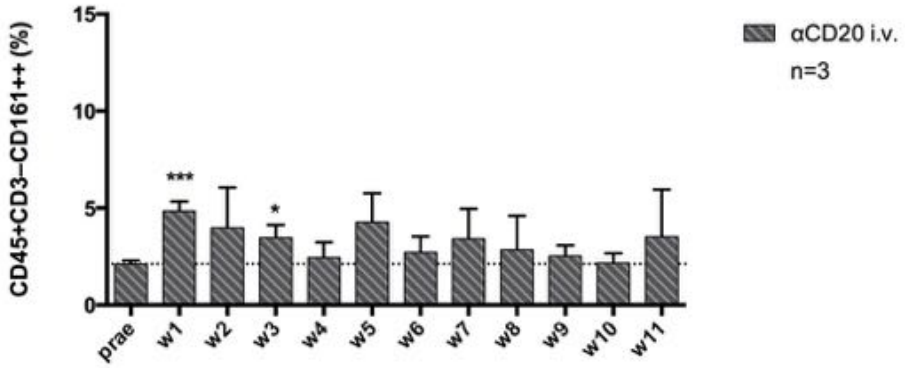


Abbildung 14: Verlauf der prozentualen CD45+CD3–CD161++-Zellen im peripheren Blut "αCD20 i.v.". Versuchsgruppe „αCD20 i.v.“ (gestreifter Balken), w=Woche, Vgl. horizontale Linie Normalwert (*p<0,05; ***p<0,001).

3.3.8. CD4+CD25+: "Aktivierte T-Zellen"

Die prozentuale Anzahl der "aktivierten" T-Zellen zeigte im Vergleich zu den Veränderungen der restlichen Lymphozytensubpopulationen erst in Woche 10 und 11 einen signifikanten Anstieg im Vergleich zu den prae-OP Werten auf. Des Weiteren stellten sich in Woche 11 die absoluten "aktivierten" T-Zellen vermehrt dar (Abb. 15).

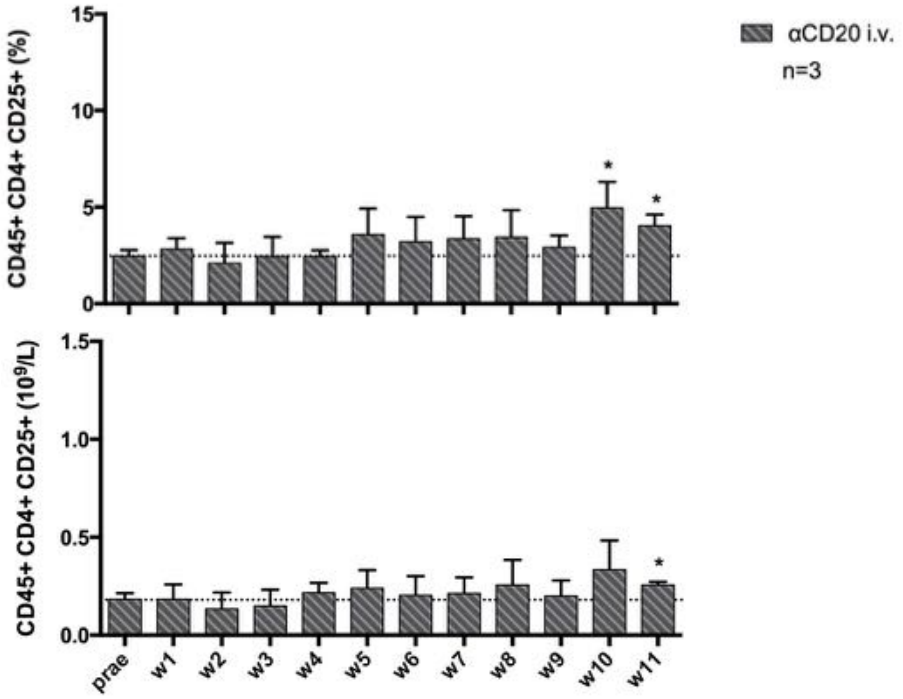


Abbildung 15: Verlauf der prozentualen und absoluten CD45+CD4+CD25+-Zellen im peripheren Blut "αCD20 i.v.". Versuchsgruppe „αCD20 i.v.“ (gestreifter Balken), w=Woche, Vgl. horizontale Linie Normalwert (*p<0,05).

3.3.9. CD4+FoxP3+: "Regulatorische T-Zellen"

Hinsichtlich der relativen sowie absoluten "regulatorischen" T-Zellanzahlen gab es bei der Versuchsgruppe "αCD20 i.v." über elf Wochen im Vergleich zu den prae-Injektionswerten keine signifikante Veränderungen.

3.4. Durchflusszytometrische Analysen der Lymphozyten des peripheren Bluts der transplantierten Gruppen

3.4.1. Gesamtlymphozyten

Die absoluten und relativen präoperativen Lymphozytenwerte entsprachen den Normalwerten und zeigten im Gruppenvergleich keine signifikanten Unterschiede.

Während die absoluten Lymphozytenanzahlen in den Versuchsgruppen "Iso" und "Allo αCD20 i.v" postoperativ über drei Wochen annähernd konstant blieben, stiegen sie bei der Versuchsgruppe "Allo Akut" von 8,2 10^9/L prae-OP auf 12,01 10^9/L in Woche 1 an ($p<0,001$).
Zwischen den Versuchsgruppen "Allo Akut" und "Allo αCD20 i.v" (6,67 10^9/L) ergab sich damit ein signifikanter Unterschied ($p<0,0001$, Abb. 16).

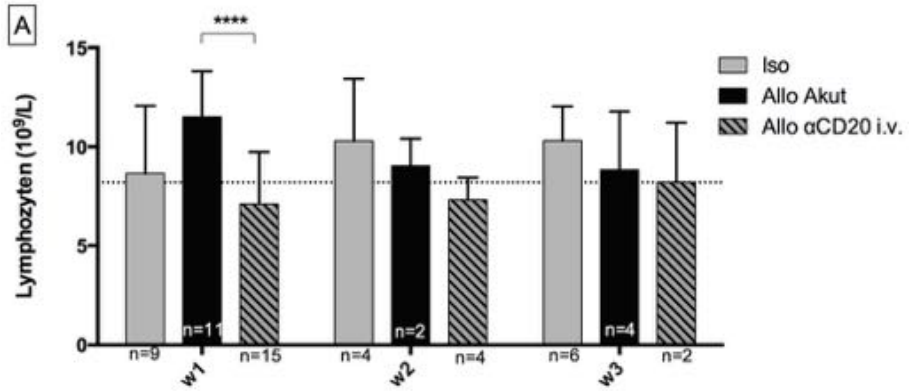


Abbildung 16: (A) Verlauf der absoluten Lymphozytenanzahl im peripheren Blut "Iso", "Allo Akut" und "Allo αCD20 i.v". Versuchsgruppe „Iso“ (hellgrauer Balken), Versuchsgruppe „Allo Akut“ (schwarzer Balken), Versuchsgruppe „Allo αCD20 i.v.“ (gestreifter Balken), w=Woche, Vgl. horizontale Linie Normalwert (****$p<0,0001$).

3.4.2. CD3+-Zellen: T-Lymphozyten

Die absoluten und relativen präoperativen T-Lymphozytenwerte entsprachen den Normalwerten und ergaben im Gruppenvergleich keine signifikanten Unterschiede. In der Versuchsgruppe "Allo αCD20 i.v" stieg die relative T-Lymphozytenanzahl in der 1. und 2. Woche postoperativ im Vergleich zu prae-OP an (w1: $p<0,001$; w2: $p<0,05$), welches zu einem signifikanten Unterschied im Vergleich zur Versuchsgruppe "Allo Akut" in Woche 1 führte ($p<0,0001$; Abb. 17A).

Die Versuchsgruppe "Iso" wies in Woche 2 (53,15 %) und 3 (55,71 %) im Vergleich zu prae-OP (61,64 %) leicht verringerte relative T-Lymphozytenwerte auf. Im Vergleich zur Versuchsgruppe "Allo Akut" waren diese ebenfalls leicht verringert. ($p<0,05$; Abb. 17A).

Die absoluten T-Lymphozytenzahlen zeigten, bis auf leichte Erhöhungen der absoluten Zellzahlen im Vergleich zu prae-OP (4,42 10^9/L) in Woche 1 (6,97 10^9/L) und 2 (5,94 10^9/L) in der Versuchsgruppe "Allo Akut" (Abb. 17B), weder im Vergleich zu den präoperativen Werten noch zwischen den Versuchsgruppen signifikante Unterschiede auf.

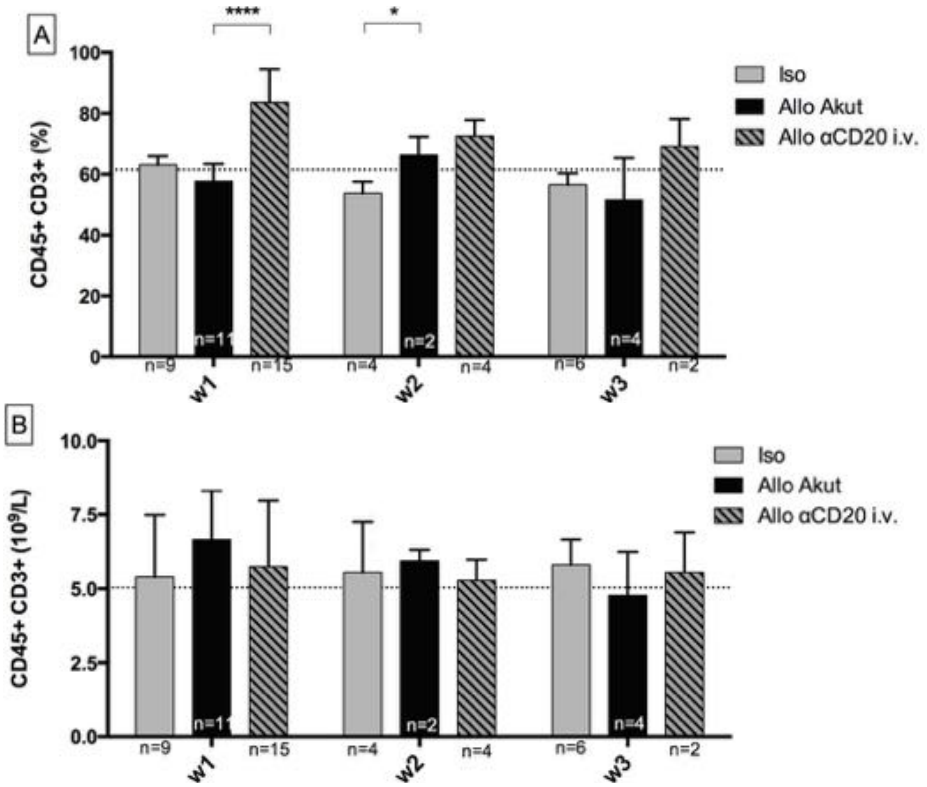


Abbildung 17: (A) Verlauf der prozentualen CD45+CD3+-Zellen im peripheren Blut "Iso", "Allo Akut" und "Allo αCD20 i.v" (B) Verlauf der absoluten CD45+CD3+-Zellen im peripheren Blut "Iso", "Allo Akut" und "Allo αCD20 i.v". Versuchsgruppe „Iso“ (hellgrauer Balken), Versuchsgruppe „Allo Akut“ (schwarzer Balken), Versuchsgruppe „Allo αCD20 i.v.“ (gestreifter Balken), w=Woche, Vgl. horizontale Linie Normalwert (*$p<0,05$; ****$p<0,0001$).

3.4.3. CD3+CD4+-Zellen: T-Helferzellen

Die Werte der relativen und absoluten präoperativen T-Helferzellen entsprachen den Normalwerten und ergaben im Gruppenvergleich keine signifikanten Unterschiede. In der Versuchsgruppe "Allo αCD20 i.v." stieg die T-Helferzellzahl analog zu den T-Lymphozyten in Woche 1 (62,15 %) und 2 (53,89 %), im Vergleich zu prae-OP (45,02 %) prozentual an. Da die Werte der Versuchsgruppe "Allo Akut" im Gegensatz dazu konstant blieben, ergab sich bezüglich der relativen Werte ein signifikanter Unterschied im Vergleich zu "Allo αCD20 i.v." ($p<0,0001$) (Abb. 18A).

In der Versuchsgruppe "Iso" reduzierte sich die relative Anzahl der T-Helferzellen in Woche 2 (39,62 %) und 3 (42,31 %) im Vergleich zu prae-OP (46,21 %) geringfügig. Der Gruppenvergleich zwischen "Iso" und "Allo Akut" zeigte jedoch keine Signifikanz.

Die absoluten T-Helferzellen in Woche 1 (5,22 10^9/L) und 3 (4,61 10^9/L) waren in "Allo Akut" (Abb. 18B) leicht vermehrt. Die restlichen Werte stellten sich im Vergleich zu den präoperativen Werten sowie zwischen den Versuchsgruppen ohne Signifikanzen dar.

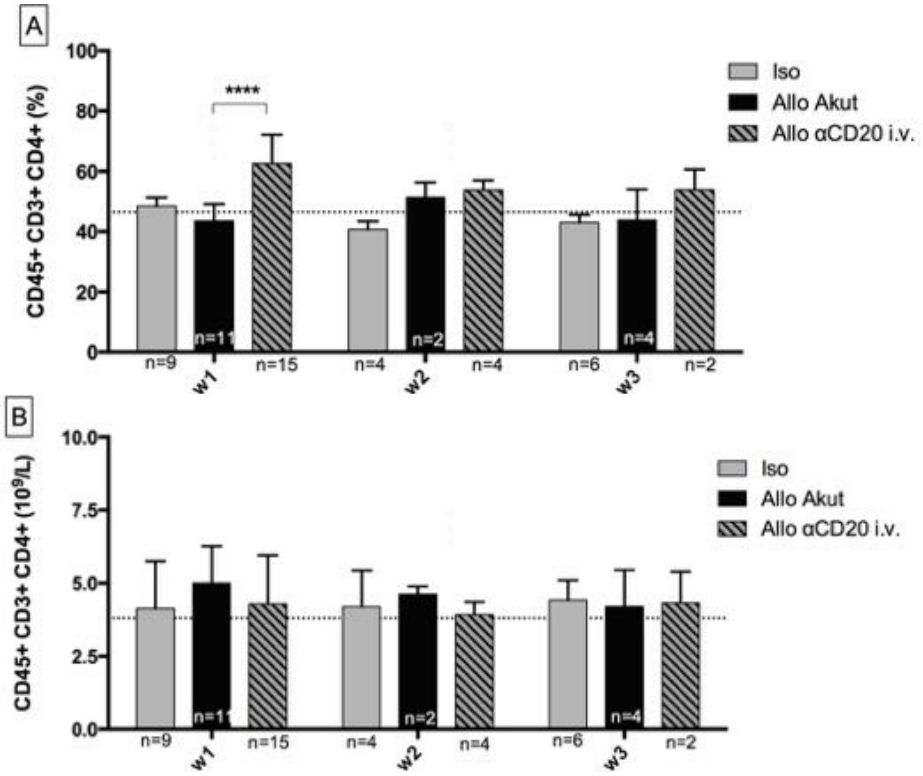


Abbildung 18: (A) Verlauf der prozentualen CD45+CD3+CD4+-Zellen im peripheren Blut "Iso", "Allo Akut" und "Allo αCD20 i.v", (D) Verlauf der absoluten CD45+CD3+CD4+-Zellen im peripheren Blut "Iso", "Allo Akut" und "Allo αCD20 i.v". Versuchsgruppe „Iso“ (hellgrauer Balken), Versuchsgruppe „Allo Akut“ (schwarzer Balken), Versuchsgruppe „Allo αCD20 i.v.“ (gestreifter Balken), w=Woche, Vgl. horizontale Linie Normalwert (****$p<0,0001$).

3.4.4. CD3+CD8+-Zellen: Zytotoxische T-Zellen

Die absoluten und relativen präoperativen Werte der zytotoxischen T-Zellen entsprachen den Normalwerten ergaben im Gruppenvergleich keine signifikanten Unterschiede.

In der Versuchsgruppe "Allo αCD20 i.v" stellten sich in Woche 1 (22,68 %) und 2 (19,56 %) im Vergleich zu prae-OP (15,46 %) geringe Erhöhungen der prozentualen Anzahl der zytotoxischen T-Zellen dar. Dies führte in Woche 1, aufgrund der konstant gebliebenen relativen Anzahl der zytotoxischen T-Zellen in Versuchsgruppe "Allo Akut" zu einem signifikanten Unterschied zwischen den Gruppen (Abb. 19A).

Die absoluten zytotoxischen T-Zellen zeigten in der Versuchsgruppe "Allo Akut" leichte Erhöhungen in Woche 1 (1,8 10^9/L) im Vergleich zu prae-OP (1,14 10^9/L). In den Versuchsgruppen "Iso" und "Allo αCD20 i.v." stellten sich im Vergleich zu den präoperativen Werten keine signifikanten Unterschiede dar. Zwischen den Versuchsgruppen ergaben sich keine signifikanten Veränderungen.

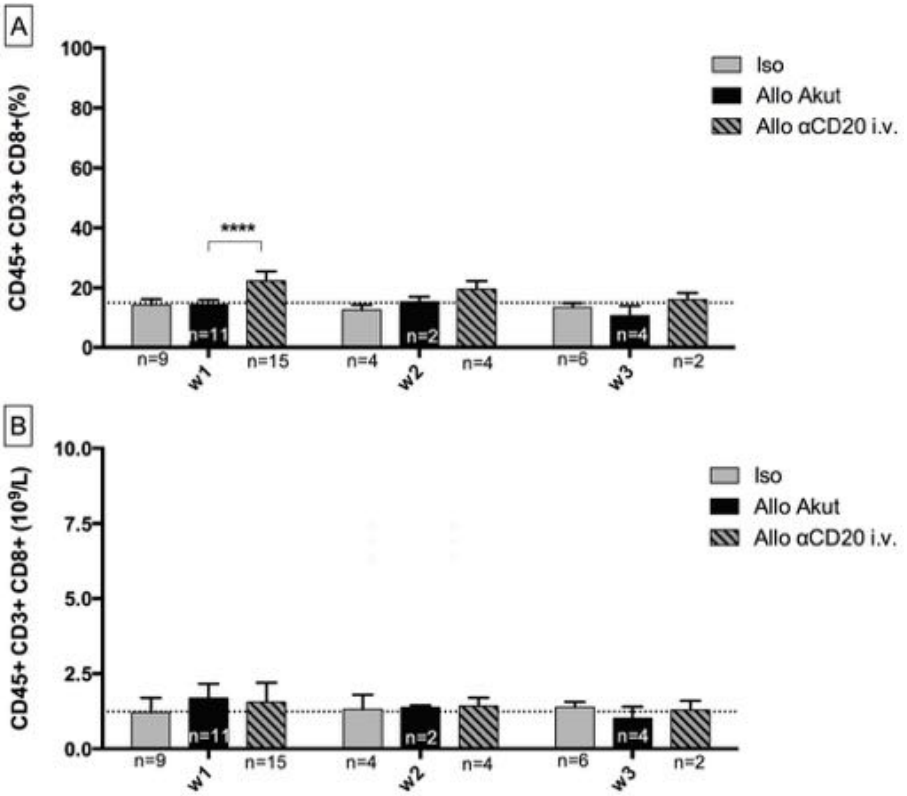


Abbildung 19: (A) Verlauf der prozentualen CD45+CD3+CD8+-Zellen im peripheren Blut "Iso", "Allo Akut" und "Allo αCD20 i.v" (B) Verlauf der absoluten CD45+CD3+CD8+-Zellen im peripheren Blut "Iso", "Allo Akut" und "Allo αCD20 i.v". Versuchsgruppe „Iso“ (hellgrauer Balken), Versuchsgruppe „Allo Akut“ (schwarzer Balken), Versuchsgruppe „Allo αCD20 i.v.“ (gestreifter Balken), w=Woche, Vgl. horizontale Linie Normalwert (****p<0,0001).

3.4.5. CD45RA+IgG+-Zellen: B-Zellen

Die relativen und absoluten Werte der präoperativen B-Zellen entsprachen den Normalwerten und ergaben im Gruppenvergleich keinen signifikanten Unterschied.

In der Versuchsgruppe "Allo αCD20 i.v" fiel die relative sowie die absolute Anzahl der peripheren B-Zellen von präoperativ 24,9 % ≙ 2,09 10^9/L auf 0,47 % ≙ 0,04 10^9/L in Woche 1 ($p<0,0001$). Die Werte blieben weiterhin bis Woche 3 unter 1,66% ≙ 0,17 10^9/L ($p<0,01$) (Abb. 20A).

In der Versuchsgruppe "Allo Akut" vollzog sich eine leichte Zunahme der absoluten B-Zellanzahl in Woche 1 (prae-OP 1,82 10^9/L; post-OP 2,94 10^9/L; $p<0,001$, Abb. 20B), welches sich in Woche 2 und 3 wieder normalisierte, während die prozentuale Anzahl über die 3 Wochen im Vergleich zum prae-OP-Wert nicht signifikant unterschiedlich war. Dadurch ergab sich im Gruppenvergleich ein hochsignifikanter Unterschied bezüglich der relativen und absoluten B-Zellzahl zwischen den Versuchsgruppen "Allo Akut" und "Allo αCD20 i.v." in Woche 1 bis 3 ($p<0,0001$).

Obwohl die relativen longitudinalen B-Zellwerte der Versuchsgruppen "Iso" und "Allo Akut" keine Unterschiede zu den Normalwerten ergaben, stellte sich in Woche 2 ein signifikanter Unterschied zwischen den Gruppen dar ($p<0,01$, Abb20A).

In der Versuchsgruppe 2 "Iso" zeigten die relativen sowie absoluten Werte im Vergleich zu prae-OP keine Veränderungen.

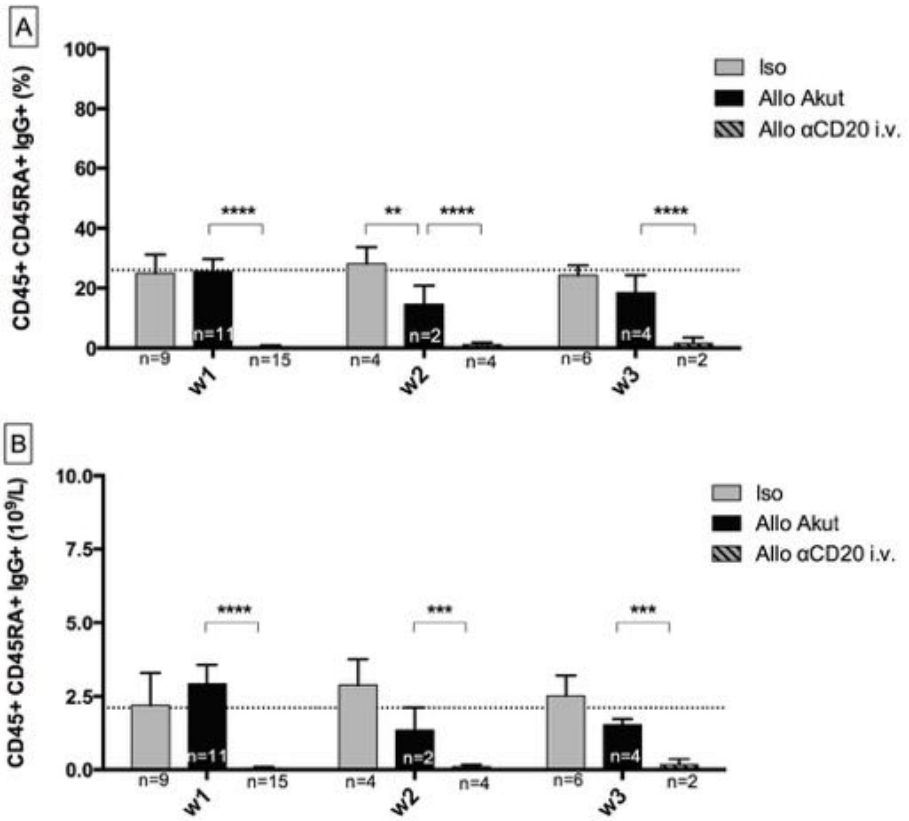


Abbildung 20: (A) Verlauf der prozentualen CD45+CD45RA+IgG+-Zellen im peripheren Blut "Iso", "Allo Akut" und "Allo αCD20 i.v" (B) Verlauf der absoluten CD45+CD45RA+IgG+-Zellen im peripheren Blut "Iso", "Allo Akut" und "Allo αCD20 i.v". Versuchsgruppe „Iso“ (hellgrauer Balken), Versuchsgruppe „Allo Akut“ (schwarzer Balken), Versuchsgruppe „Allo αCD20 i.v.“ (gestreifter Balken), w=Woche, Vgl. horizontale Linie Normalwert (**p<0,01; ***p<0,001 ****p<0,0001).

3.4.6. CD3+CD161+-Zellen: NKT-Zellen

Die absoluten und relativen Werte der präoperativen B-Zellen entsprachen den Normalwerten und ergaben im Gruppenvergleich keine signifikanten Unterschiede.

In Woche 1 zeigte sich in den Versuchsgruppen "Allo Akut" ($p<0,01$) und "Allo αCD20 i.v." ($p<0,0001$) bezüglich der prozentualen NKT-Zellen verglichen zu den prae-Werten ein signifikanter Unterschied.

Die absoluten NKT-Zellen blieben in allen drei Versuchsgruppen über die drei Wochen konstant und ergaben keine signifikanten Unterschiede im Vergleich zu den Normalwerten.

Im Gruppenvergleich der relativen Werte führte dies in Woche 1 zu einer Signifikanz zwischen "Iso" und "Allo Akut" ($p<0,01$) sowie "Allo Akut" und "Allo αCD20 i.v." ($p<0,0001$; Abb 21A).

Die absoluten NKT Zellen zeigten sich in Woche 1 in "Allo Akut" verglichen zu "Iso" signifikant erhöht ($p<0,001$; Abb 21B).

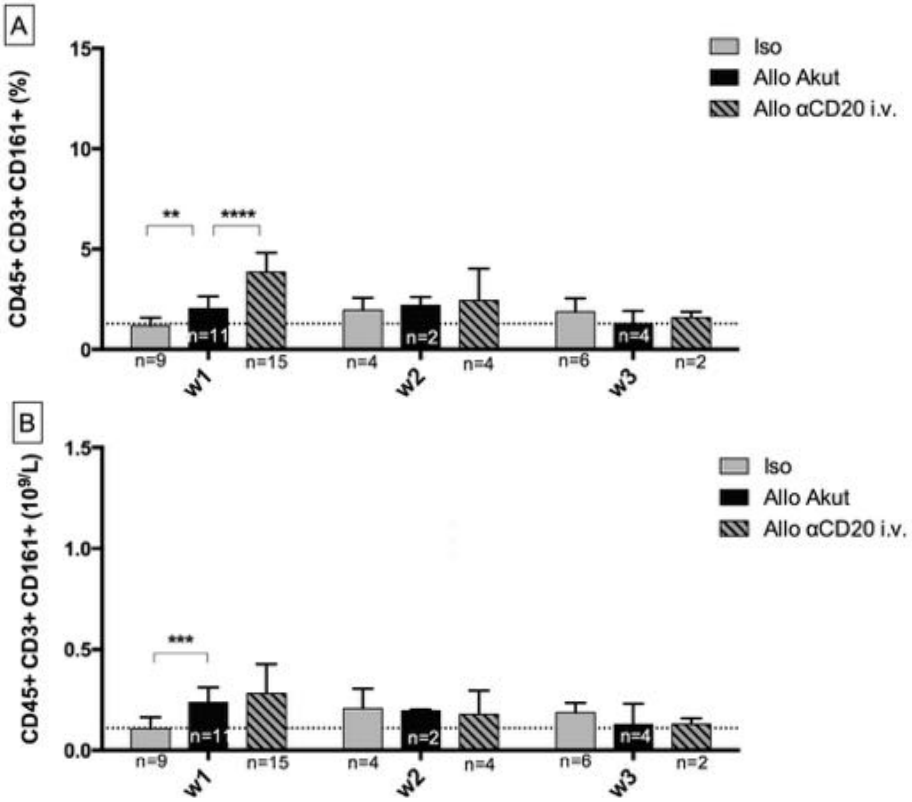


Abbildung 21: (A) Verlauf der prozentualen CD45+CD3+CD161+-Zellen im peripheren Blut "Iso", "Allo Akut" und "Allo αCD20 i.v" (B) Verlauf der absoluten CD45+CD3+CD161+-Zellen im peripheren Blut "Iso", "Allo Akut" und "Allo αCD20 i.v". Versuchsgruppe „Iso“ (hellgrauer Balken), Versuchsgruppe „Allo Akut“ (schwarzer Balken), Versuchsgruppe „Allo αCD20 i.v.“ (gestreifter Balken), w=Woche, Vgl. horizontale Linie Normalwert (**$p<0,01$; ***$p<0,001$ ****$p<0,0001$).

3.4.7. CD3–CD161^{high+}Zellen: NK-Zellen

Die absoluten und relativen präoperativen NK-Zellen entsprachen den Normalwerten und ergaben im Gruppenvergleich keine signifikanten Unterschiede.

Die relative NK-Zellzahl war in Woche 1 in den Versuchsgruppen "Allo Akut" ($p<0,05$) und "Allo αCD20 i.v." ($p<0,01$) und in Woche 3 in den Versuchsgruppen "Iso" ($p<0,05$) und "Allo αCD20 i.v." ($p<0,01$) gegenüber prae-OP signifikant erhöht.

Die absolute NK-Zellzahl ergab im Vergleich zu prae-OP keine signifikanten Veränderungen.

Im Gruppenvergleich ergab sich dadurch bei den relativen ($p<0,01$) sowie absoluten ($p<0,001$) NK-Zellen in Woche 1 ein signifikanter Unterschied zwischen "Iso" und "Allo Akut".

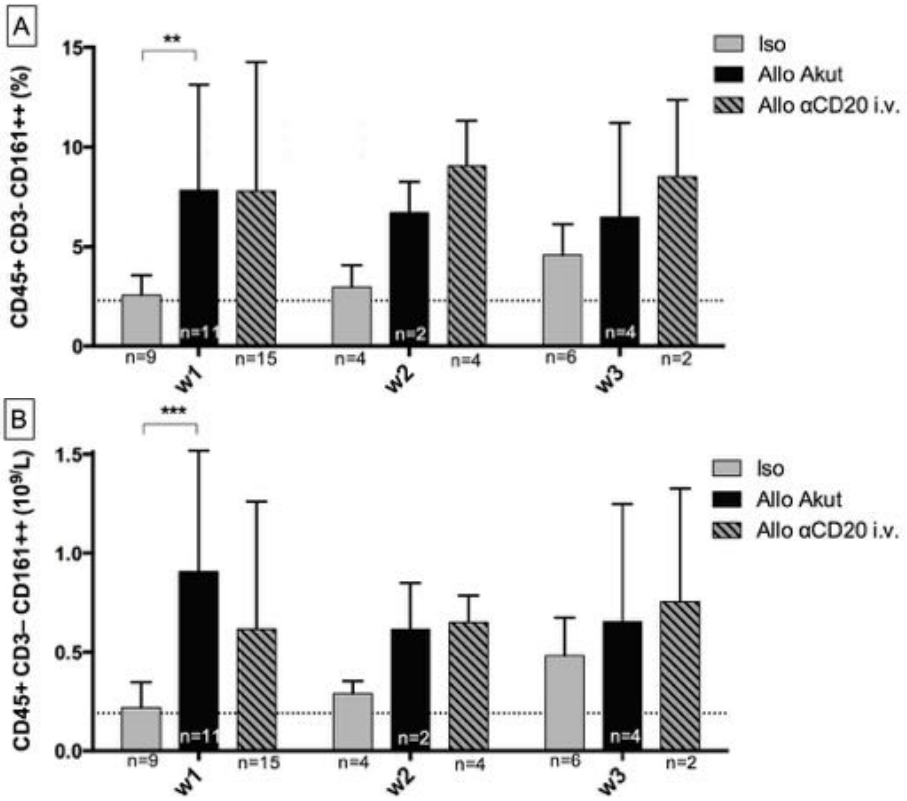


Abbildung 22: (A) Verlauf der prozentualen CD45+CD3–CD161++-Zellen im peripheren Blut "Iso", "Allo Akut" und "Allo αCD20 i.v" (B) Verlauf der absoluten CD45+CD3–CD161++-Zellen im peripheren Blut "Iso", "Allo Akut" und "Allo αCD20 i.v". Versuchsgruppe „Iso“ (hellgrauer Balken), Versuchsgruppe „Allo Akut“ (schwarzer Balken), Versuchsgruppe „Allo αCD20 i.v.“ (gestreifter Balken), w=Woche, Vgl. horizontale Linie Normalwert (**$p<0,01$; ***$p<0,001$).

3.4.8. CD4+CD25+-Zellen: "Aktivierte T-Zellen"

Die absoluten und relativen Werte der präoperativen aktivierten T-Zellen entsprachen den Normalwerten und ergaben im Gruppenvergleich keine signifikanten Unterschiede.

Die relativen aktivierten T-Zellzahlen waren in Woche 1 in den Versuchsgruppen "Iso" ($p<0,05$) sowie "Allo αCD20 i.v." ($p<0,01$) gegenüber prae-OP signifikant erhöht. In Woche 2 stiegen die relativen aktivierten T-Zellen ebenfalls in den Versuchsgruppen "Allo Akut" ($p<0,05$) und "Allo αCD20 i.v." ($p<0,001$) signifikant an.

In Woche 3 ergab sich weiterhin auch eine signifikante Erhöhung in der Versuchsgruppe "Allo αCD20 i.v." ($p<0,001$).

Die absoluten aktivierten T-Zellanzahlen ergaben keine signifikanten Unterschiede im Vergleich zu prae-OP.

Im Gruppenvergleich ergab sich bei den relativen aktivierten T-Zellanzahlen in Woche 1 ein signifikanter Unterschied zwischen "Allo Akut" und "Allo αCD20 i.v." ($p<0,001$). Absolut zeigten sich zwischen den Gruppen keine Veränderungen.

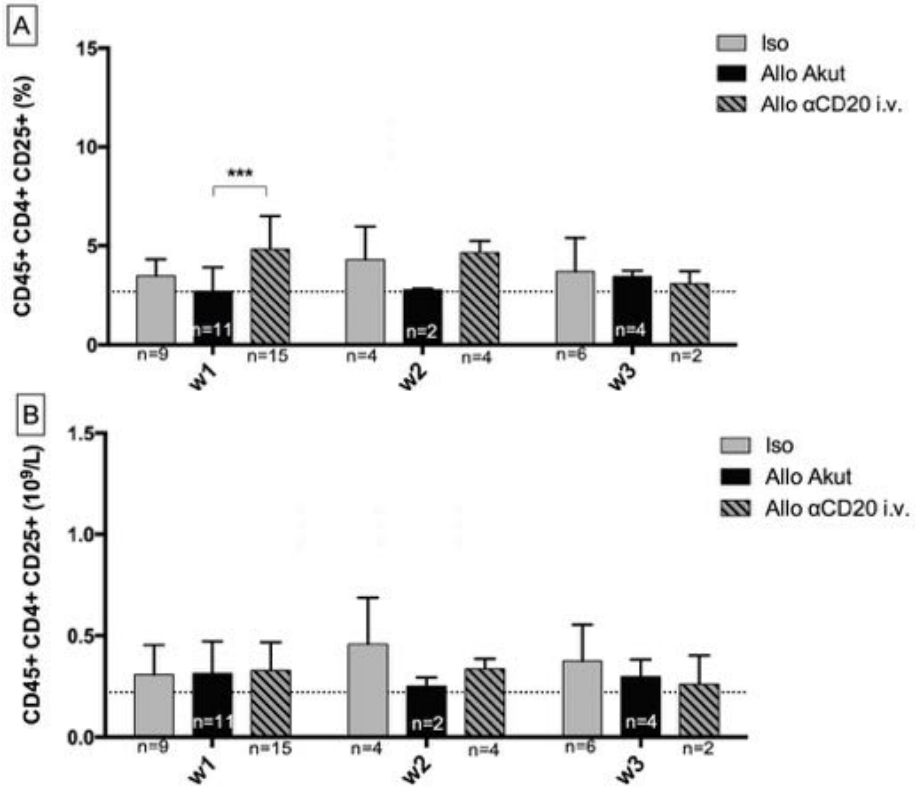


Abbildung 23: (A) Verlauf der prozentualen CD45+CD4+CD25+-Zellen im peripheren Blut "Iso", "Allo Akut" und "Allo αCD20 i.v" (B) Verlauf der absoluten CD45+CD4+CD25+-Zellen im peripheren Blut "Iso", "Allo Akut" und "Allo αCD20 i.v". Versuchsgruppe „Iso“ (hellgrauer Balken), Versuchsgruppe „Allo Akut“ (schwarzer Balken), Versuchsgruppe „Allo αCD20 i.v.“ (gestreifter Balken), w=Woche, Vgl. horizontale Linie Normalwert (***$p<0,001$).

3.4.9. CD4+FoxP3+-Zellen: "Regulatorische T-Zellen"

Die absoluten und relativen Werte der präoperativen regulatorischen T-Zellen entsprachen den Normalwerten und ergaben im Gruppenvergleich keine signifikanten Unterschiede.

Die relativen regulatorischen T-Zellzahlen stiegen in Woche 1 in der "Allo αCD20 i.v." ($p<0,05$) gegenüber prae-OP signifikant an. In der Versuchsgruppe "Allo Akut" waren die relativen aktivierten T-Zellen in Woche 2 ebenfalls signifikant erhöht ($p<0,05$).

In der Gruppe "Allo Akut" ergaben die absoluten regulatorischen T-Zellzahlen einen signifikanten Unterschied in Woche 2 im Vergleich zu prae-OP ($p<0,05$).

Im Gruppenvergleich zeigte sich in Woche 1 eine signifikante Erhöhung der relativen regulatorischen T-Zellzahl zwischen "Allo Akut" und "Allo αCD20 i.v." ($p<0,01$). Absolut zeigten sich zwischen den Gruppen keine Unterschiede.

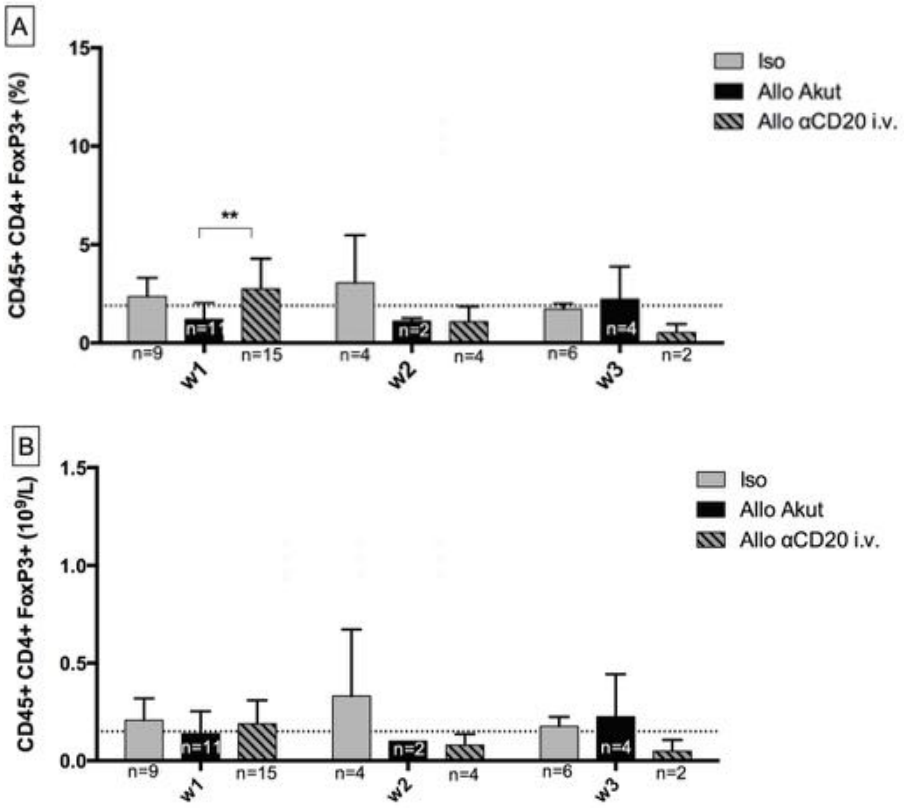


Abbildung 24: (A) Verlauf der prozentualen CD45+CD4+FoxP3+-Zellen im peripheren Blut "Iso", "Allo Akut" und "Allo αCD20 i.v" (B) Verlauf der absoluten CD45+CD4+FoxP3+-Zellen im peripheren Blut "Iso", "Allo Akut" und "Allo αCD20 i.v". Versuchsgruppe „Iso“ (hellgrauer Balken), Versuchsgruppe „Allo Akut“ (schwarzer Balken), Versuchsgruppe „Allo αCD20 i.v.“ (gestreifter Balken), w=Woche, Vgl. horizontale Linie Normalwert (**$p<0,01$).

3.5. Durchflusszytometrische Analysen der Lymphozyten der lymphatischen Organe

3.5.1. CD3+-Zellen: T-Lymphozyten

Die durchflusszytometrischen Analysen der lymphatischen Organe entsprechen den Analysen des peripheren Bluts: In den Lymphknoten und der Milz konnten prozentual in Versuchsgruppe "Allo αCD20 i.v." mehr T-Zellen als in der Versuchsgruppe "Allo Akut" detektiert werden (p<0,0001). Zwischen der Versuchsgruppe "Iso" und "Allo Akut" konnte in den Lymphknoten, der Milz und dem Knochenmark kein Unterschied gezeigt werden. Im Knochenmark zeigten sich in allen drei Versuchsgruppen verglichen zur Milz und den Lymphknoten relativ wenig Zellen. Im Knochenmark konnte zwischen den Versuchsgruppen kein signifikanter Unterschied festgestellt werden.

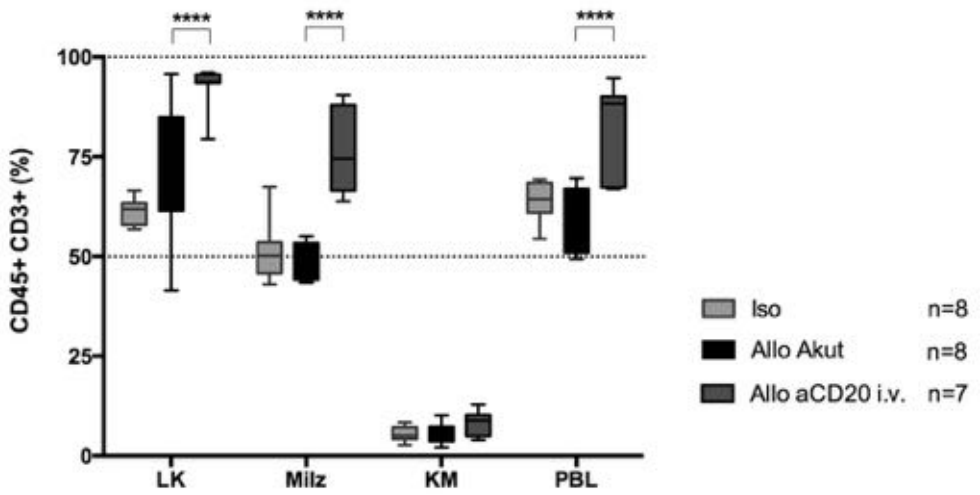


Abbildung 25: Verlauf der prozentualen CD45+CD3+-Zellen der lymphatischen Organe. LK=Lymphknoten, Milz, KM=Knochenmark in "Iso", "Allo Akut" und "Allo αCD20 i.v" zum Zeitpunkt des Todes. Versuchsgruppe „Iso“ (hellgrauer Boxplot), Versuchsgruppe „Allo Akut“ (schwarzer Boxplot), Versuchsgruppe „Allo αCD20 i.v.“ (dunkelgrauer Boxplot), w=Woche, (****p<0,0001), PBL: peripheres Blut.

3.5.2. CD3+CD4+-Zellen: T-Helferzellen

Die Analysen der T-Helferzellen der lymphatischen Organe entsprechen den Analysen des peripheren Bluts: In den Lymphknoten und Milz konnten in der Versuchsgruppe "Allo αCD20 i.v." prozentual mehr T-Helferzellen detektiert werden als in der Versuchsgruppe "Allo Akut" (p<0,001). Die T-Helferzellen in den Lymphknoten, der Milz und dem Knochenmark zeigten zwischen der Versuchsgruppe "Iso" und "Allo Akut" keine Unterschiede. Auch im Knochenmark konnten in allen drei Versuchsgruppen im Vergleich zur Milz und den Lymphknoten relativ wenig Zellen gefunden werden. Im Knochenmark konnte zwischen den Versuchsgruppen kein signifikanter Unterschied festgestellt werden.

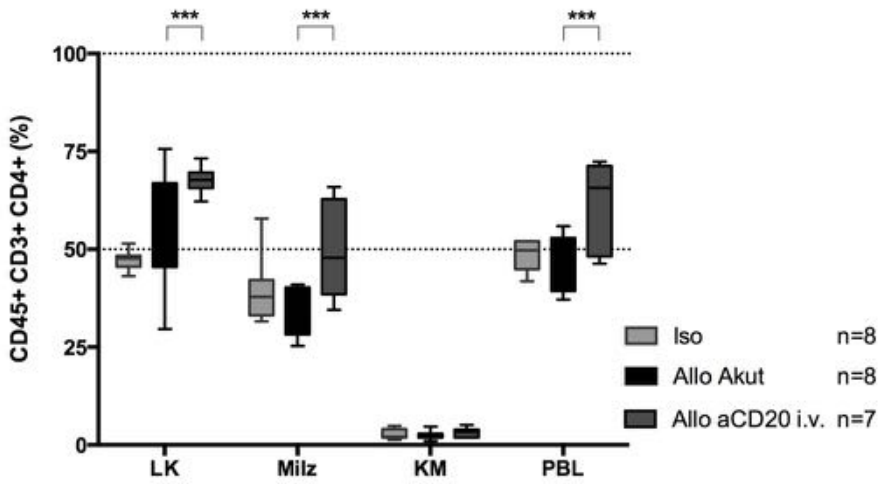


Abbildung 26: Verlauf der prozentualen CD45+CD3+CD4+-Zellen der lymphatischen Organe. LK=Lymphknoten, Milz, KM=Knochenmark in "Iso", "Allo Akut" und "Allo αCD20 i.v" zum Zeitpunkt des Todes. Versuchsgruppe „Iso“ (hellgrauer Boxplot), Versuchsgruppe „Allo Akut“ (schwarzer Boxplot), Versuchsgruppe „Allo αCD20 i.v.“ (dunkelgrauer Boxplot), w=Woche, (***p<0,001), PBL: peripheres Blut.

3.5.3. CD3+CD8+-Zellen: Zytotoxische T-Zellen

Die Analysen der zytotoxischen T-Zellen der lymphatischen Organe entsprechen ebenfalls den Analysen des peripheren Bluts: Die Lymphknoten und die Milz der Versuchsgruppe "Allo αCD20 i.v." wiesen relativ mehr T-Helferzellen auf verglichen zur Versuchsgruppe "Allo Akut" (p<0,0001). Zwischen der Versuchsgruppe "Iso" und "Allo Akut" konnte in den Lymphknoten, der Milz und dem Knochenmark kein Unterschied gezeigt werden. Im Knochenmark konnten in allen drei Versuchsgruppen verglichen zur Milz und den Lymphknoten relativ wenig Zellen gezählt werden. Im Knochenmark konnte zwischen den Versuchsgruppen kein signifikanter Unterschied festgestellt werden.

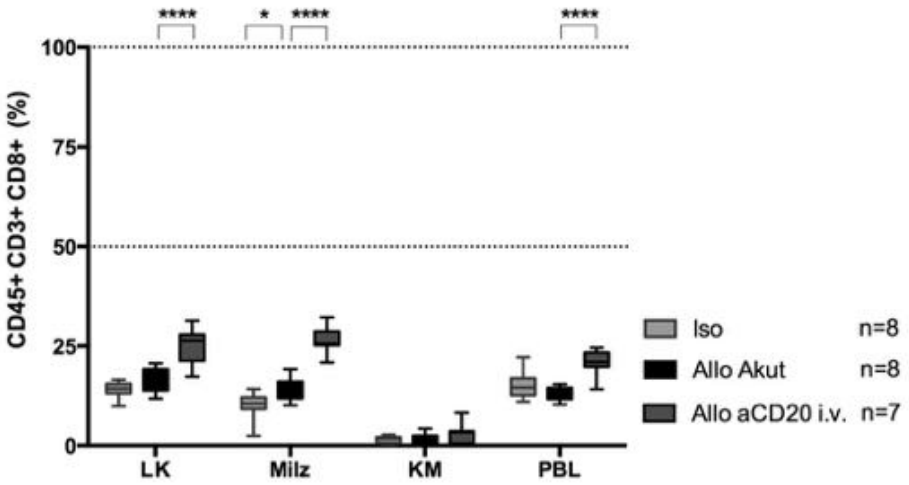


Abbildung 27: Verlauf der prozentualen CD45+CD3+CD8+-Zellen der lymphatischen Organe. LK=Lymphknoten, Milz, KM=Knochenmark in "Iso", "Allo Akut" und "Allo αCD20 i.v" zum Zeitpunkt des Todes. Versuchsgruppe „Iso“ (hellgrauer Boxplot), Versuchsgruppe „Allo Akut“ (schwarzer Boxplot), Versuchsgruppe „Allo αCD20 i.v.“ (dunkelgrauer Boxplot), w=Woche, (*p<0,05;****p<0,0001), PBL: peripheres Blut.

3.5.4. CD45RA+IgG+-Zellen: B-Zellen

Die Auswertungen der B-Zellen der lymphatischen Organe entsprechen denen des peripheren Bluts: in den Lymphknoten und der Milz zeigten sich in Versuchsgruppe "Allo αCD20 i.v." die relativen B-Zellen ebenfalls geringer gegenüber der Versuchsgruppe "Allo Akut" (p<0,001). Zwischen der Versuchsgruppe "Iso" und "Allo Akut" konnte in den Lymphknoten, der Milz und dem Knochenmark kein Unterschied gezeigt werden. Im Knochenmark allen drei Versuchsgruppen konnten in Vergleich zur Milz und den Lymphknoten relativ wenig Zellen detektiert werden. Im Knochenmark konnte zwischen den Versuchsgruppen kein signifikanter Unterschied gezeigt werden.

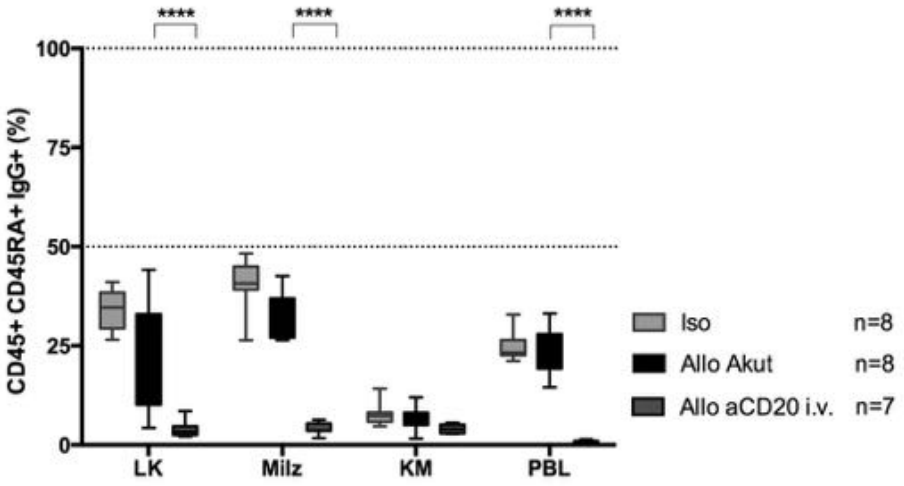


Abbildung 28: Verlauf der prozentualen CD45+CD45RA+IgG+-Zellen der lymphatischen Organe. LK=Lymphknoten, Milz, KM=Knochenmark in "Iso", "Allo Akut" und "Allo αCD20 i.v" zum Zeitpunkt des Todes. Versuchsgruppe „Iso“ (hellgrauer Boxplot), Versuchsgruppe „Allo Akut“ (schwarzer Boxplot), Versuchsgruppe „Allo αCD20 i.v.“ (dunkelgrauer Boxplot), w=Woche, (****p<0,0001), PBL: peripheres Blut.

3.5.5. CD3+CD161+-Zellen: NKT-Zellen

Im Blut zeigten die relativen Werte der NKT-Zellen im Gruppenvergleich keine Unterschiede. Die Analysen des Knochenmark wie auch der Lymphknoten zeigten hierzu analoge Ergebnisse.

In der Milz hingegen konnte ein signifikanter Anstieg der NKT-Zellen in der Versuchsgruppe "Allo αCD20 i.v." gegenüber "Allo Akut" beobachtet werden (p<0,0001).

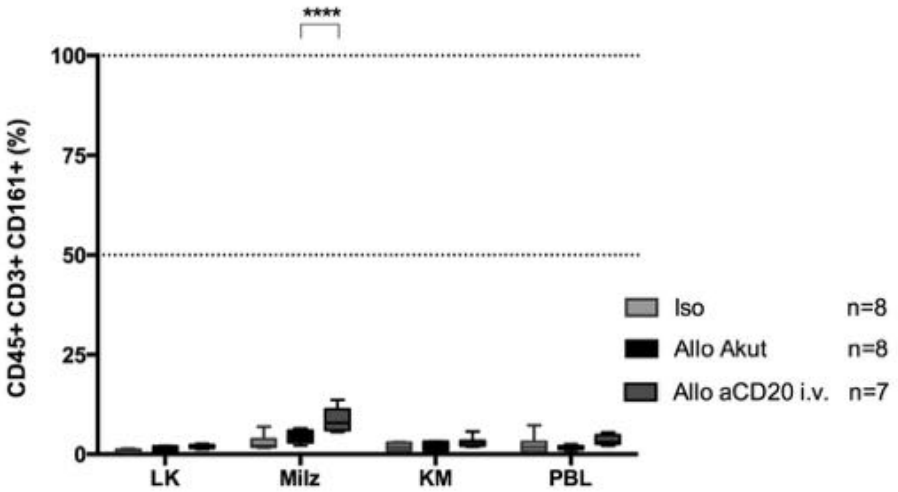


Abbildung 29: Verlauf der prozentualen CD45+CD3+CD161+-Zellen der lymphatischen Organe. LK=Lymphknoten, Milz, KM=Knochenmark in "Iso", "Allo Akut" und "Allo αCD20 i.v" zum Zeitpunkt des Todes. Versuchsgruppe „Iso“ (hellgrauer Boxplot), Versuchsgruppe „Allo Akut“ (schwarzer Boxplot), Versuchsgruppe „Allo αCD20 i.v.“ (dunkelgrauer Boxplot), w=Woche, (****p<0,0001), PBL: peripheres Blut.

3.5.6. CD3–CD161^{high+}Zellen: NK-Zellen

Im peripheren Blut zeigten die relativen NK-Zellzahlen im Gruppenvergleich keine Unterschiede. Dies spiegelte sich auch in den Analysen der Milz-, Knochenmarks- und Lymphknotenlymphozyten wider.

3.6. Pathologische Beurteilung der NTx-Nieren

Die am 7. Tag geplant getöteten Versuchstiere wurden pathologisch beurteilt:

4 von 4 Versuchstieren der Versuchsgruppe "Allo Akut" wiesen eine Tubulitis wie auch eine peritubuläre Kapillaritis auf. Nach den Banff-Kriterien hatten somit 4 von 4 Versuchstieren eine akute Antikörper vermittelte Abstoßung. Eins von 4 Versuchstieren zeigte zusätzlich interstitielle Zellinfiltrationen und eine intimale Arteriitis. Das Versuchstier hatte folglich nach Banff Kriterien eine T-Zell-vermittelte Abstoßung. Durch die fehlende interstitielle Infiltration wie auch fehlende intimale Arteriitis wurden die restlichen 3 von 4 Transplantate der Versuchstiere als sogenannte „Borderline“ Veränderungen eingestuft.

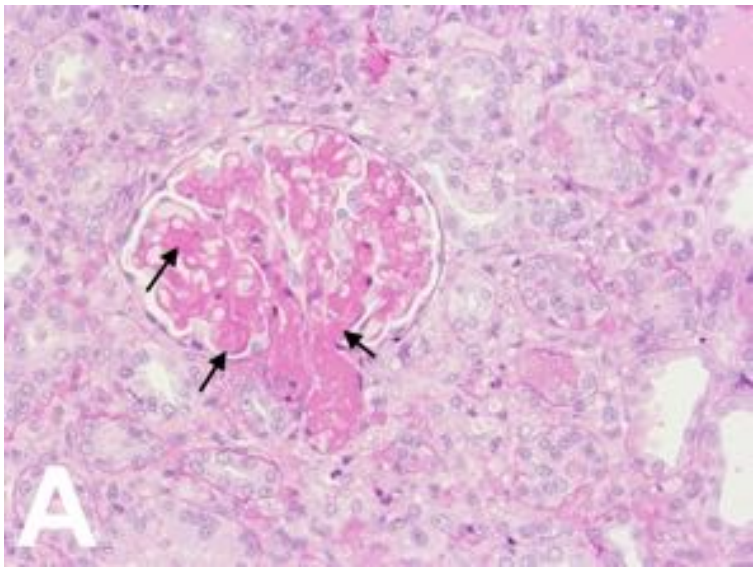
5 von 5 Nierentransplantate der Versuchstieren der Versuchsgruppe "Allo αCD20 i.v." wiesen eine Tubulitis und eine peritubuläre Kapillaritis auf. Bei 4 von 5 Versuchstieren lagen interstitielle Infiltrationen vor. Ein Versuchstier hiervon zeigte zusätzlich eine intimale Arteriitis. Somit hatten 5 von 5 Versuchstieren eine Antikörper vermittelte Abstoßung, 4 von 5 Versuchstieren eine T-Zell-vermittelte Abstoßung und 1 von 5 Versuchstieren „Borderline“ Veränderungen.

Die Transplantate der an Tag 7 geplant getöteten isotransplantierten Versuchstiere wiesen keinerlei pathologischer Veränderungen auf.

Tabelle 5: **Transplantatpathologie Allo Akut + Allo aCD20 i.v. d7**

	t	i	v	ptc	
Allo Akut 1	x	x	x	x	TMR + AMR
Allo Akut 2	x			x	Borderline + AMR
Allo Akut 3	x			x	Borderline + AMR
Allo Akut 4	x			x	Borderline + AMR
Allo aC20 i.v. 1	x	x	x	x	TMR + AMR
Allo aC20 i.v. 2	x	x		x	TMR + AMR
Allo aC20 i.v. 3	x	x		x	TMR + AMR
Allo aC20 i.v. 4	x	x		x	TMR + AMR
Allo aC20 i.v. 5	x			x	Borderline + AMR

t= Tubulitis, i=interstitielle Infiltration, v= intimale Arteriitis, ptc= peritubuläre Kapillaritis
TMR= T-Zell vermittelte Abstoßung, AMR= Antikörper vermittelte Abstoßung



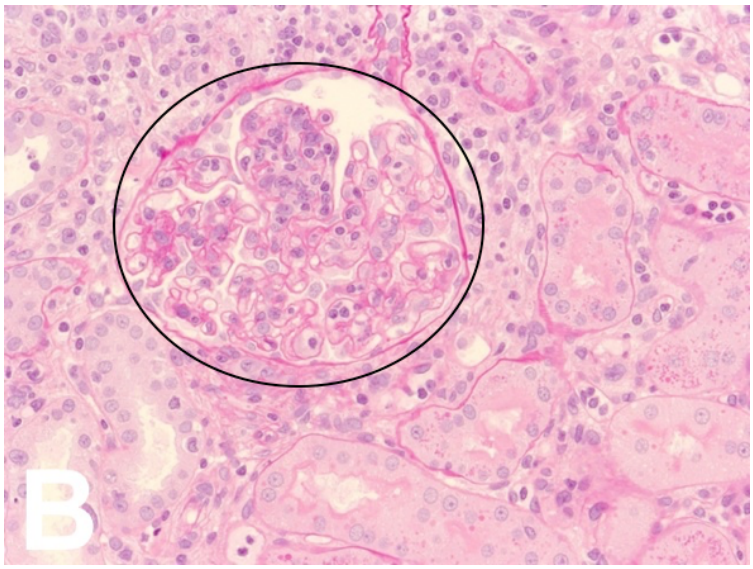


Abbildung 30: Humorale Abstoßung der NTx-Nieren in "Allo αCD20 i.v."

(A) d21: Präglomeruläre und glomeruläre thrombotische Mikroangiopathie

(B) d7: Glomerulitis und fokale Kapillaritis

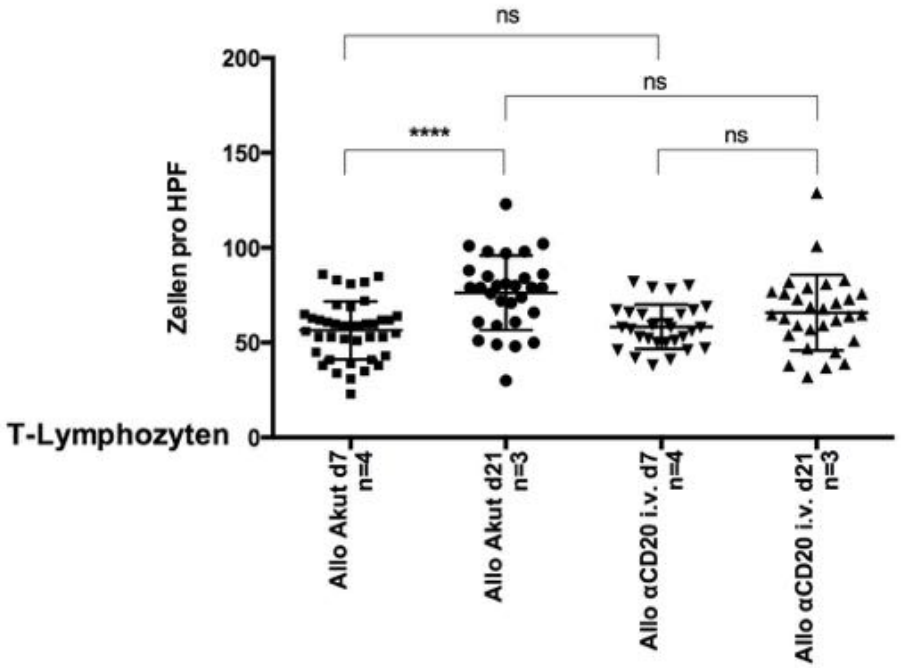
200x
PAS

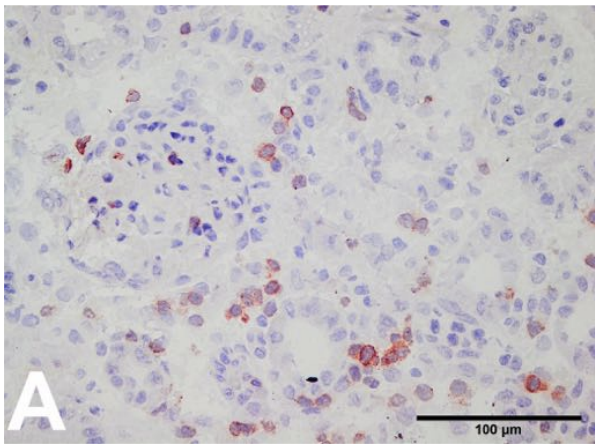
3.7. Immunhistochemische Analyse der Nierentransplantate

3.7.1. Transplantatinfiltrierende T-Zellen

In den Transplantaten der Versuchsgruppe "Allo Akut" zeigten sich an Tag 21 gegenüber Tag 7 eine vermehrte T-Zell-Infiltration ($p<0,0001$). In der Versuchsgruppe "Allo αCD20 i.v." gab es keinen Unterschied zwischen Tag 7 und 21. Zwischen den Versuchsgruppen stellte sich keine signifikanten Unterschiede dar.

Abbildung 31:
T-Lymphozyteninfiltrate der NTx-Niere in "Allo Akut" und "Allo αCD20 i.v":
d = Tag
n = Anzahl der Versuchstiere
HPF = Hauptgesichtsfeld
ns = Keine Signifikanz
**p<0,01
****p<0,0001





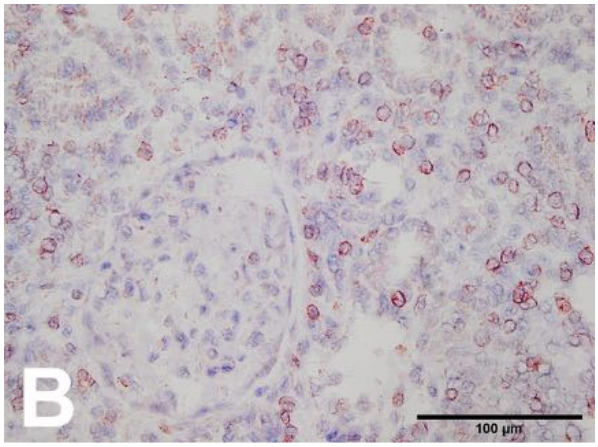


Abbildung 32: T-Zellinfiltrate der NTx-Niere in "Allo Akut"
(A) d7
(B) d21

An Tag 21 (B) lassen sich mehr T-Zellen in „Allo Akut“ färben als an Tag 21 (B).

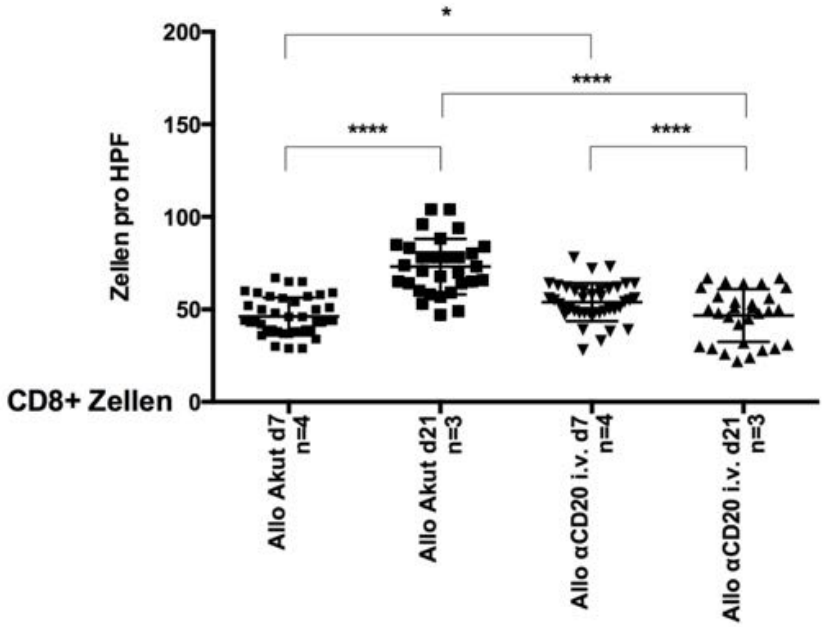
400x
R73 1:5000
RAM 1:20 mit 1:50 NRS

3.7.2. Transplantatinfiltrierende CD8+-Zellen

In der Versuchsgruppe "Allo Akut" zeigten sich an Tag 21 mehr CD8+-Zellen im Transplantat als an Tag 7 (p<0,0001). In der der Versuchsgruppe "Allo αCD20 i.v." konnten an Tag 7 ebenfalls mehr CD8+-Zellen detektiert werden als an Tag 21 (p<0,0001).

Zwischen den Versuchsgruppen ergab sich an Tag 7 sowie an Tag 21 ein signifikanter Unterschied: Während sich an Tag 7 in der Versuchsgruppe "Allo αCD20 i.v." mehr CD8+-Zellen gegenüber der Gruppe "Allo Akut" zeigten (p<0,05), zeigte sich an Tag 21 weniger CD8+Zellen in den Transplantaten der Gruppe "Allo αCD20 i.v." als in den Transplantaten der Gruppe „Allo Akut". (p<0,0001).

Abbildung 33: CD8+– Zellinfiltrate der NTx-Niere in "Allo Akut" und "Allo αCD20 i.v":
d = Tag
n = Anzahl der Versuchstiere
HPF = Hauptgesichtsfeld
ns = Keine Signifikanz
*p<0,05
****p<0,0001



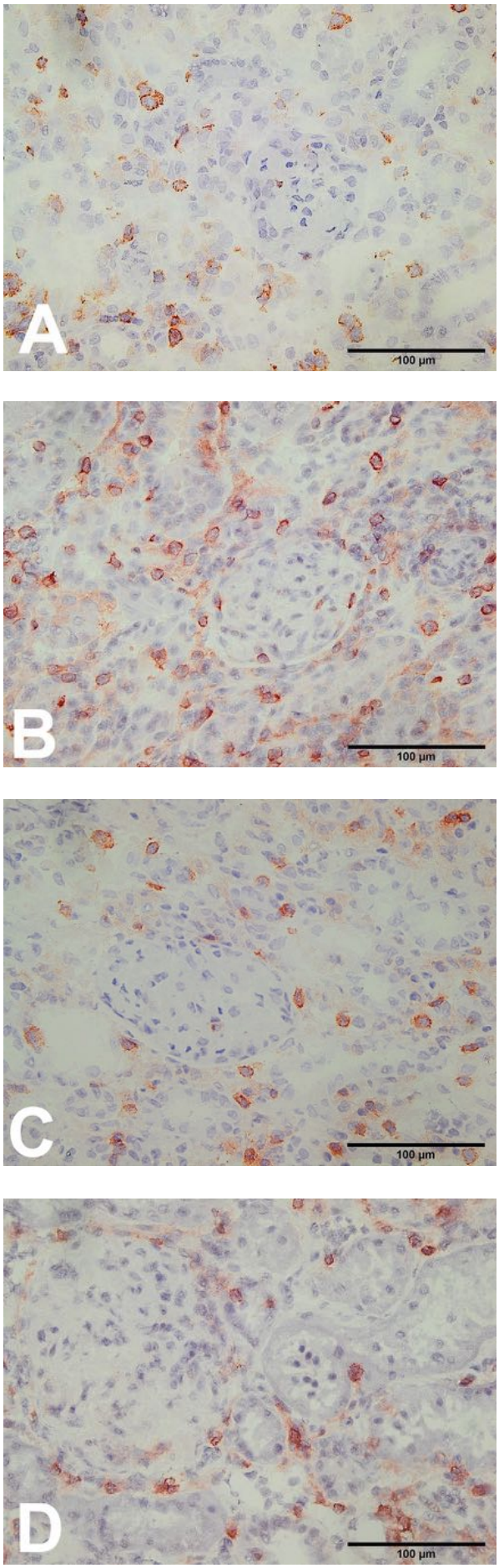


Abbildung 34:
CD8+–Zellinfiltrate der NTx-Niere in

"Allo Akut"
(A) d7
(B) d21
In "Allo Akut" zeigte sich an Tag 21 mehr CD8+ Zellen als an Tag 7.

"Allo αCD20 i.v."
(C) d7
(D) d21

In "Allo αCD20 i.v." waren an Tag 21 wenigerCD8+ Zellen zu detektieren als an Tag 7.

"Allo αCD20 i.v." zeigte an Tag 7 (C) mehr CD8+ Zellen als "Allo Akut" (A). An Tag 21 konnten in "Allo αCD20 i.v“ (D) weniger Zellen detektiert werden als in „Allo Akut“ (B).

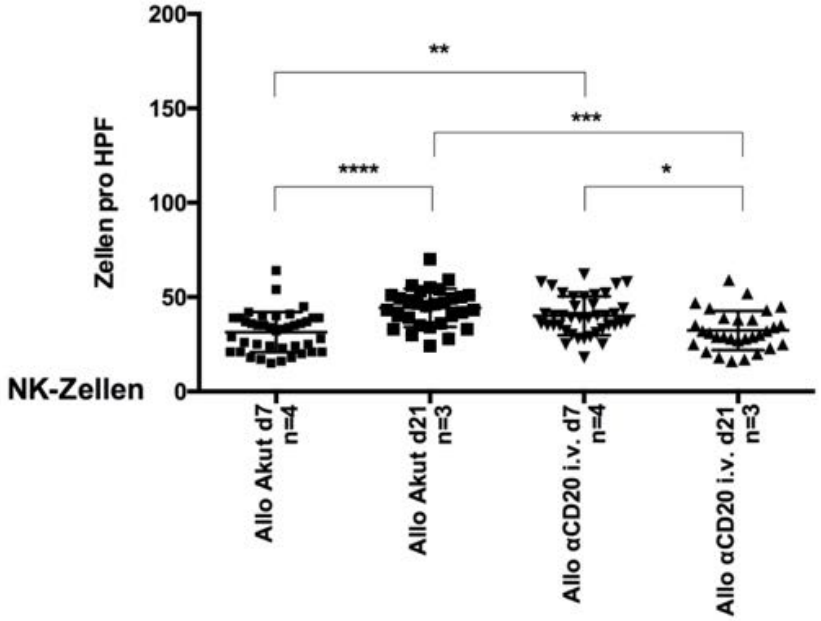
400x
3.4.1. 1:10
RAM 1:20 mit 1:50 NRS

3.7.3. Transplantatinfiltrierende NK-Zellen

In der Versuchsgruppe "Allo Akut" zeigten sich mehr NK-Zellen im Transplantat an Tag 21 als an Tag 7 (p<0,0001). An Tag 21 konnten in der Versuchsgruppe "Allo αCD20 i.v." im Vergleich zu Tag 7 weniger NK-Zellen gezählt werden (p<0,05).

Zwischen den Versuchsgruppen ergab sich an Tag 7 sowie auch an Tag 21 ein signifikanter Unterschied: Während in der Versuchsgruppe "Allo αCD20 i.v." mehr NK-Zellen an Tag 7 als in "Allo Akut" gezählt werden konnten (p<0,01), zeigten die Versuchsgruppe "Allo αCD20 i.v." an Tag 21 geringere NK Zellen auf als Allo Akut (p<0,001).

Abbildung 35: NK–Zellinfiltrate der NTx-Niere in "Allo Akut" und "Allo αCD20 i.v":
d = Tag
n = Anzahl der Versuchstiere
HPF = Hauptgesichtsfeld
ns = Keine Signifikanz
*p<0,05
**p<0,01
***p<0,001
****p<0,0001



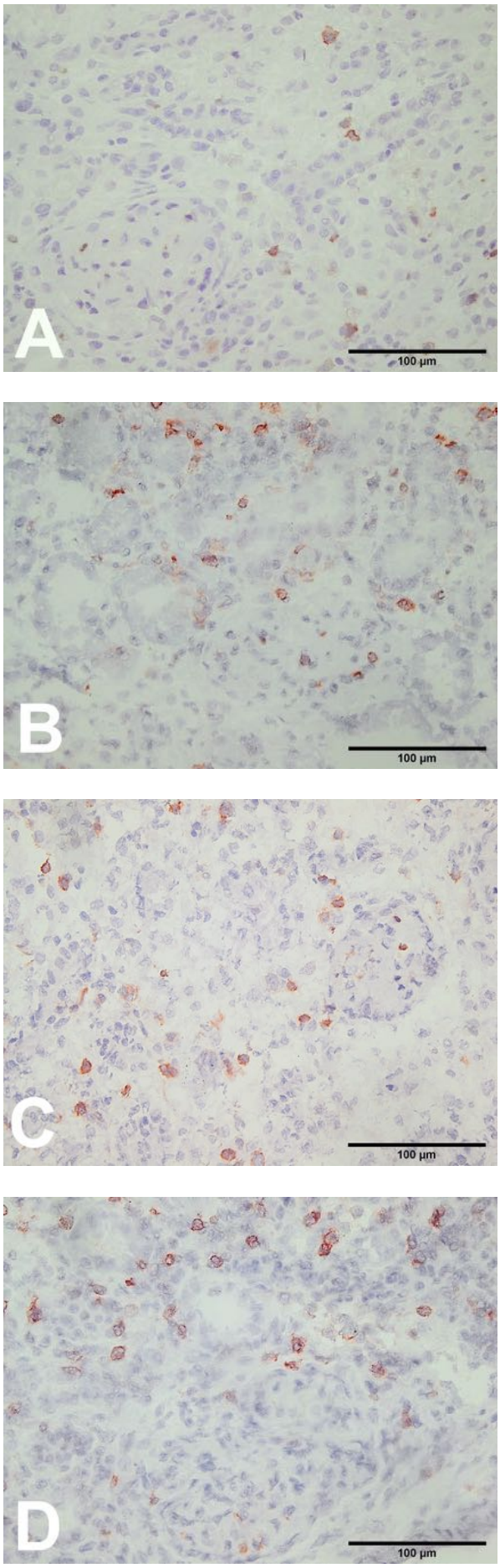


Abbildung 36: NK-Zellinfiltrate der NTx-Niere in

"Allo Akut"
(A) d7
(B) d21

"Allo Akut" zeigten an Tag 21 gegenüber Tag 7 erhöhte NK Zellzahlen.

Allo αCD20 i.v."
(C) d7
(D) d21

In "Allo αCD20 i.v." war die Zellzahl an Tag 21 gegenüber Tag 7 geringer.

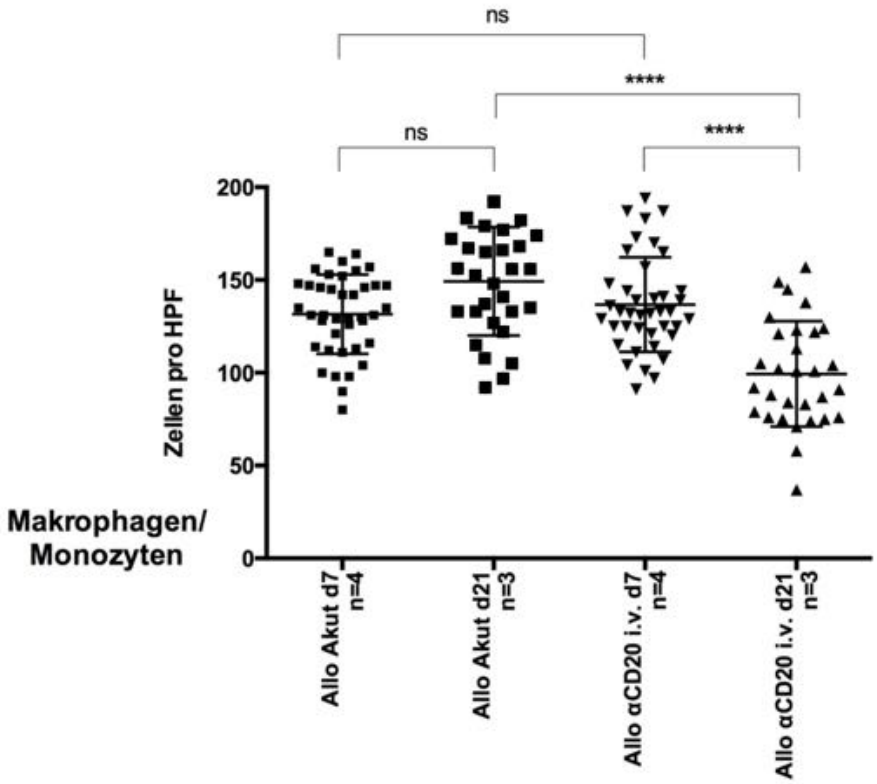
"Allo αCD20 i.v." zeigte an Tag 7 (C) im Vergleich zu "Allo Akut" (A), eine höhere Zellanzahl auf und an Tag 21 eine Geringere (D vgl. B).

400x
10/78 1:5000
RAM 1:20 mit 1:50 NRS

3.7.4. Transplantatinfiltrierende Makrophagen und Monozyten

Die Makrophagen/Monozyten der Transplantate der Versuchsgruppe "Allo Akut" zeigten zwischen Tag 7 und 21 keine Veränderungen auf. An Tag 21 konnten in der Versuchsgruppe "Allo αCD20 i.v." im Vergleich zu Tag 7 weniger Makrophagen/Monozytendetektiert werden (p<0,001). Zwischen den Versuchsgruppen ergab sich ein signifikanter Unterschied: An Tag 21 konnten in der Versuchsgruppe "Allo αCD20 i.v." weniger Makrophagen/Monozyten infiltrieren als an Tag 21 in "Allo Akut" (p<0,0001).

Abbildung 37: Makrophagen/Monozyten-Infiltrate der NTx-Niere in "Allo Akut" und "Allo αCD20 i.v":
d = Tag
n = Anzahl der Versuchstiere
HPF = Hauptgesichtsfeld
ns = Keine Signifikanz
****p<0,0001



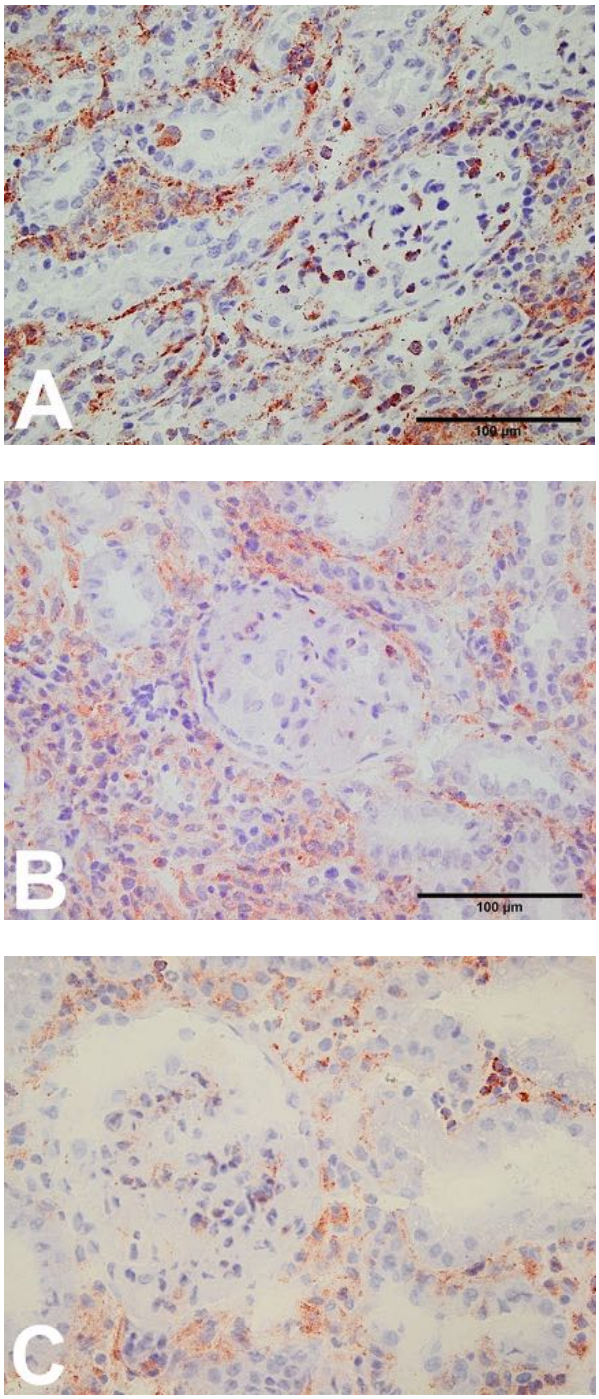


Abbildung 38: Makrophagen/Monozyten-Infiltrate der NTx-Niere in

"Allo Akut"
(A) d21

"Allo αCD20 i.v."
(B) d7
(C) d21

In "Allo αCD20 i.v." zeigte sich an Tag 21 weniger Makrophagen/Monozyten gegenüber Tag 7.

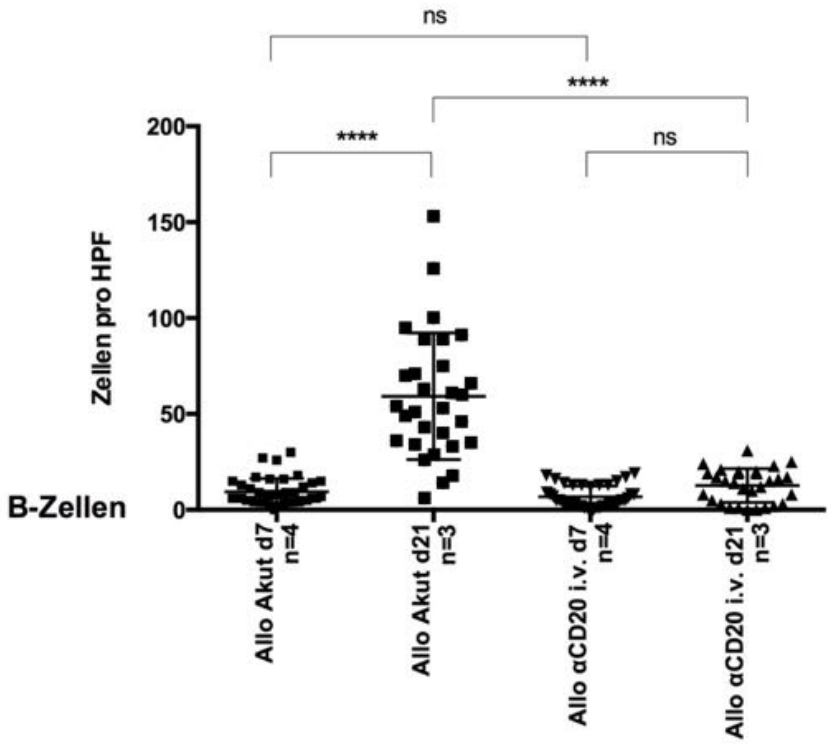
Zwischen den Versuchsgruppen zeigte "Allo αCD20 i.v." an Tag 21 (C) weniger Makrophagen/Monozyten als "Allo Akut" (A).

400x
ED1 1:5000
RAM 1:20 mit 1:50 NRS

3.7.5. Transplantatinfiltrierende B-Zellen

An Tag 21 zeigten sich in den Transplantaten der Versuchsgruppe "Allo Akut" im Vergleich zu Tag 7 die B-Zellen eine starke vemehrt (p<0,0001). Durch die B-Zelldepletion konnten zwischen Tag 7 und 21 der Versuchsgruppe "Allo αCD20 i.v." keine Unterschiede gezeigt werden. Zwischen den Versuchsgruppen ergab sich somit ein signifikanter Unterschied: an Tag 21 konnten viel weniger B-Zellen in der Versuchsgruppe "Allo αCD20 i.v." detektiert werden als in der Versuchsgruppe "Allo Akut" (p<0,0001).

Abbildung 39: B-Zell-Infiltrate der NTx-Niere in "Allo Akut" und "Allo αCD20 i.v":
d = Tag
n = Anzahl der Versuchstiere
HPF = Hauptgesichtsfeld
ns = Keine Signifikanz
****p<0,0001



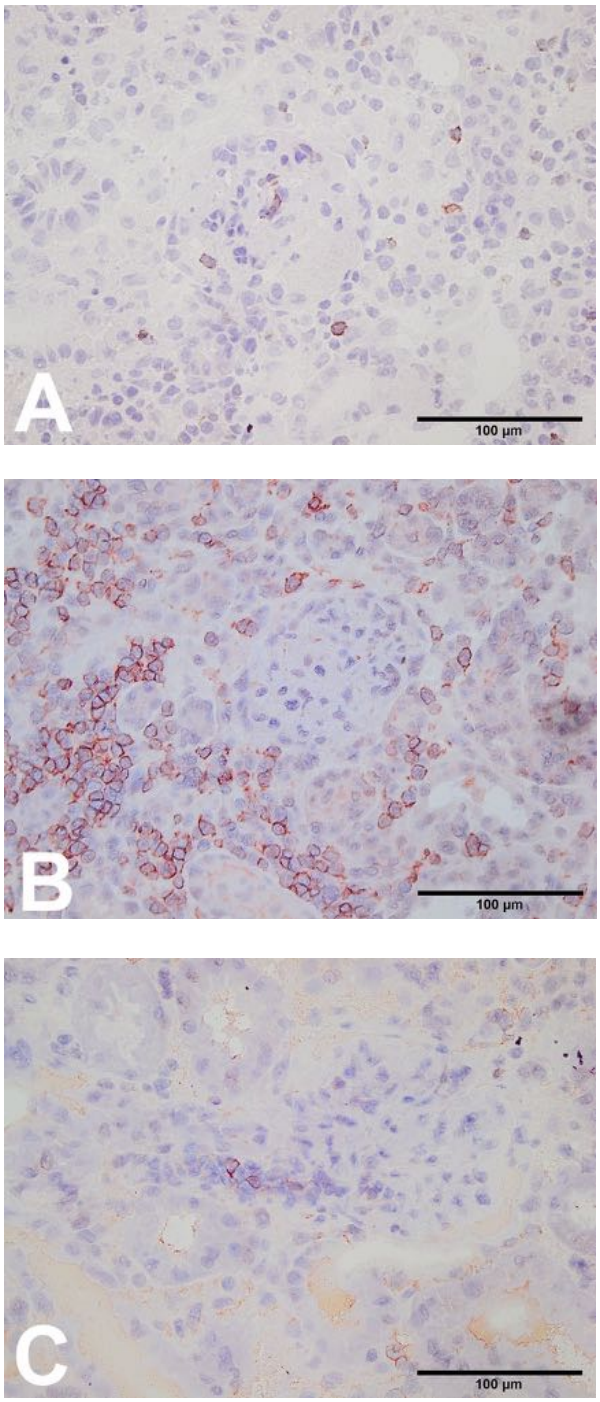


Abbildung 40: B-Zellinfiltrate der NTx-Niere

"Allo Akut"
(A) d7
(B) d21

In "Allo Akut" zeigten sich an Tag 21 (B) mehr B-Zellen als an Tag 7 (A).

"Allo αCD20 i.v."
(C) d21

An Tag 21 zeigte sich durch die B-Zell-Depletion viel weniger B-Zellen in "Allo αCD20 i.v." (C) verglichen zu "Allo Akut" an Tag 21 (B).

400x
Ki-B1R 1:10

4. Diskussion

Das erworbene zelluläre Immunsystem ist einer der Hauptbarrieren der Organtransplantation. Es zerstört Spenderorgane durch eine adaptive Immunantwort auf fremde Proteine. Der MHC spielt eine wichtige Rolle bei der Kontrolle der Immunantwort und trägt mit seiner Funktion wiederum auch zur Histoinkompatibilität bei (Cornell, Smith und Colvin, 2008). Neben allgemein immunsupprimierenden Medikamenten richten sich viele angewandte Immunsuppressiva primär gegen die T-Zelle (Beimler und Zeier, 2007). Es gibt noch wenig Daten, wie auch klinische Erfahrung im Bereich der B-Zell-gerichteten immunsuppressiven Therapie.
Rituximab ist ein monoklonaler, B-Zell depletierender Antikörper, der sich primär gegen CD20-exprimierende Zellen richtet. Der Antikörper depletiert selektiv die peripheren Blut B-Lymphozyten in wenigen Stunden (Barnett, 2013). Es ist wenig bekannt darüber inwieweit weitere periphere immunologisch aktive Zellen hierdurch beeinträchtigt werden.

Beim Patienten sind die Ursachen, die zur akuten Transplantatabstoßung führen multifaktoriell und können nicht isoliert betrachtet werden. Ein Rattenmodell bietet standardisierte Bedingungen, wie auch ein sehr ähnlich funktionierendes Immunsystem. Um hier die Rolle der B-Zellen zu untersuchen, wurde ein Nierentransplantationsmodell (LEW.1W -> LEW) mit einer kompletten MHC-Inkompatibilität bei gleichem genetischem Hintergrund herangezogen, um eine MHC-abhängige akute Nierentransplantatabstoßung untersuchen zu können (Lemke et al., 2015). Das hier angewandte Modell wurde durch die Arbeitsgruppe Koch etabliert (Koch et al., 2008, 2013; Poehnert et al., 2010; Koch, Poehnert und Nashan, 2016). Da bisher keinerlei Daten zur einem Modell mit B-Zell-Depletion bei akuter Abstoßung von Nierentransplantaten in Ratten vorliegen, ist dies hiermit das erste beschriebene akute Nierenabstoßungsmodell in der Ratte, in der eine B-Zell-Depletion induziert wurde.

In der Transplantationsabtoßung behandelnden Literatur, wird eine B-Zell-Depletion lediglich in Versuchstieren im Rahmen einer Xenotransplantation von

Inselgewebe des Pankreas beschrieben. Wang et al. konnten durch eine B-Zell Depletion, eine Transplantattoleranz induzieren (Wang et al., 2013).
in der Literatur ist des Weiteren ein akutes Abstoßungmodell in der Ratte aufgeführt, in dem allogen transplantierte Ratten Cyclosporin A (CsA) erhalten (Engstrand et al., 2002). Ebenfalls sind chronische Nierentransplantations-Abstoßungmodelle in Nacktratten durch Doege und Koch (2005) und ein weiteres chronisches Abstoßungsmodell mit ebenfalls verwendeten LEWIS Ratten (Poehnert et al. (2010)) beschrieben. Zusätzlich liegen Abstoßungsmodelle mit allogener Transplantation von Fischer auf LEW Ratten vor (Vogelbacher et al., 2010). Bickerstaff et al. (2008) etablierten ein präsensibilisiertes Mausmodell, in dem eine akute humorale Abstoßung der Nierentransplantate induziert wurde, welche zu einer zellulärer Abstoßung führte.

In dieser Arbeit wurden zwei Versuchsgruppen generiert, welche einer allogenen Nierentransplantation unterzogen wurden. Die Versuchsdauer betrug 30 Tage.
Um zu Versuchsbeginn die Einflüsse einer αCD20 i.v. Gabe auf den Rattenorganismus zu untersuchen, wurde neben der isogen transplantierten Kontrollgruppe eine weitere generiert, in der LEW Ratten lediglich den αCD20-Antikörper i.v. erhielten (αCD20 i.v.). Insgesamt war es das Ziel, die Einflüsse der B-Zell-Depletion auf das Serumkreatinin, die peripheren Blutlymphozyten, die transplantatinfiltrierenden Zellen und die Auswirkungen auf akute Abstoßung und das Überleben zu untersuchen.

Die Versuchsgruppe Allo αC20 i.v. zeigte vorrübergehend verbesserte Serumkreatintinwerte verglichen mit der Gruppe Allo Akut. Zum Zeitpunkt des Todes gab es keinen Unterschied der Serumkreatininwerte mehr zwischen den Versuchstiergruppen. Panzer et al. zeigten in der allogenen Nierentransplantation B-Zell defizienter Ratten keine Änderung des Serumkreatinins verglichen zur Kontrollgruppe (Panzer et al., 2017). Barnett et al und Macklin et al beschrieben in Analogie zu dieser Arbeit ebenfalls verbesserte Serumkreatininwerte (Barnett, 2013; Macklin, Morris and Knight, 2017).

Neben der Bestimmung der Nierenfunktion wurden die Lymphozytensubpopulationen mittels FACS-Analysen überwacht. In Studien depletiert Rituximab B-Lymphozyten im Menschen bis zu sechs bis zwölf Monate in 80 % der Patienten. Der Nachweis der B-Zellen wurde durch die durchflusszytometrische Analyse mittels CD45RA, welches in Ratten spezifisch B-Zellen färbt, durchgeführt. Als zweiter Marker diente das IgG, welches im Menschen ca. 80 % der gesamten Immunglobuline ausmacht und somit die wichtigste Antikörperklasse darstellt (Macklin, Morris und Knight, 2017).
Die intravenöse Injektion von αCD20 i.v. bei LEW-Ratten ohne Transplantation (Gruppe αCD20 i.v.) führte erfolgreich zur Depletion der B-Zellen. Nach einmaliger Verabreichung kam es bereits zu einer fast vollständigen Depletion, ab der 2. Woche regenerierte sich der B-Zellpool und bis zur 11. Woche waren die prä-Injektionswerte wieder erreicht.
Die allogentransplantierten Versuchstiere erhielten zwei Gaben des Antikörpers, an Tag der Nierentransplantation und 14 Tage später, womit garantiert werden konnte, dass die relative B-Zellzahl während der Versuchszeit unter 2 % gehalten wird. Im FACS zeigte sich eine Depletion der B-Zellen durch die αCD20 i.v. Gabe am Tag der Tx sowie 14 d post Tx der allotransplantierten Ratten, mit einer Reduktion der B-Zellzahl auf insgesamt bis zu 0,47 % verglichen mit 24,9 % prä-transplantationem. Eine erfolgreiche B-Zell-Depletion war in diesem MHC-inkompatiblen Rattentransplantationsmodell somit sichergestellt.

Die Ergebnisse von Bradley et al. zeigten ein akutes Rattentransplantations-Abstoßungmodell, in dem analog zu den Daten von Poehnert et al mit CsA behandelt wurde. Hier zeigte sich, dass zytotoxische T-Zellen eine wichtige Rolle in der Transplantatabstoßung spielen sollen (Bradley, Mason und Morris, 1985). Durch ein Ausbleiben des Anstiegs der zytotoxischen T-Zellen müsste in der Theorie eine Transplantatabstoßung verhindert werden können.
Riveira et al. beschrieben, dass B-Lymphozyten als Antigen-präsentierende Zellen fungieren und die B-Zell-Depletion hierdurch indirekt die T-Lymphozyten Aktivität supprimieren soll (Rivera et al., 2001). CD4+ T-Helferzellen können Antigen-präsentierende Zellen erkennen und können wiederum z.B. andere B-Zellen aktivieren. In einem Modell der Hauttransplantatabstoßung konnte durch eine B-Zell-Depletion eine Proliferation von alloantigen-spezifischen CD4+T-

Helferzellen herbeigeführt werden. Dies resultierte in einem negativen regulativen Effekt auf die Transplantatabstoßung (Dilillo et al., 2011).
Während die absoluten peripheren Gesamtlymphozyten der Allo αCD20 i.v. Gruppe verglichen zu prae-Tx konstant blieben, zeigte sich in der Allo Akut Gruppe in der 1. Woche postTx, eine Lymphozytose.
Die absoluten Werte der Lymphozytensubpopulationen der Versuchgruppe Allo αCD20 i.v. zeigten keine Veränderungen zu praeTx. Im Gegensatz hierzu zeigte sich in der Allo Akut Gruppe ein absoluter Anstieg der T-Zellen, eingeschlossen der Zytotoxischen- und T-Helfer Zellen verglichen zu praeTx.
In der Betrachtung der relativen T-Lymphozyten der Allo αCD20 i.v. Gruppe, zeigt sich ein relativer Anstieg im Vergleich zu Allo Akut. Der Grund hierfür ist, dass durch den absoluten Wegfall der B-Zell Population, bei gleichbleibenden absoluten T-Lymphozyten, der relative Anteil dieser steigt. Dies resultiert in einem unspezifischen prozentualen Anstieg der T-Lymphozytensubpopulationen (eingeschlossen der zytotoxischen-, T-Helfer-, T-Reg-, Aktivierte T-, NKT-, sowie NK-Zellen).
Insgesamt konnte die B-Zell-Depletion, wie anderen Studien zuvor beschrieben eine Proliferation der absoluten T-Zellzahl, eingeschlossen der Zytotoxischen und T-Helfer Zellen verhindern. Nebenbefundlich bewirkte die B-Zell Depletion einen Shift der relativen T-Lymphozytensubpopulationen aufgrund des Wegfalls der B-Lymphozytenpopulation.

Eine weitere Hypothese ist, dass die B-Zell-Depletion durch reduzierte Aussendung der allospezifischen Lymphozyten aus sekundär lymphatischen Organen, zu einer verminderten zellulären Transplantatinfiltration und somit zur Prävention der Organabstoßung führt (Chiba et al., 1998). Die durchflusszytometrischen Analysen der Lymphknoten sowie Milz zeigen interessanterweise, auch in den Organen eine B-Zell-Depletion durch den αCD20 Antikörper.
Die Auswirkungen auf die restlichen Lymphozytensubpopulationen der Milz und Lymphknoten entsprechen den Analysen des peripheren Bluts: die prozentualen T-Lymphozytensubpopulationen in Versuchsgruppe "Allo αCD20 i.v." sind durch den Wegfall der B-Zellen ebenfalls gegenüber der Versuchsgruppe "Allo Akut" hochsignifikant erhöht.

In Kontrast hierzu können im Knochenmark nur wenige Zellen detektiert werden. Dies liegt daran, dass die in diesem Modell gemarkerte Antigene primär auf peripheren Zellen vorherrschen.

Die Organabstoßung findet in den Transplantaten statt, weswegen die Transplante post mortem auf transplantatinfiltrierende Zellen untersucht wurden. In der Gruppe Allo Akut zeigt die Gegenüberstellung der transplantatinfiltrienden Zellen von Tag 21 mit denen von Tag 7, eine signifikante Zunahme der T-Zellen. In der Gruppe Allo αCD20 i.v. sind ebenfalls signifikant erhöhte T-Zellzahlen an Tag 21 verglichen mit Tag 7 zu detektieren. Durch die B-Zell-Depletion konnte somit die T-Zellinfiltration in das Nierentransplantat nicht verhindert werden.
In der Literatur wird durch Ma et al. in Kontrast zu diesen Ergebnissen im B-Zell defizienten Modell keine Veränderung der infiltrierenden T-Zellen verglichen zur Kontrollgruppe beschrieben. In einem Makrophagen depletierten Rattenmodell, konnten die T-Zellen ebenfalls nicht beeinflusst werden (Ma et al., 2013).
In der Betrachtung der restlichen transplantatinfiltierenden Zellen, insbesondere der Makrophagen, zytotoxischen T-Zellen und NK-Zellen, zeigt sich ein interessanter Effekt:
in der Gruppe Allo αCD20 i.v. an Tag 21 ließen sich insgesamt weniger transplantatinfiltierende Zellen detektieren als an Tag 7. Die Makrophagen in der Allo αCD20 i.v. zeigten eine hochsignifikante Reduktion zur Gruppe Allo Akut in den longitudinalen Auswertungen. Im B-Zell defizienten Rattenmodell von Ma et al. zeigten die allogene Nierentransplantate eine Woche post Tx ebenfalls eine Reduktion transplantatinfiltriender Makrophagen. In deren Versuch führte dies zu einer verringerten Abstoßung (Ma et al., 2013). In der Versuchsgruppe Allo αCD20 i.v. führte die B-Zell-Depletion ebenfalls zu einer hochsignifikanten Reduktion der zytotoxischen T-Zellen und NK-Zellen in den longitudinalen Auswertungen.
Die B-Zell-Depletion in einem MHC inkompatiblen Rattenmodell mit genetisch identischen Hintergrund führte insgesamt zu einem vorrübergehend verbessertem Serumkreatinin, verminderter Infiltration von Makrophagen, zytotoxischen T-Zellen und NK-Zellen. Konnte dies zu einer Verhinderung von Abstoßung beitragen? Welchen Einfluss hatte die B-Zell Depletion auf das Überleben?

Takagi et al. (2010) beschrieben im Menschen durch Gabe von Rituximab eine Verhinderung der T-Zell-vermittelten Abstoßung. In einem Mäusemodell nach Dilillo et al. (2011) in denen B-Zellen mittels CD19- Antikörper depletiert wurden, konnte die Nierentransplantatabstoßung ebenfalls signifikant reduziert werden.
Im Gegensatz hierzu zeigten Tyden et al. in einer randomisierten Studie in der Rituximab am Tag der Tx verabreicht wurde, keine Differenz der Inzidenz an Antikörper vermittelter Abstoßung sowie T-Zell vermittelter Abstoßung (Tyden et al., 2012). In einer kontrollierten randomisierten Studie von Van den Hoogen et al wurden Nierentransplantations-Patienten randomisiert und erhielten zusätzlich zum immunsuppressivem Standard einerseits Rituximab oder ein entsprechendes Placebo. Die Ergebnisse zeigten ebenfalls keine Differenz in der Häufigkeit einer akuten Abstoßung zwischen den Gruppen.

In der isotransplantierten Gruppe und der Versuchsgruppe „αCD20 i.v." zeigten die Nierentransplante keine Zeichen einer Abstoßung.
In dieser Arbeit konnte durch die MHC-Inkompatibiltät in der Gruppe Allo Akut eine 100 %-ige akute Antikörper vermittelte Abstoßung hervorgerufen werden. 25 % der Versuchstiere wiesen ebenfalls eine T-Zell vermittelte Abstoßung auf. Trotz B-Zell-Depletion entwickelten in der Allo αCD20 i.v. Gruppe 100 % der Versuchstiere eine Antikörper vermittelte Abstoßung. Höchst interessant ist außerdem, dass 80 % ebenfalls eine T-Zell vermittelte Abstoßung aufwiesen. Folglich kann man bestätigen, dass durch die B-Zell-Depletion keine Antikörper vermittelte Abstoßung verhindert werden konnte, sondern sehr wahrscheinlich eine T-Zell vermittelte Abstoßung sogar gefördert wurde.
Analog hierzu mussten Clathworthy et al. ihre randomisierte kontrollierte Studien zurückhalten. Sie behandelten Patienten mit Rituximab, welches einen Anstieg an T-Zell vermittelte Abstoßung bewirkte (Clatworthy, 2011).

Wie wirkte sich die vermehrte Abstoßung unter B-Zell Depletion auf das Überleben aus?
In den Versuchsgruppen, in der die Ratten keine Transplantation, sondern eine alleinige αCD20-Antikörper Gabe erhielten (αCD20 i.v) und in der isogen transplantierten Gruppe (Iso) betrug das Überleben 100 %.

Das Überleben der allogentransplantierten Gruppen „Allo Akut“ und „Allo αCD20 i.v.“ zeigte sich jedoch in beiden Gruppen gleichermaßen stark verschlechtert ($p<0,00005$ an d29 verglichen zu Iso).
Unter den allogentransplantierten Versuchsgruppen überlebten in der „Allo Akut“ Gruppe 55 % der Versuchstiere mit durchschnittlich 26 Tagen im Gegensatz zur „Allo αCD20 i.v.“ Versuchsgruppe, in der 21 % der Versuchstiere überlebten, wobei das durchschnittliche Überleben elf Tage betrug ($p<0,05$). Die B-Zell-Depletion führte somit insgesamt bei gemischter akuter Abstoßung nicht zu einem besseren Überleben.
Die Daten aus der Literatur zeigen eine ausgeprägte Differenz. In einem Modell mit B-Zell defizienten Ratten in der eine akute Transplantatabstoßung induziert werden konnte (Panzer et al., 2017), zeigten die Versuchstiere ein verbessertes Überleben gegenüber den Versuchstieren, die keine B-Zell Defizienz besaßen. In Kontrast hierzu sind ebenfalls Daten aus einem Modell in der Literatur aufgeführt, in dem bei allogener Lebertransplantation in Lewis Ratten eine B-Zell-Depletion kein besseres Outcome bewirken konnte (Yokoi et al., 1999).

B-Zellen sollen eine wichtige Rolle in der Transplantatabstoßung spielen, wenn T-Zellen depletiert oder supprimiert werden. Die alleinige Depletion der B-Zellen kann jedoch keine T-Zell-getriggerte Abstoßung verhindern. Dies konnten Brandle et al. (1998) bestätigen. Diese spekulieren, dass zur Verhinderung der T-Zell vermittelten Abstoßung zusätzlich zu B-Zell depletierenden Agenzien zusätzlich T-Zell gerichtete Immunsuppressiva notwendig sind. Analog hierzu konnte in Versuchen von Ma et al. (2013) eine Makrophagen Depletion (durch fms-I) ohne zusätzliche Immunsuppression ebenfalls keine Antikörper vermittelte Abstoßung verhindern.

Laut Marino et al. soll die Depletion von B-Zellen mit einem αCD20 Antikörper die alloreaktiven Memory-T-Zellen erhöhen und somit zu einer Transplantatabstoßung führen (Marino et al., 2016). Dies könnte eine mögliche Erklärung der Abstoßung trotz B-Zell-Depletion sein. Um herauszufinden ob dies in diesem Modell von Relevanz sei, könnten noch zusätzliche Lymphozytensubpopulationen gemarkert werden. Rituximab soll ebenfalls die

Menge an proinflammatischen Zytokinen, welche mit der Depletion an regulatorischen B-Zellen assoziiert sind, erhöhen (Chong and Sciammas, 2011). Wang et al. konnten zeigen, dass spontane Nierentransplantatakzeptanz in Mäusen mit T-Zell, Monozyten und B-Zell Infiltraten vergesellschaftet sind (Wang et al., 2011). Es könnte spekuliert werden, dass durch das Ausbleiben dieser Reaktionen in Gruppe Allo αCD20 i.v. die Nierentransplantatakzeptanz möglicherweise verhindert wurde.

Die T-Zell Infiltration ist ein bekannter Mechanismus der Transplantatabstoßung, welches auch in diesem Modell bestätigt wird. Die Dominanz der Makrophagen in den zellulären Infiltraten, wie es in diesem Modell gezeigt werden konnte, wurde zuvor in anderen Rattentransplantations-Modellen bestätigt, in denen nicht nur MHC Allele, sondern auch andere Gene different waren. Diese Daten unterstützen, dass Makrophagen unter anderem zur akuten Abstoßung beitragen (Ma et al., 2013). Eine hohe Anzahl von transplantatinfiltrienden T-Zellen sind mit schwerer akuter Abstoßung assoziiert und dies ist ein wichtiger Indikator für ein schlechteres Transplantatüberleben.

Unstrittig ist, dass die B-Zell-Depletion eine Modulation der transplantatinfiltrienden Zellen bewirkt. Dies führte in diesem Modell dennoch zu einer vermehrten akuten Transplantatabstoßung. Genau aus diesem Grund lässt sich nicht abstreiten, dass B-Zellen eine wichtigere Rolle in der Transplantatabstoßung zu spielen scheinen. Die Daten der Dynamik der transplantatinfiltirerenden Zellen der allotransplantierten Gruppe bestärken diese Hypothese.

Tyden et al. zeigten im Menschen keine Differenz in der Produktion von de novo Donor-spezifischen-MHC Antikörpern(Tyden et al., 2012). In diesem Modell entwickeln die Versuchstiere bereits an Tag 7 post Tx de novo Donor-spezifische-MHC Antikörper (Daten sind nicht in dieser Arbeit dargestellt), welches sich in den allotransplantierten Gruppen nicht unterscheidet (Lemke et al., 2015). B-Zell Infiltrate sind mit wiederkehrender Abstoßung assoziiert. In unserem Modell konnten die B-Zell Infiltrate im Transplantat ebenfalls depletiert werden. Die Reduktion der weiterer transplantatinfiltrienden Zellen in der αCD20

therapierten Gruppe konnte jedoch weder zu einer Verhinderung insbesondere der Antikörper vermittelten Abstoßung führen, noch zu einem besseren Überleben. Es scheinen noch Zellinteraktionen moduliert zu werden, die in diesem Modell nicht miterfasst wurden.

5. Zusammenfassung

Bislang wurde keine Studie durchgeführt, die die Auswirkungen einer B-Zell-Depletion auf die relative Zusammensetzung der Lymphozyten in peripheren lymphatischen Organen in einem Nierentransplantationsmodell in Ratten untersucht.

Im Rahmen dieser Doktorarbeit konnte durch die gezielte Depletion der B-Zellen mit dem Antikörper αCD20 i.v. in einem MHC-inkompatiblen Rattenmodell mit gleichen genetischen Hintergrund die Wirkung des Rituximabs in der Transplantationsabstoßung besser verstanden werden. Es zeigt sich trotz vebesserter Kreatininwerte und ausbleibender Zunahme der T-Zellzahlen durch die Behandlung mit dem αCD20-Antikörper, keine Veränderungen der absoluten Zusammensetzung der T-Lymphozytensubpopulationen im Blut, wie auch in sekundären lymphatischen Organen. Die Depletion konnte eine Antikörper vermittelte Abstoßung nicht aufhalten.
Es konnte jedoch eine Verhinderung der Infiltration von bestimmten Zellen in das Spenderorgan gezeigt werden, welches aber insgesamt nicht zu einem besseren Überleben führte.

Es bedarf jedoch noch weiterer Forschung, um die genauere Wirkung der B-Zell-Depletion in der Nierentransplantation besser verstehen zu können, vor allem in der Interaktion mit anderen Immunsuppressiva, wie sie im Menschen angewandt werden.

Abstract

So far there is no data, that examines the impact of B-cell depletion on the relative composition of the lymphocytes in the peripheral blood and lymphatic organs in a kidney transplantation model in rats.

The specific depletion of B-cells with an αCD20 antibody in a MHC-incompatible rat model with identical genetic background has been performed. Due to this study, the effects of Rituximab in kidney transplant rejection could be better understood.
This study could demonstrate that better serum creatinine levels and the prevention of T-cell proliferation through the treatment with an αCD20-antibody could not modificate the absolute composition of the T-lymphocytesubpopulations in peripheral blood and secondary lymphatic tissue. The development of an antibody-mediated rejection could not be prevented.
It has been demonstrated that the transplant infiltration of certain lymphatic cells could be prevented. Nontheless b-cell depletion could not lead to a better outcome.

Further research is needed, to understand the exact impact of B-cell depletion, especially in the interaction with other immunosuppressive drugs, as implied in humans.

Quellenverzeichnis

Barnett, A. (2013) 'Rituximab in renal transplantation', *Transplant …*, 26(6), pp. 563–75. doi: 10.1111/tri.12072.

Barnett, N., Dorling, A. and Mamode, N. (2011) 'B cells in renal transplantation: pathological aspects and therapeutic interventions.', *Nephrology Dialysis Transplantation*, 26(3), pp. 767–74. doi: 10.1093/ndt/gfq716.

Beimler, J. and Zeier, M. (2007) 'ABO-incompatible transplantation - A safe way to perform renal transplantation?', *Nephrology Dialysis Transplantation*, 22(1), pp. 25–27. doi: 10.1093/ndt/gfl557.

Bickerstaff, A. *et al.* (2008) 'An experimental model of acute humoral rejection of renal allografts associated with concomitant cellular rejection.', *The American journal of pathology*. United States, 173(2), pp. 347–357. doi: 10.2353/ajpath.2008.070391.

Bradley, J. A., Mason, D. W. and Morris, P. J. (1985) 'Evidence that rat renal allografts are rejected by cytotoxic T cells and not by nonspecific effectors.', *Transplantation*. United States, 39(2), pp. 169–175.

Brandle, D. *et al.* (1998) 'Contribution of donor-specific antibodies to acute allograft rejection: evidence from B cell-deficient mice.', *Transplantation*. United States, 65(11), pp. 1489–1493.

Charite Berlin (no date) *Welche Nebenwirkungen können unter einer Immunsuppression auftreten?* Available at: http://transplantation-cbf.charite.de/patienten/transplantation/fragen/welche_nebenwirkungen_koennen_unter_einer_immunsuppression_auftreten/ (Accessed: 29 April 2016).

Chiba, K. *et al.* (1998) 'FTY720, a novel immunosuppressant, induces sequestration of circulating mature lymphocytes by acceleration of lymphocyte homing in rats. I. FTY720 selectively decreases the number of circulating mature lymphocytes by acceleration of lymphocyte homing.', *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*. United States, 160(10), pp. 5037–5044.

Chong, A. S. and Sciammas, R. (2011) 'Matchmaking the B-cell signature of tolerance to regulatory B cells.', *American Journal of Transplantation*, 11(12), pp. 2555–60. doi: 10.1111/j.1600-6143.2011.03773.x.

Clatworthy, M. (2011) 'Targeting B cells and antibody in transplantation.', *Am J Transplant*, p. 11:1359–67.

Colvin, R. B. and Smith, R. N. (2005) 'Antibody-mediated organ-allograft rejection.', *Nature reviews. Immunology*, 5(10), pp. 807–17. doi: 10.1038/nri1702.

Cornell, L. D., Smith, R. N. and Colvin, R. B. (2008) 'Kidney Transplantation: Mechanisms of Rejection and Acceptance', *Annu. Rev. Pathol. Mech. Dis*, 3, pp. 189–220. doi: 10.1146/annurev.path.

Deenen, G. J., Hunt, S. V and Opstelten, D. (1987) 'A stathmokinetic study of B lymphocytopoiesis in rat bone marrow: proliferation of cells containing cytoplasmic mu-chains, terminal deoxynucleotidyl transferase and carrying HIS24 antigen.', *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*. United States, 139(3), pp. 702–710.

Deutsche Stiftung Organtransplantation (2016) *Jahresbericht 2015 - Organspende und Transplantation in Deutschland*. Available at: https://www.dso.de/uploads/tx_dsodl/DSO_JB_2015_Web_2.pdf (Accessed: 27 April 2016).

Dianova GmbH (no date) *Monoclonal Antibody to Rat B Lymphocytes*. Available at: http://www.dianova.com/downloads/BMA/T3106.pdf (Accessed: 17 September 2013).

Dijkstra, C. D. *et al.* (1985) 'The heterogeneity of mononuclear phagocytes in lymphoid organs: distinct macrophage subpopulations in the rat recognized by monoclonal antibodies ED1, ED2 and ED3.', *Immunology*, 54, pp. 589–599.

Dilillo, D. J. *et al.* (2011) 'B Lymphocytes Differentially Influence Acute and Chronic Allograft Rejection in Mice1', *Journal of Immunology*, 186(4), pp. 2643–2654. doi: 10.4049/jimmunol.1002983.B.

Doege, C. and Koch, M. (2005) 'Chronic allograft nephropathy in athymic nude rats after adoptive transfer of primed T lymphocytes', *Transplant …*, 18(8), pp. 981–91. doi: 10.1111/j.1432-2277.2005.00153.x.

Elstrom, R. L. *et al.* (2006) 'Treatment of PTLD with rituximab or chemotherapy.', *American journal of transplantation : official journal of the American Society of Transplantation and the American Society of Transplant Surgeons*. United States, 6(3), pp. 569–576. doi: 10.1111/j.1600-6143.2005.01211.x.

Engstrand, M. *et al.* (1999) 'Ex vivo propagation and characterization of lymphocytes from rejecting rat-kidney allografts', *Transplant Immunology*, 7(4), pp. 189–196. doi: 10.1016/S0966-3274(99)80001-X.

Engstrand, M. *et al.* (2002) 'Quantification of lymphocytes propagating from rat-kidney allografts--a tool to monitor anti-rejection treatment.', *Transplant immunology*. Netherlands, 10(1), pp. 31–36.

Eurotransplant (2016) 'Active kidney waiting list', *Eurotransplant*, p. 7919. Available at: http://statistics.eurotransplant.org/.

Feugier, P. (2015) 'A review of rituximab, the first anti-CD20 monoclonal antibody used in the treatment of B non-Hodgkin's lymphomas.', *Future oncology (London, England)*. England, 11(9), pp. 1327–1342. doi: 10.2217/fon.15.57.

Gourishankar, S. *et al.* (2008) 'Serum cystatin C performs similarly to traditional markers of kidney function in the evaluation of donor kidney function prior to and following unilateral nephrectomy', *Nephrology Dialysis Transplantation*, 23(9), pp. 3004–3009. doi: 10.1093/ndt/gfn114.

Günther, E. (1998) 'Immunogenetic basis of organ graft rejection in rat and mouse', *Timmermann W, Gassel H-J, Ulrichs K, Zhong R, Thiede A (eds) Organ transplantation in rats and mice: microsurgical techniques and immunological principles. Springer, Berlin Heidelberg New York*, pp. 253–276.

Gunther, E. and Walter, L. (2000) 'Comparative genomic aspects of rat, mouse and human MHC class I gene regions.', *Cytogenet Cell Genet*, 91(1–4), pp. 107–112.

Haas, M. *et al.* (2014) 'Banff 2013 meeting report: inclusion of c4d-negative antibody-mediated rejection and antibody-associated arterial lesions.', *American journal of transplantation : official journal of the American Society of Transplantation and the American Society of Transplant Surgeons*, 14(2), pp. 272–83. doi: 10.1111/ajt.12590.

Hirji, N., Lin, T. J. and Befus, A. D. (1997) ‘A novel CD8 molecule expressed by alveolar and peritoneal macrophages stimulates nitric oxide production.’, *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 158(97), pp. 1833–1840.

Hünig, T. *et al.* (1989) ‘A monoclonal antibody to a constant determinant of the rat T cell antigen receptor that induces T cell activation. Differential reactivity with subsets of immature and mature T lymphocytes.’, *The Journal of experimental medicine*, 169(January), pp. 73–86. doi: 10.1084/jem.169.1.73.

Jensen, C. E., Sorensen, P. and Petersen, K. D. (2014) ‘In Denmark kidney transplantation is more cost-effective than dialysis.’, *Danish medical journal*. Denmark, 61(3), p. A4796.

Jordan, S. and Kahwaji, J. (2011) ‘B-cell immunotherapeutics: emerging roles in solid organ transplantation’, *… in organ transplantation*, 16(4), pp. 416–24. doi: 10.1097/MOT.0b013e32834874f7.

Kaposztas, Z. *et al.* (2009) ‘Impact of rituximab therapy for treatment of acute humoral rejection.’, *Clinical transplantation*. Denmark, 23(1), pp. 63–73. doi: 10.1111/j.1399-0012.2008.00902.x.

Koch, M. *et al.* (2005) ‘Adoptive transfer of primed CD4+ T-lymphocytes induces pattern of chronic allograft nephropathy in a nude rat model’, *Transplantation*, 79(7), pp. 753–761. doi: 10.1097/01.TP.0000155428.67070.5A.

Koch, M. *et al.* (2008) ‘Induction of chronic renal allograft injury by injection of a monoclonal antibody against a donor MHC Ib molecule in a nude rat model’, *Transplant …*, 19(3–4), pp. 187–91. doi: 10.1016/j.trim.2008.05.006.

Koch, M. *et al.* (2013) ‘Isogeneic MSC application in a rat model of acute renal allograft rejection modulates immune response but does not prolong allograft survival.’, *Transplant immunology*, 29(1–4), pp. 43–50. doi: 10.1016/j.trim.2013.08.004.

Koch, M., Poehnert, D. and Nashan, B. (2016) ‘Effects of FTY720 on peripheral blood lymphocytes and graft infiltrating cells in a rat model of chronic renal allograft rejection’, *Transplant Immunology*. Elsevier B.V., 35, pp. 12–17. doi: 10.1016/j.trim.2016.01.003.

L’Agence de la biomédecine (2014) *Le rapport médical et scientifique*. Available at: http://www.agence-biomedecine.fr/annexes/bilan2014/donnees/organes/06-rein/synthese.htm (Accessed: 29 April 2016).

Lemke, A. *et al.* (2015) ‘Rat renal transplant model for mixed acute humoral and cellular rejection: Weak correlation of serum cytokines/chemokines with intragraft changes’, *Transplant Immunology*. Elsevier B.V., 33(2), pp. 95–102. doi: 10.1016/j.trim.2015.08.003.

Li, J. *et al.* (2003) ‘Expression cloning and function of the rat NK activating and inhibitory receptors NKR-P1A and -P1B’, *International Immunology*, 15(3), pp. 411–416. doi: 10.1093/intimm/dxg046.

Lin, Y. *et al.* (2014) ‘CD47 blockade reduces ischemia-reperfusion injury and improves outcomes in a rat kidney transplant model.’, *Transplantation*. United States, 98(4), pp. 394–401. doi: 10.1097/TP.0000000000000252.

Lindquist, R. R., Guttmann, R. D. and Merrill, J. P. (1967) ‘Renal Transplantation in the Inbred Rat, an Immunohistochemical Study of Acute Allograft Rejection’, *Am. J. Pathol.*, 52(6):1145, pp. 531–544.

Ma, F. Y. *et al.* (2013) ‘Macrophages contribute to cellular but not humoral mechanisms of acute rejection in rat renal allografts.’, *Transplantation*, 96(0), pp. 949–57. doi: 10.1097/TP.0b013e3182a4befa.

Macklin, P. S., Morris, P. J. and Knight, S. R. (2017) ‘A systematic review of the use of rituximab for the treatment of antibody-mediated renal transplant rejection’, *Transplantation Reviews*. Elsevier Inc., 31(2), pp. 87–95. doi: 10.1016/j.trre.2017.01.002.

Marino, J. *et al.* (2016) ‘B Cell Depletion With an Anti-CD20 Antibody Enhances Alloreactive Memory T Cell Responses After Transplantation.’, *American journal of transplantation : official journal of the American Society of Transplantation and the American Society of Transplant Surgeons*. United States, 16(2), pp. 672–678. doi: 10.1111/ajt.13483.

Metzger, R., Mempel, T. and Joppich, I. (2000) ‘Organ-specific distribution of major histocompatibility antigens in rats’, *Pediat Surg Int*, pp. 285–292.

Murphy, K. (2012) *Immunobiology, 8th Edition*, *Garland Science*.

Panzer, S. E. *et al.* (2017) ‘Complete B Cell Deficiency Reduces Allograft Inflammation and Intragraft Macrophages a Rat Kidney Transplant Model.’, *Transplantation*, 102(3), p. 1. doi: 10.1097/TP.0000000000002010.

Poehnert, D. *et al.* (2010) ‘Induction of chronic renal allograft dysfunction in a rat model with complete and exclusive MHC incompatibility’, *Transplant immunology*. Elsevier B.V., 22(3–4), pp. 137–43. doi: 10.1016/j.trim.2009.09.007.

Pöhnert, D. (2008) ‘Etablierung eines voll MHC inkompatiblen Rattenmodells zur Induktion einer chronischen Transplantatdysfunktion: Untersuchung der Pathomechanismen’. Available at: http://d-nb.info/993255728/ (Accessed: 17 September 2013).

Protzel, C., Fuhrer, A. and Hakenberg, O. W. (2015) ‘[Terminal renal insufficiency and indication for kidney transplantation].’, *Der Urologe. Ausg. A*. Germany, 54(10), pp. 1356–1361. doi: 10.1007/s00120-015-3906-0.

Rivera, A. *et al.* (2001) ‘Role of B cells as antigen-presenting cells in vivo revisited: antigen-specific B cells are essential for T cell expansion in lymph nodes and for systemic T cell responses to low antigen concentrations.’, *International immunology*. England, 13(12), pp. 1583–1593.

Roche Pharma GmbH (2018) *Fachinformation MabThera i.v.* Available at: https://www.roche.de/dok/MabThera-reg-100-mg500-mg-fachinfo-0-na-attach.pdf.

Salvadori, M. and Bertoni, E. (2003) ‘[Side effects and toxicity of immunosuppressive agents].’, *Giornale italiano di nefrologia : organo ufficiale della Societa italiana di nefrologia*. Italy, 20(5), pp. 490–502.

Schieppati, A. and Remuzzi, G. (2005) ‘Chronic renal diseases as a public health problem: Epidemiology, social, and economic implications’, *Kidney international*, 68(98), pp. S7–S10. doi: 10.1111/j.1523-1755.2005.09801.x.

Schold, J. D. *et al.* (2014) ‘Association between kidney transplant center performance and the survival benefit of transplantation versus dialysis.’, *Clinical journal of the American Society of Nephrology : CJASN*. United States, 9(10), pp. 1773–1780. doi: 10.2215/CJN.02380314.

Sis, B. *et al.* (2010) 'Banff '09 meeting report: Antibody mediated graft deterioration and implementation of Banff working groups', *American Journal of Transplantation*, 10, pp. 464–471. doi: 10.1111/j.1600-6143.2009.02987.x.

Smolen, J. S. *et al.* (2007) 'Consensus statement on the use of rituximab in patients with rheumatoid arthritis.', *Annals of the rheumatic diseases*. England, 66(2), pp. 143–150. doi: 10.1136/ard.2006.061002.

Sood, P. and Hariharan, S. (2017) *Anti-CD20 blocker Rituximab in Kidney Transplantation*, *Transplantation*. doi: 10.1097/TP.0000000000001849.

Takagi, T. *et al.* (2010) 'Evaluation of low-dose rituximab induction therapy in living related kidney transplantation', *Transplantation*, 89(12), pp. 1466–1470. doi: 10.1097/TP.0b013e3181dc0999.

Tedder, T. E. and Engel, P. (1994) 'CD20: a regulator of cell-cycle progression of B lymphocyte, s', 15(9), pp. 0–4.

Tyden, G. *et al.* (2012) 'A randomized, double-blind, placebo-controlled study of single dose rituximab as induction in renal transplantation: a 3-year follow-up.', *Transplantation*. United States, pp. e21-2. doi: 10.1097/01.tp.0000418580.88642.e1.

Vo, A. A. *et al.* (2008) 'Rituximab and intravenous immune globulin for desensitization during renal transplantation.', *The New England journal of medicine*. United States, 359(3), pp. 242–251. doi: 10.1056/NEJMoa0707894.

Vogelbacher, R. *et al.* (2010) 'Bortezomib and sirolimus inhibit the chronic active antibody-mediated rejection in experimental renal transplantation in the rat.', *Nephrology, dialysis, transplantation : official publication of the European Dialysis and Transplant Association - European Renal Association*. England, 25(11), pp. 3764–3773. doi: 10.1093/ndt/gfq230.

Wang, C. *et al.* (2011) 'Spontaneous acceptance of mouse kidney allografts is associated with increased Foxp3 expression and differences in the B and T cell compartments', *Transplant Immunology*. Elsevier B.V., 24(3), pp. 149–156. doi: 10.1016/j.trim.2010.12.004.

Wang, S. *et al.* (2013) 'Transient B-cell depletion combined with apoptotic donor splenocytes induces xeno-specific T-and B-cell tolerance to islet xenografts', *Diabetes*, 62(9), pp. 3143–3150. doi: 10.2337/db12-1678.

Womer, K. L., Vella, J. P. and Sayegh, M. H. (2000) 'Chronic allograft dysfunction: mechanisms and new approaches to therapy.', *Seminars in nephrology*. United States, 20(2), pp. 126–147.

Yokoi, Y. *et al.* (1999) 'Origin, kinetics, and function of chimeric B lymphocytes in liver allografts.', *Transplantation*. United States, 68(1), pp. 118–123.

-Entfällt aus datenschutzrechtlichen Gründen-

-Entfällt aus datenschutzrechtlichen Gründen-

Danksagung

Als Erstes möchte ich Frau Prof. Dr. Martina Koch nennen, die mir dieses interessante Thema zur Verfügung stellte. Ihr verdanke ich neben der praktischen Durchführung der Nierentransplantationen, zahlreiche Denkanstöße, die stets kritische Begutachtung der gesamten Ergebnisse und die geduldige Betreuung dieser Arbeit. Frau PD Dr. Anja Lehmke danke ich für die Korrektur der Arbeit.

Des Weiteren möchte ich den Mitarbeitern der Arbeitsgruppe Koch danken: Frau Sabrina Christiansen verdanke ich neben der praktischen Durchführung der Nierentransplantationen, die liebevolle Aufnahme ins Laborteam und Schöpfung ständiger Motivation. Ebenfalls möchte ich Frau Claudia Gossler nennen, die mir stets zur Seite stand und mich praktisch exzellent beriet.

Ebenfalls danke ich dem Labor der hepatobiliären Chirurgie und Transplantationschirurgie sowie der Versuchstierhaltung des Campus Forschung für das entspannte Arbeitsklima und Bereitstellung der Arbeitsmaterialien und Mitversorgung der Versuchstiere.

Weiterer Dank gilt Frau Mercedes Noriega für die histopathologischen Untersuchungen.

Ebenfalls außerordentlich dankbar bin ich Natalie, meiner Mutter, Dominik, Karsten und Julius, die mir stets Rückendeckung und Kraft gaben.

Anja Röske

Eidesstattliche Versicherung

Ich versichere ausdrücklich, dass ich die Arbeit selbständig und ohne fremde Hilfe verfasst, andere als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel nicht benutzt und die aus den benutzten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen einzeln nach Ausgabe (Auflage und Jahr des Erscheinens), Band und Seite des benutzten Werkes kenntlich gemacht habe.
Ferner versichere ich, dass ich die Dissertation bisher nicht einem Fachvertreter an einer anderen Hochschule zur Überprüfung vorgelegt oder mich anderweitig um Zulassung zur Promotion beworben habe.
Ich erkläre mich einverstanden, dass meine Dissertation vom Dekanat der Medizinischen Fakultät mit einer gängigen Software zur Erkennung von Plagiaten überprüft werden kann.

Unterschrift: .....