

UNIVERSITÄTSKLINIKUM HAMBURG-EPPENDORF

Ehem.: Klinik für Hepatobiliäre Chirurgie und Transplantationschirurgie

Zuletzt als Kommissarischer Klinikdirektor:

Prof. Dr. med. Fischer

Akute Nierentransplantatabstoßung in einem MHC-inkompatiblen Rattenmodell

–

Einfluss einer CD20⁺ B-Zell Depletion auf verschiedene B- und T- Zell-Subpopulationen

Dissertation

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

vorgelegt von:

Mona Katharina Nachtwey
aus Aachen

Hamburg 2020

Angenommen von der

Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg am: 12.02.2021

Veröffentlicht mit Genehmigung der

Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg.

Prüfungsausschuss, der/die Vorsitzende:

Prof. Dr. Friedrich Thaiss

Prüfungsausschuss, zweite/r Gutachter/in:

Prof. Dr. Martina Koch

Inhaltsverzeichnis

1	EINLEITUNG	1
1.1	Nierenerkrankungen.....	1
1.1.1	Prävalenz, Ursachen und Mortalität chronischer Nierenerkrankungen	1
1.1.2	Nierenersatzverfahren.....	1
1.2	Nierentransplantation	2
1.2.1	Allokation der Transplantate.....	2
1.2.2	Operationsverfahren.....	3
1.2.3	Komplikationen und Mortalität post NTx.....	3
1.3	Das humane Immunsystem	4
1.3.1	Angeborene Immunabwehr	4
1.3.2	Adaptive Immunabwehr.....	5
1.3.3	Aktivierung von T-Zellen.....	5
1.3.3.1	Zytotoxische T-Zellen	6
1.3.3.2	T-Helferzellen	6
1.3.3.3	Regulatorische T-Zellen	7
1.3.4	B-Zellen	8
1.3.4.1	Entwicklung von B-Zellen und B-Zell-Subpopulationen	8
1.3.4.2	Aktivierung von B-Zellen	10
1.3.4.3	Regulatorische B-Zellen (Bregs)	10
1.4	Abstoßungsreaktionen	10
1.4.1	Hyperakute Transplantatabstoßung	10
1.4.2	Akute Transplantatabstoßung	11
1.4.2.1	Akute zellulär vermittelte Transplantatabstoßung	11
1.4.2.2	Akute humoral vermittelte Transplantatabstoßung.....	11
1.4.3	Chronische Transplantatabstoßung	12
1.5	Konventionelle Immunsuppression	12
1.5.1	Induktionstherapie	13
1.5.2	Erhaltungstherapie	13
1.5.3	Glucocorticoide.....	13
1.5.4	Calcineurininhibitoren.....	14
1.5.5	Antimetabolite.....	14
1.5.6	mTor-Inhibitoren	15
1.5.7	Antikörper	15
1.6	Anti-CD20 AK.....	16
1.6.1	Molekulare Grundlagen	16
1.6.2	Wirkmechanismen.....	16
1.6.3	Anwendungsbereiche.....	16
1.6.4	Anwendung in der Transplantationsmedizin	16
1.7	MHC-Komplex im kongenen Rattentransplantationsmodell.....	17
1.8	Zielsetzung und Fragestellung	17

2	MATERIAL UND METHODEN	19
2.1	Genehmigung der Tierversuche.....	19
2.2	Tiermodell	19
2.3	Nierentransplantation in der Ratte	20
2.4	Überwachung des Zustandes der Versuchstiere	22
2.4.1	Überwachung des Allgemeinzustandes	22
2.4.2	Überwachung der Nierenfunktion.....	23
2.5	Probengewinnung und –lagerung	23
2.5.1	Retrobulbäre Blutentnahme	23
2.5.2	Serumgewinnung	24
2.5.3	Töten der Versuchstiere	24
2.5.4	Lymphozytenisolierung aus der Milz	25
2.5.5	Lymphozytenisolierung aus den Lymphknoten	26
2.5.6	Kryokonservierung von Zellen.....	26
2.6	Lymphozytenmonitoring	27
2.6.1	Isolierung von Leukozyten aus dem peripheren Blut	27
2.6.2	Zellzählung mit der Zählkammer.....	28
2.6.3	Durchflusszytometrie	28
2.6.4	Differentialblutbild.....	32
2.7	Färbung Donor-spezifischer Antikörper	33
2.8	IFN γ Enzyme Linked Immuno Spot Assay.....	35
2.9	Histologische Untersuchungen	39
2.9.1	Herstellung von Paraffinschnitten.....	39
2.9.2	Hämatoxylin-Eosin-Färbung.....	40
2.9.3	PAS-Reaktion.....	40
2.10	Immunhistologische Untersuchungen	41
2.10.1	Herstellung von Kryoschnitten.....	41
2.10.2	Immunhistologische Färbung	41
2.11	Statistische Auswertung.....	43
3	ERGEBNISSE.....	44
3.1	Ausschluss von Tieren	44
3.2	Gewicht der Tiere im Versuchsverlauf	45
3.3	Überwachung der Nierenfunktion.....	45
3.4	FACS-Analysen des peripheren Blutes.....	46
3.4.1	Lymphozyten gesamt	46
3.4.2	T-Zellen	46
3.4.3	NK-Zellen	49
3.4.4	B-Zellen	50
3.5	FACS-Analysen der Milz	53
3.5.1	T-Zellen	53
3.5.2	NK-Zellen	55
3.5.3	B-Zellen	56
3.6	FACS-Analysen der Lymphknoten.....	58

3.6.1	T-Zellen	58
3.6.2	NK-Zellen	60
3.6.3	B-Zellen	61
3.7	Färbung Donor-spezifischer Antikörper	64
3.8	EliSpot im Rattenmodel	65
3.8.1	Etablierung des EliSpot im Rattenmodel	65
3.8.2	Ergebnisse im EliSpot	69
3.9	Histologische Färbung der NTx-Nieren	70
3.10	Immunhistologie	74
3.10.1	Immunhistologische Färbung von B-Zellen	74
3.10.2	Immunhistologische Färbung von T-Zellen	75
3.10.3	Immunhistologische Färbung von Makrophagen	77
4	DISKUSSION	79
4.1	Limitationen	96
4.2	Fazit und Ausblick	98
5	ZUSAMMENFASSUNG	100
6	ABSTRACT	101
7	ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	102
8	LITERATURVERZEICHNIS	107
9	ANHANG	122
10	DANKSAGUNG	133
11	LEBENS LAUF	134
12	EIDESSTATTLICHE VERSICHERUNG	135

Abbildungsverzeichnis

Abb. 1: Vereinfachtes Schema der B-Zell-Entwicklung mit ausgewählten Oberflächenmolekülen der einzelnen B-Zell-Subtypen.....	9
Abb. 2: Graphische Darstellung des Ablaufes eines EliSpot-Assays.....	36
Abb. 3: Überlebenswahrscheinlichkeit der Versuchstiere über vier Wochen in %.....	45
Abb. 4: Lymphozyten (CD45 ⁺) im peripheren Blut in Mrd / l.	46
Abb. 5: T-Zellen (CD3 ⁺) im peripheren Blut in Mrd / l.....	47
Abb. 6: T _H -Zellen (CD3 ⁺ CD4 ⁺) im peripheren Blut in Mrd / l.....	47
Abb. 7: Zytotoxische T-Zellen (CD3 ⁺ CD8 ⁺) im peripheren Blut in Mrd / l.	48
Abb. 8: NKT-Zellen (CD3 ⁺ CD161 ⁺) im peripheren Blut in Mrd / l.	48
Abb. 9: Tregs (CD4 ⁺ CD25 ⁺) im peripheren Blut in Mrd / l.	49
Abb. 10: Tregs (CD4 ⁺ FoxP3 ⁺) im peripheren Blut in Mrd / l.	49
Abb. 11: NK-Zellen (CD3 ⁻ CD161 ^{high}) im peripheren Blut in Mrd / l.....	50
Abb. 12: B-Zellen (CD45RA ⁺ IgG ⁺) im peripheren Blut in Mrd / l.	51
Abb. 13: T1 B-Zellen (IgD ^{low} IgM ^{medium}) im peripheren Blut in % im Verhältnis zur gesamten B-Zell-Population.....	51
Abb. 14: T2 B-Zellen (IgD ^{high} IgM ^{high}) im peripheren Blut in % im Verhältnis zur gesamten B-Zell-Population.....	52
Abb. 15: Naive reife B-Zellen (IgD ^{medium} IgM ^{medium}) im peripheren Blut in % im Verhältnis zur gesamten B-Zell-Population.....	52
Abb. 16: Switched B-Zellen (IgD ⁻ IgM ⁻) im peripheren Blut in % im Verhältnis zur gesamten B-Zell-Population.....	53
Abb. 17: T-Zellen (CD3 ⁺) in der Milz, zwei Wochen post NTx in % im Verhältnis zur gesamten Lymphozyten-Population.....	53
Abb. 18: T _H -Zellen (CD3 ⁺ CD4 ⁺) in der Milz, zwei Wochen post NTx in % im Verhältnis zur gesamten Lymphozyten-Population.....	54

Abb. 19: Zytotoxische T-Zellen (CD3 ⁺ CD8 ⁺) in der Milz, zwei Wochen post NTx in % im Verhältnis zur gesamten Lymphozyten-Population.....	54
Abb. 20: NKT-Zellen (CD3 ⁺ CD161 ⁺) in der Milz, zwei Wochen post NTx in % im Verhältnis zur gesamten Lymphozyten-Population.....	55
Abb. 21: NK-Zellen (CD3 ⁻ CD161 ^{high}) in der Milz, zwei Wochen post NTx in % im Verhältnis zur gesamten Lymphozyten-Population.....	55
Abb. 22: B-Zellen (CD45RA ⁺ IgG ⁺) in der Milz, zwei Wochen post NTx in % im Verhältnis zur gesamten Lymphozyten-Population.....	56
Abb. 23: T1 B-Zellen (IgD ^{low} IgM ^{medium}) in der Milz, zwei Wochen post NTx in % im Verhältnis zur gesamten B-Zell-Population.....	57
Abb. 24: T2 B-Zellen (IgD ^{high} IgM ^{high}) in der Milz, zwei Wochen post NTx in % im Verhältnis zur gesamten B-Zell-Population.....	57
Abb. 25: Naive reife B-Zellen (IgD ^{medium} IgM ^{medium}) in der Milz, zwei Wochen post NTx in % im Verhältnis zur gesamten B-Zell-Population.....	58
Abb. 26: Switched B-Zellen (IgD ⁻ IgM ⁺) in der Milz, zwei Wochen post NTx in % im Verhältnis zur gesamten B-Zell-Population.....	58
Abb. 27: T-Zellen (CD3 ⁺) in den Lymphknoten, zwei Wochen post NTx in % im Verhältnis zur gesamten Lymphozyten-Population.....	59
Abb. 28: T _H -Zellen (CD3 ⁺ CD4 ⁺) in den Lymphknoten, zwei Wochen post NTx in % im Verhältnis zur gesamten Lymphozyten-Population.....	59
Abb. 29: Zytotoxische T-Zellen (CD3 ⁺ CD8 ⁺) in den Lymphknoten, zwei Wochen post NTx in % im Verhältnis zur gesamten Lymphozyten-Population.....	60
Abb. 30: NKT-Zellen (CD3 ⁺ CD161 ⁺) in den Lymphknoten, zwei Wochen post NTx in % im Verhältnis zur gesamten Lymphozyten-Population.....	60
Abb. 31: NK-Zellen (CD3 ⁻ CD161 ^{high}) in den Lymphknoten, zwei Wochen post NTx in % im Verhältnis zur gesamten Lymphozyten-Population.....	61
Abb. 32: B-Zellen (CD45RA ⁺ IgG ⁺) in den Lymphknoten, zwei Wochen post NTx in % im Verhältnis zur gesamten Lymphozyten-Population.....	62
Abb. 33: T1 B-Zellen (IgD ^{low} IgM ^{medium}) in den Lymphknoten, zwei Wochen post NTx in % im Verhältnis zur gesamten B-Zell-Population.....	62

Abb. 34: T2 B-Zellen (IgD ^{high} IgM ^{high}) in den Lymphknoten, zwei Wochen post NTx in % im Verhältnis zur gesamten B-Zell-Population.....	63
Abb. 35: Naive reife B-Zellen (IgD ^{medium} IgM ^{medium}) in den Lymphknoten, zwei Wochen post NTx in % im Verhältnis zur gesamten B-Zell-Population.....	63
Abb. 36: Switched B-Zellen (IgD ⁻ IgM ⁻) in den Lymphknoten, zwei Wochen post NTx in % im Verhältnis zur gesamten B-Zell-Population.....	64
Abb. 37: Produktion von DSA im Gruppenvergleich.	65
Abb. 38: Durchschnittliche T-Zell-Reaktivität auf Spender-Splenozyten vor und nach der NTx.	70
Abb. 39: PAS-Reaktion eines Nierentransplantats aus der Gruppe ‚allo NTx d14 + NaCl‘ zwei Wochen post NTx: Fibrotischer Umbau und Sklerödem.	71
Abb. 40: PAS-Reaktion eines Nierentransplantats aus der Gruppe ‚allo NTx d14 + Anti-CD20‘ zwei Wochen post NTx: Fibrotischer Umbau und Sklerödem.	71
Abb. 41: PAS-Reaktion eines Nierentransplantats aus der Gruppe ‚allo NTx d14 + NaCl‘ zwei Wochen post NTx: Einblutungen und reduzierte Zellkernzahlen.	72
Abb. 42: PAS-Reaktion eines Nierentransplantats aus der Gruppe ‚allo NTx d14 + Anti-CD20‘ zwei Wochen post NTx: Einblutungen und reduzierte Zellkernzahlen.	72
Abb. 43: PAS-Reaktion eines Nierentransplantats aus der Gruppe ‚allo NTx d14 + NaCl‘ zwei Wochen post NTx: mononukleäres Zellinfiltrat.....	73
Abb. 44: PAS-Reaktion eines Nierentransplantats aus der Gruppe ‚allo NTx d14 + Anti-CD20‘ zwei Wochen post NTx: mononukleäres Zellinfiltrat.....	73
Abb. 45: Immunhistologische B-Zell-Färbung eines Nierentransplantats aus der Gruppe ‚allo NTx d14 + NaCl‘ zwei Wochen post NTx.	74
Abb. 46: Immunhistologische B-Zell-Färbung eines Nierentransplantats aus der Gruppe ‚allo NTx d14 + Anti-CD20‘ zwei Wochen post NTx.	75
Abb. 47: Immunhistologische T-Zell-Färbung eines Nierentransplantats aus der Gruppe ‚allo NTx d14 + NaCl‘ zwei Wochen post NTx.	76
Abb. 48: Immunhistologische T-Zell-Färbung eines Nierentransplantats aus der Gruppe ‚allo NTx d14 + Anti-CD20‘ zwei Wochen post NTx.	76
Abb. 49: Immunhistologische Makrophagen-Färbung eines Nierentransplantats aus der Gruppe ‚allo NTx d14 + NaCl‘ zwei Wochen post NTx.	77

Abb. 50: Immunhistologische Makrophagen-Färbung eines Nierentransplantats aus der Gruppe
,allo NTx d14 + Anti-CD20' zwei Wochen post NTx.....78

Tabellenverzeichnis

Tab. 1: MHC-Haplotypen der verschiedenen LEW-Stämme.	20
Tab. 2: In der Durchflusszytometrie verwendete AK.....	31
Tab. 3: Für die Färbung von DSA verwendete AK.....	34
Tab. 4: Für die immunhistologische Färbung verwendete AK.	42
Tab. 5: Aus dem Versuch ausgeschlossene Tiere mit Ausschlussgrund.	44
Tab. 6: Punkteanzahl nach Stimulation von LEW.1W Splenozyten mit PMA + Ionomycin bzw. Concanavalin A.	66
Tab. 7: Reaktivität des Normaltieres und des Versuchstieres (allo NTx) auf die Spenderzellen, nachdem diese für 20 Stunden nach dem Auftauen inkubierten.	67
Tab. 8: IFN γ -Aktivität von stimulierten Spenderzellen, nachdem diese verschiedene Inkubationszeiten nach dem Auftauen durchliefen.	67
Tab. 9: Reaktivität der Zellen des Versuchstieres auf die Spenderzellen, die verschiedene Inkubationszeiten nach dem Auftauen durchliefen.	67
Tab. 10: Reaktivität von Wista-Zellen auf Spenderzellen.	68
Tab. 11: Reaktivität der Zellen in erhöhter Zellkonzentration und nach verlängerter Inkubationszeit auf Spenderzellen.	69
Tab. 12: Versuchsgruppen im EliSpot.....	69

Formelverzeichnis

Formel 1: Formel zur Berechnung der Leukozytenzahl mit der Neubauer-Zählkammer.	28
Formel 2: Berechnung des Lymphozytenanteil im Vollblut.	33
Formel 3: Formel zu Berechnung des Endergebnisses an DSA.....	34
Formel 4: Formel zur Berechnung des Endergebnisses im EliSpot.....	39

Anhangsverzeichnis

Anhang 1: Belastungskriterien / Abbruchkriterien	122
Anhang 2: Gewicht der Versuchstiere über den Versuchsverlauf von 4 Wochen.....	123
Anhang 3: Durchschnittliche Kreatinin-Werte der Versuchsgruppen zu verschiedenen Zeitpunkten.	123
Anhang 4: Lymphozytenzahlen (CD45 ⁺) im peripheren Blut in % und Mrd / l.....	124
Anhang 5: T-Zellen gesamt (CD3 ⁺) im peripheren Blut in % und Mrd / l.....	124
Anhang 6: T-Helfer-Zellen (CD3 ⁺ CD4 ⁺) im peripheren Blut in % und Mrd / l.....	124
Anhang 7: Zytotoxische T-Zellen (CD3 ⁺ CD8 ⁺) im peripheren Blut in % und Mrd / l.....	125
Anhang 8: NKT-Zellen (CD3 ⁺ CD161 ⁺) im peripheren Blut in % und Mrd / l.....	125
Anhang 9: Regulatorische T-Zellen (CD4 ⁺ CD25 ⁺) im peripheren Blut in % und Mrd / l.....	125
Anhang 10: Regulatorische T-Zellen (CD4 ⁺ FoxP3 ⁺) im peripheren Blut in % und Mrd / l.....	126
Anhang 11: NK-Zellen (CD3 ⁻ CD161 ^{high}) im peripheren Blut in % und Mrd / l.....	126
Anhang 12: B-Zellen gesamt (CD45RA ⁺ IgG ⁺) im peripheren Blut in % und Mrd / l.....	126
Anhang 13: Transitional 1 B-Zellen (IgD ^{low} IgM ^{medium}) im peripheren Blut in %.....	127
Anhang 14: Transitional 2 B-Zellen (IgD ^{high} IgM ^{high}) im peripheren Blut %.....	127
Anhang 15: Naive reife B-Zellen (IgD ^{medium} IgM ^{medium}) im peripheren Blut in %.....	127
Anhang 16: Switched B-Zellen (IgD ⁻ IgM ⁻) im peripheren Blut in %.....	127
Anhang 17: T-Zellen gesamt (CD3 ⁺) in der Milz in %.....	128
Anhang 18: T-Helfer-Zellen (CD3 ⁺ CD4 ⁺) in der Milz in %.....	128
Anhang 19: Zytotoxische T-Zellen (CD3 ⁺ CD8 ⁺) in der Milz in %.....	128
Anhang 20: NKT-Zellen (CD3 ⁺ CD161 ⁺) in der Milz in %.....	128

Anhang 21: NK-Zellen (CD3 ⁻ CD161 ^{high}) in der Milz in %.	128
Anhang 22: B-Zellen gesamt (CD45RA ⁺ IgG ⁺) in der Milz in %.	129
Anhang 23: Transitional 1 B-Zellen (IgD ^{low} IgM ^{medium}) in der Milz in %.	129
Anhang 24: Transitional 2 B-Zellen (IgD ^{high} IgM ^{high}) in der Milz in %.	129
Anhang 25: Naive reife B-Zellen (IgD ^{medium} IgM ^{medium}) in der Milz in %.	129
Anhang 26: Switched B-Zellen (IgD ⁻ IgM ⁻) in der Milz in %.	129
Anhang 27: T-Zellen gesamt (CD3 ⁺) in den Lymphknoten in %.	130
Anhang 28: T-Helfer-Zellen (CD3 ⁺ CD4 ⁺) in den Lymphknoten in %.	130
Anhang 29: Zytotoxische T-Zellen (CD3 ⁺ CD8 ⁺) in den Lymphknoten in %.	130
Anhang 30: NKT-Zellen (CD3 ⁺ CD161 ⁺) in den Lymphknoten in %.	130
Anhang 31: NK-Zellen (CD3 ⁻ CD161 ^{high}) in den Lymphknoten in %.	130
Anhang 32: B-Zellen gesamt (CD45RA ⁺ IGG ⁺) in den Lymphknoten in %.	131
Anhang 33: Transitional 1 B-Zellen (IgD ^{low} IgM ^{medium}) in den Lymphknoten in %.	131
Anhang 34: Transitional 2 B-Zellen (IgD ^{high} IgM ^{high}) in den Lymphknoten in %.	131
Anhang 35: Naive reife B-Zellen (IgD ^{medium} IgM ^{medium}) in den Lymphknoten in %.	131
Anhang 36: Switched B-Zellen (IgD ⁻ IgM ⁻) in den Lymphknoten in %.	131
Anhang 37: Produktion an DSA im Gruppenvergleich	132
Anhang 38: Reaktivität der T-Zellen der Versuchstiere auf Spenderzellen im EliSpot.	132

1 Einleitung

1.1 Nierenerkrankungen

1.1.1 Prävalenz, Ursachen und Mortalität chronischer Nierenerkrankungen

Chronische Nierenerkrankungen stellen mit steigender Prävalenz eine zunehmende Belastung für unsere Gesundheitssysteme dar. Im Nordosten Deutschlands litten im Jahr 2016 17,3% der 45- bis 74-Jährigen an solch einer Erkrankung, die weltweite Prävalenz 2017 betrug 9,1% (697,5 Millionen Menschen) und der weltweite Anstieg der Prävalenz wird mit 26,9% für den Zeitraum von 2005 bis 2015 angegeben (Collaborators, 2016, Bruck et al., 2016, Collaboration, 2020). Diesem Trend liegen die ebenfalls steigenden Erkrankungsraten der ursächlichen Grunderkrankungen wie Diabetes mellitus und arterielle Hypertonie zugrunde. Weiterhin können (auto-)immunologische Erkrankungen und toxische Nephropathien zu chronischen Nierenerkrankungen führen. Während in Entwicklungsländern zusätzlich infektiös bedingte Glomerulonephritiden für chronische Nierenerkrankungen verantwortlich gemacht werden, sind in Industrienationen hauptsächlich Hyperlipidämie, Rauchen und Übergewicht als Risikofaktoren und das zunehmende Altern der Gesellschaft für die steigende Prävalenz maßgeblich. (Meguid El Nahas und Bello, 2005, Kurts et al., 2013) 2017 starben 1,2 Millionen Menschen weltweit und 16284 Menschen in Zentraleuropa an den Folgen chronischer Nierenerkrankungen. Diese wurden als eine der beiden Todesursachen mit dem größten Wachstum von 1990 bis 2010 identifiziert. (Lozano et al., 2012, Collaboration, 2020)

Durch gleiche Risikofaktoren stellen sie auch ein erhebliches Risiko für kardiovaskuläre Erkrankungen und Mortalität dar (Wetmore und Collins, 2016, Meier-Kriesche und Schold, 2005). Damit werden die große Bedeutung und Herausforderung, die mit der Zunahme chronischer Nierenerkrankungen für die Gesundheitssysteme entstehen, deutlich.

Diese Zahlen machen deutlich, dass es notwendig ist, die Anstrengungen zur Verbesserung von Präventionsmaßnahmen, frühen Therapien und der Zugänglichkeit zu adäquaten Nierenersatzverfahren zu intensivieren (Wetmore und Collins, 2016).

1.1.2 Nierenersatzverfahren

Zu den Nierenersatzverfahren zählen die Hämodialyse, Hämofiltration, Hämodiafiltration, Peritonealdialyse und die Nierentransplantation (NTx).

Der Hämo- und Peritonealdialyse liegt der Mechanismus der Diffusion an einer semipermeablen Membran zugrunde, wofür das aufzubereitende Blut auf der einen Seite der Membran mit einer speziellen Dialysierflüssigkeit auf der anderen Membranseite zusammengebracht wird. Die Hämodialyse ist ein extrakorporales Verfahren, während die Peritonealdialyse ein intrakorporales System darstellt, bei dem das Peritoneum als Membran fungiert. Da die Hämodialyse sehr kreislaufbelastend ist, ist hier ein ausreichendes Blutvolumen und -

Kreislaufstabilität des*der Patient*in notwendig. Bei der Hämofiltration wird durch Aufbau eines Druckgradienten über einer Filtermembran ein Ultrafiltrat gebildet, wobei dem Körper durch die Strömung die harnpflichtigen Substanzen mit entzogen werden (sogenanntes Konvektionsprinzip). Es wird keine Dialysierflüssigkeit benötigt. Dieses Verfahren entzieht dem Organismus große Mengen an Flüssigkeit, welche durch entsprechende Elektrolytlösungen substituiert wird. Die Hämodiafiltration stellt eine Kombination der Hämodialyse und der Hämofiltration dar. (Klinge und Brodmann, 2017, Schneuzer und Kreft, 2019)

Die verschiedenen Verfahren können kontinuierlich oder intermittierend durchgeführt werden. Bei letzterem wird circa alle ein bis drei Tage für 4 bis 7 Stunden dialysiert. Bei chronisch niereninsuffizienten Patient*innen kommen die Hämodialyse, Hämodiafiltration, Peritonealdialyse und die NTx zum Einsatz. Im Akutfall und bei intensivpflichtigen Patient*innen wird vornehmlich die Hämodialyse aber auch die Hämofiltration eingesetzt, je nach Zustand des*der Patient*in und gewünschtem Effekt. Bei kreislaufstabilen Patient*innen werden eher intermittierende Dialyseverfahren gewählt und bei instabilen Patient*innen aufgrund der geringeren Kreislaufbelastung eher kontinuierliche Verfahren. (Schneuzer und Kreft, 2019, Klinge und Brodmann, 2017, Beimler et al., 2008, Galle und Lopau, 2008)

Im Vergleich der verschiedenen Verfahren konnte die NTx als die kosteneffektivste Methode, mit der gleichzeitig geringsten Mortalität und größten Lebensqualität ermittelt werden (Ortiz et al., 2014). Dieses Ergebnis ist über verschiedene Patientenkohorten konstant und stellt die NTx als Therapie der Wahl bei Nierenerkrankungen im Endstadium dar (Wolfe et al., 1999, Meier-Kriesche und Schold, 2005).

1.2 Nierentransplantation

1.2.1 Allokation der Transplantate

Die Nierenspende für eine Transplantation (Tx) kann als Lebend- oder Verstorbene spende hirntoter Organspender*innen erfolgen. Bei letzterer wird die Niere durch Transplantationschirurg*innen entnommen und in Deutschland mit Hilfe des Eurotransplant Kidney Allocation System (ETKAS) nach festgelegten Kriterien (Anzahl an HLA-Mismatches, Mismatch-Wahrscheinlichkeit, Wartezeit, Distanz zwischen den Transplantationszentren, Import-Export-Balance) an eine Person auf der Warteliste vergeben (Persijn, 2006, Mayer und Persijn, 2006).

Die Lebendspende kann auch unter nicht genetisch miteinander verwandten Individuen erfolgen (Davis und Delmonico, 2005). Dabei folgt die Allokation national unterschiedlichen Richtlinien und Verteilungsverfahren.

Die Nephrektomie der Spender*innen erfolgt heute standardmäßig in einem minimalinvasiven Eingriff (Davis und Delmonico, 2005). Im Vergleich zu einer offenen Nephrektomie birgt

das minimalinvasive Verfahren weniger postoperative Komplikationen und eine kürzere Rehabilitationsphase für die Nierenspende*rinnen (Gupta et al., 2005).

1.2.2 Operationsverfahren

Die Durchführung der NTx hat sich seit der ersten erfolgreichen NTx 1955 in identischen Zwillingen nicht ausschlaggebend verändert. Das Transplantat wird bis auf Ausnahmen heterotop und extraperitoneal, vorzugsweise in die Fossa iliaca transplantiert (Suthanthiran und Strom, 1994, Murray et al., 2001). Der Zugangsweg erfolgt bei Erwachsenen normalerweise über einen Gibson Schnitt (Kahan und Ponticelli, 2000). Die arterielle und venöse Anastomose erfolgt in End-zu-Seit-Technik auf die Iliakalgefäße der empfangenden Person (Olschewski et al., 2016). Die Kontinuität des Harnapparats wird für gewöhnlich mittels einer Ureteroneocystostomy wiederhergestellt (Kahan und Ponticelli, 2000).

1.2.3 Komplikationen und Mortalität post NTx

Komplikationen, die mit der NTx einhergehen, treten unterschiedlich häufig auf: Chirurgische Komplikationen sind eher selten (5-10%) und bestehen vorrangig aus postoperativen Blutungen. Ebenfalls selten sind urologische Komplikationen (4-8%), Wundheilungsstörungen (5%) und neoplastische Erkrankungen (6%). Die Prävalenz von vaskulären Komplikationen variiert je nach Entität zwischen <1% bei renalen arteriellen Thrombosen und 10% bei der renalen arteriellen Stenose. Zu den metabolischen Komplikationen zählt zum Beispiel die Hypercalciämie, die bei circa 15% der Patient*innen auftritt. Infektiologische Komplikationen, wie Abszesse und Infektionen, stellen mit Prävalenzen bis zu 80% den weitaus größten Teil an postoperativen Komplikationen dar. (Humar und Matas, 2005, Akbar et al., 2005)

Bei den immunologischen Komplikationen sind die verschiedenen Abstoßungsformen zu nennen: Das Risiko der hyperakuten Transplantatabstoßung wurde mit Einführung der Kreuzprobe vor der NTx fast eliminiert (Kahan und Ponticelli, 2000, Murphy et al., 2009). Eine akute Abstoßungsreaktion ist sechs Monate nach der NTx bei circa 8,8% der Patient*innen zu beobachten und bei 1% der NTx-Patient*innen führt diese im ersten postoperativen Jahr zu einem Transplantatverlust (El-Zoghby et al., 2009, Flechner et al., 2005). Die chronische Abstoßungsform führt zu einem jährlichen Verlust von 3-5% der Transplantate (Pascual et al., 2002).

Im ersten Jahr nach der NTx beträgt die Mortalität eines*einer erwachsenen Nierentransplantat-Empfänger*in circa 3%. Dabei stellen Infektionen, kardiovaskuläre Ereignisse und maligne Prozesse die häufigsten Todesursachen dar. Risikofaktoren für Mortalität sind vor allem ein höheres Alter, aber auch ein geringerer sozioökonomischer Status, vorbestehende Komorbiditäten und eine Nieren-Verstorbenenpende. (Farrugia et al., 2014) Die Ein-Jahres-Überlebensrate eines Nierentransplantates nach einer Verstorbenenpende

beträgt circa 93,4% und die Fünf-Jahres-Überlebensrate circa 72,4%. Unabhängig von der spezifischen Immunsuppression beträgt das Ein-Jahres-Überleben eines*iner NTx Patient*in nach einer Verstorbenenenspende circa 97% und die Fünf-Jahres-Überlebensrate circa 86,1%. (Ekberg et al., 2007, Wang et al., 2016)

1.3 Das humane Immunsystem

Das Immunsystem muss gewährleisten, dass ein Mensch wirksam vor pathogenen Mikroorganismen oder pathologisch veränderten eigenen Zellen geschützt wird. Dafür sind verschiedene Zellen und Moleküle verantwortlich, die den zwei Komponenten des Immunsystems zugeteilt werden: Die angeborene Immunabwehr ist die grundlegende Immunreaktion von jedem Organismus, die unspezifisch ist und innerhalb von Minuten (Min) bis Stunden greift. Dagegen entwickelt sich die adaptive Immunabwehr mit einer zeitlichen Verzögerung, weist durch ihre hohe Spezifität jedoch auch eine größere Effektivität auf. (Murphy et al., 2009)

1.3.1 Angeborene Immunabwehr

Überwindet ein Pathogen die chemischen und physikalischen Barrieren des Körpers, wird das angeborene Immunsystem aktiviert und reagiert innerhalb von Stunden. Die ersten Zellen, die aktiv werden, sind die phagozytierenden Leukozyten, wie Makrophagen, Granulozyten und dendritische Zellen. (Murphy et al., 2009) Sie erkennen Pathogene anhand unspezifischer regelmäßiger Muster molekularer Strukturen und einfacher Moleküle – pathogenassoziierte molekulare Muster (PAMP, engl.: pathogen-associated molecular pattern) – die viele Krankheitserreger aufweisen. Die PAMPs werden von den Mustererkennungsrezeptoren (PRR, engl.: pattern recognition receptors) der Phagozyten gebunden, was zu deren Aktivierung führt. (Kawai und Akira, 2010, Medzhitov und Janeway, 1997) Die aktivierten Zellen eliminieren die Pathogene dann durch Phagozytose. Außerdem sezernieren sie Chemokine und Interferone. Dadurch und durch direkte Zellinteraktionen wird die adaptive Immunantwort aktiviert. (Medzhitov und Janeway, 1997)

Eine weitere Komponente der angeborenen Immunabwehr bilden die natürlichen Killerzellen (NK-Zellen), die ebenfalls durch die Signalproteine der Phagozyten aktiviert werden (Biron et al., 1999). Sie erkennen virusinfizierte und mutierte Zellen und induzieren über die Freisetzung zytotoxischer Granula den programmierten Zelltod der Zielzelle. So können Virusinfektionen eingedämmt werden und Tumorzellen ohne vorherige Sensibilisierung abgetötet werden. (Vivier et al., 2011, Pratschke et al., 2009) Weiterhin sezernieren sie immunregulatorische Zytokine wie zum Beispiel Interferon (IFN) γ und Tumor Nekrose Faktor (TNF) α und vermitteln die AK abhängige zelluläre Zytotoxizität. Phänotypisch werden sie charakterisiert durch die Abwesenheit des T-Zell-Rezeptor (TCR, engl.: t cell receptor)

Komplexes und der Expression der Oberflächenmoleküle CD56 (engl.: Cluster of differentiation) und zu einem großen Teil ebenfalls von CD16. (Pratschke et al., 2009)

1.3.2 Adaptive Immunabwehr

Kann ein Pathogen die angeborene Immunantwort überwinden, greift das adaptive Immunsystem. Es entwickelt sich langsamer, kann Infektionen durch eine hohe Spezifität dann aber effektiver bekämpfen. Die B- und T-Lymphozyten (B-Zellen und T-Zellen) sind die Effektorzellen. Jeder Lymphozyt trägt eine spezifische Variante eines Antigenrezeptorprototyps auf seiner Zelloberfläche, womit er ein einzelnes Antigen (Ag) erkennt. (Murphy et al., 2009) Durch somatische Rekombination bildet die Lymphozytenpopulation ein unendlich großes Repertoire an Rezeptorvarianten, sodass fast jedes existierende Ag erkannt werden kann (Nemazee, 2000). Bei Kontakt mit seinem Ag differenziert ein Lymphozyt zum funktionell reifen Lymphozyten aus, was bis zu vier Tage in Anspruch nehmen kann. Nach einer erfolgreich abgelaufenen adaptiven Immunantwort mit Beseitigung des Pathogens ist die wichtigste Konsequenz die Ausbildung des immunologischen Gedächtnisses. Ein Teil der aktivierten Lymphozyten stirbt nicht durch Apoptose ab und entwickelt sich zur Gedächtniszelle (GZ). Kommt es später zum erneuten Kontakt mit dem spezifischen Ag der abgelaufenen Immunreaktion, differenzieren sich die GZ schnell zu Effektorlymphozyten. Das immunologische Gedächtnis gewährleistet dadurch eine schnellere Reaktion bei Zweitinfektion mit einem Pathogen. (Murphy et al., 2009)

1.3.3 Aktivierung von T-Zellen

Die zellvermittelte Komponente der adaptiven Immunität wird unter anderem von den T-Zellen gebildet. Nach ihrer Entwicklung im Thymus können T-Zellen anhand von CD-Oberflächenmolekülen in zwei Hauptklassen unterteilt werden: zytotoxische T-Zellen, die CD8 positiv ($CD8^+$) sind, und CD4 positive ($CD4^+$) T-Helfer- (T_H -) Zellen und regulatorische T-Zellen (Tregs) (Teh et al., 1988). T-Zellen erkennen ihr spezifisches Ag nur, wenn es auf der Zelloberfläche von einem MHC-Molekül (major histocompatibility complex, beim Menschen auch als HLA bezeichnet, engl.: human leucocyte antigen), gebunden in einem Komplex, präsentiert wird. Bei den MHC-Molekülen handelt es sich um einen Komplex, der dem Immunsystem Peptidfragmente aus der Zellumgebung präsentiert. Man unterscheidet MHC-Klasse-I-Moleküle, die von allen kernhaltigen Körperzellen exprimiert werden, von MHC-Klasse-II-Molekülen, die ausschließlich auf Ag präsentierenden Zellen (APC, engl.: antigen presenting cell) zu finden sind. Auf MHC-I Molekülen werden zytosolische Peptide präsentiert, auf MHC-II-Molekülen werden von extrazellulär aufgenommene und in Vesikeln prozessierte Peptidfragmente präsentiert. Bei der Bindung des TCR an den spezifischen Peptid-MHC-Komplex kann nur mit Hilfe der Corezeptoren CD4 und CD8 eine effektive Bindung des Komplexes entstehen: $CD4^+$ T-Zellen binden an das MHC-II- und $CD8^+$ T-

Zellen an das MHC-I-Molekül. (Banchereau et al., 2000, Murphy et al., 2009) Durch diesen spezifischen Kontakt (Signal 1) kommt es zur Aktivierung des TCR. Es folgt die Aggregation der TCR, der Corezeptoren und anderer Oberflächenmoleküle, sodass sich am Ort des Zellkontaktes eine immunologische Synapse ausbildet. Die damit einhergehende Polarisierung des Zytoskeletts der T-Zelle bewirkt, dass Effektormoleküle ausschließlich an der Kontaktstelle mit der Zielzelle sezerniert werden. (Murphy et al., 2009) Zur Aktivierung der T-Zelle sind vorerst aber noch zwei weitere Signale notwendig. Signal 2 sind kostimulierende Zellkontakte und Signal 3 Zytokine der APC, deren Spezifität von der Mikroumgebung abhängt (Lenschow et al., 1996). Die Aktivierung der T-Zelle führt zur Proliferation und Differenzierung verschiedener Effektor-T-Zellen: CD8⁺ T-Zellen entwickeln einen homogenen zytotoxischen Phänotyp und eliminieren virusinfizierte- oder pathologisch entartete Zellen (Mosmann et al., 1997). CD4⁺ T-Zellen entwickeln sich abhängig von den sezernierten Zytokinen (Signal 3) in verschiedene Effektorzellen (T_H1-, T_H2-, T_H17-Zellen, Tregs), die weitere Zellen aktivieren oder regulieren (Abbas et al., 1996).

1.3.3.1 Zytotoxische T-Zellen

Die CD8⁺ T-Zellen töten ihre Zielzelle, indem sie zytotoxische Granula am Ort der immunologischen Synapse freisetzen. Dazu gehören Granzyme, Perforin, Granulysin und der Fas-Ligand, die in der Zielzelle die Apoptose induzieren. Weitere Effektormoleküle sind IFN γ und TNF α . (Harty et al., 2000, Murphy et al., 2009, Mosmann et al., 1997) Nach der Immunreaktion entwickeln sich circa 5-10% der zytotoxischen Effektorzellen zu CD8⁺ T-GZ. Der Rest der Population stirbt durch Apoptose ab. (Wherry und Ahmed, 2004)

1.3.3.2 T-Helferzellen

Die von den APC sezernierten, verschiedenen Zytokine (Signal 3), lösen die Differenzierung der CD4⁺ T-Zellen zu verschiedenen Typen von Effektorzellen aus.

Bei einem von IFN γ und Interleukin (IL) 12 geprägten Zytokinmuster entwickelt sich die CD4⁺ T-Zelle zu T_H1-Zellen. (Zhu und Paul, 2010) Diese Zellgruppe sezerniert hauptsächlich IFN γ , aber unter anderem auch TNF α , GM-CSF und CD40-Ligand. Über die resultierende Aktivierung von Makrophagen sind die T_H1-Zellen vor allem für die effektive Bekämpfung intrazellulärer Mikroorganismen verantwortlich. (Mosmann und Coffman, 1989, Suzuki et al., 1988) Außerdem tragen sie zur Koordination der B-Zell-Aktivität bei (Murphy et al., 2009).

T_H2-Zellen entwickeln sich, wenn die APC vorwiegend IL4 sezernieren. Mit Hilfe der Effektormoleküle der T_H2-Zellen (unter anderem: IL4, IL5, IL13, CD40-Ligand, GM-CSF) werden B-Zellen aktiviert und zum Isotypenwechsel angeregt. (Zhu und Paul, 2010, Mosmann und Coffman, 1989) Diese T-Zellen spielen also eine besondere Rolle in der Induktion der

humoralen Immunabwehr und somit auch in der Abwehr extrazellulärer Parasiten und der Entstehung allergischer Reaktionen (Murphy et al., 2009).

Wird das Zytokinmuster bei Aktivierung der T-Zelle von IL6 und TGF- β (Transforming Growth Factor) bestimmt, differenziert die Zelle zur T_H17-Zelle aus (Zhu und Paul, 2010). Dies ist vor allem in der Frühphase einer Immunantwort gegen extrazelluläre Mikroorganismen, wie Pilze und Bakterien, der Fall. Die T_H17-Zellen produzieren vorwiegend IL17, IL22, IL6, sodass es zur Rekrutierung von Neutrophilen kommt und die akute Entzündung gefördert wird. (Weaver et al., 2006, Zhu und Paul, 2010)

Nach erfolgreicher Eliminierung des Erregers, wird die pathogenspezifische T-Zell-Population durch Apoptose beseitigt und nur ein geringer Anteil bleibt als T-GZ erhalten. Durch erneute Stimulation mit dem spezifischen Ag kommt es zur Reaktivierung dieser Zellen und einer schnelleren und effektiveren Reaktion, sodass eine Erkrankung verhindert wird. (Murphy et al., 2009)

1.3.3.3 Regulatorische T-Zellen

Die Gruppe der Tregs trägt dazu bei, Immunreaktionen zu unterdrücken und spielt in der Genese von Autoimmunerkrankungen eine große Rolle (Sakaguchi et al., 1995, Gershon und Kondo, 1971). Bezüglich ihres Ursprungs unterscheidet man natürliche von adaptiven Tregs (Curotto de Lafaille und Lafaille, 2009). Die regulatorische Funktion der phänotypisch als CD4⁺ CD25⁺ definierten natürlichen Tregs, wird bereits während ihrer Entwicklung im Thymus festgelegt (Sakaguchi et al., 1995, Modigliani et al., 1996). Ein essentielles Charakteristikum dieser Tregs ist der von ihnen exprimierte Transkriptionsfaktor FoxP3 (engl.: Forkhead Box P3). Unter TGF- β -Einfluss kommt es in der Peripherie zur Ausdifferenzierung der natürlichen Tregs. (Sakaguchi, 2011, Sakaguchi et al., 2008)

Die heterogene Untergruppe der adaptiven Tregs entwickelt sich peripher aus noch nicht vorgeprägten naiven CD4⁺ T-Zellen unter IL10-Einfluss aus der Mikroumgebung (Curotto de Lafaille und Lafaille, 2009, Murphy et al., 2009).

Die suppressiven Effekte der Tregs erfolgen über verschiedene Mechanismen, wobei sich die Funktionen der beiden Gruppen überschneiden und ergänzen (Vignali et al., 2008). Sie sezernieren inhibitorische Zytokine wie IL35, IL10 und TGF- β und können durch Granzyme ihre Zielzellen mittels Perforin-abhängiger Zytolyse direkt töten (Li et al., 2006, Grossman et al., 2004). Zwei weitere Mechanismen führen zur Inhibierung der Aktivierung und Proliferation von Effektor-T-Zellen: im teils direkten Zellkontakt modulieren sie die Funktion von APCs und über die gesteigerte Expression von CD25 (Teil des IL2-Rezeptors) konkurrieren sie mit T-Zellen um IL2 (Pandiyani et al., 2007, Murphy et al., 2009, Vignali et al., 2008).

1.3.4 B-Zellen

Neben T-Zellen sind die Mitte der 60er und 70er Jahre entdeckten B-Zellen die zentralen Akteure der adaptiven Immunantwort (Cooper et al., 1965, Kwan und Norman, 1974). Indem sie Immunglobuline (Ig) – auch Antikörper (AK) genannt – produzieren, sind sie für die spezifische humorale Immunität verantwortlich. Von diesen Ig's, die gegen ein spezifisches Ag gerichtet sind, können nach Ausdifferenzierung der B-Zelle verschiedene Klassen gebildet werden (IgM, IgD, IgG, IgE, IgA). Sie dienen vor allem der Neutralisierung und Opsonisierung von Pathogenen, der Vermittlung der zellulären Zytotoxizität und der Komplementaktivierung. Die sezernierten Ig's weisen die gleiche Spezifität wie der membrangebundene B-Zell-Rezeptor (BCR, engl.: B cell receptor) der B-Zelle auf. Die Aktivierung der B-Zellen kann T-Zell-abhängig und –unabhängig erfolgen. (Murphy et al., 2009) Daran sind neben T-Zellen auch dendritische Zellen, Makrophagen, Granulozyten und natürliche Killer T-Zellen (NKT-Zellen) beteiligt (Cerutti et al., 2012). Abhängig von löslichen und zellulären Faktoren im Mikromilieu entwickeln sich B-Zellen zu Plasmazellen, B-GZ oder weiteren Subtypen (Nagasawa, 2006, Hardy et al., 1982).

1.3.4.1 Entwicklung von B-Zellen und B-Zell-Subpopulationen

Im adulten Organismus erfolgt die B-Zell-Entwicklung im Knochenmark aus hämatopoetischen Stammzellen. Abhängig vom Mikromilieu führen die einzelnen Differenzierungsschritte zur Entstehung einer reifen B-Zelle mit einem funktionalen, nicht selbstreaktiven BCR. (Nagasawa, 2006, Rosenberg und Kincade, 1994) Dieses membranständige Ig erkennt und bindet hochspezifisch Ag. Die Spezifität des BCR entsteht mit Hilfe der somatischen Rekombination, bei der die vielen Segmente der Ig-Gene zufällig umgelagert werden. (Jung et al., 2006) So entsteht ein riesiges Repertoire an verschiedenen AK-Spezifitäten, die als BCR auf der Zelloberfläche exprimiert werden (Gilfillan et al., 1993).

In der frühen Entwicklungsphase werden die B-Zell-Stadien vor allem durch die Schritte der somatischen Rekombination bestimmt: Von der frühesten Zelle der B-Zell-Linie – der frühen Pro-B-Zelle – entwickelt sie sich über Zwischenschritte zur unreifen B-Zelle, die erstmals ein IgM-Molekül als BCR auf ihrer Zelloberfläche trägt (Murphy et al., 2009). Der Antigenrezeptor wird nun auf Selbsttoleranz selektioniert: Bei Erkennung von Selbstantigenen kommt es zur negativen Selektion, Veränderung der Spezifität mittels Rezeptoreditierung oder Anergie der B-Zelle (Edry und Melamed, 2004). Die überlebenden B-Zellen sind naive unreife B-Zellen. Sie verlassen das Knochenmark und werden dann als Transitional B-Zellen (T B-Zellen) bezeichnet, die in die Milz migrieren. Diese Übergangsform ist sehr kurzlebig. Durch einen weiteren genetischen Umbau exprimieren sie zusätzlich IgD. Anhand der Dichte der Oberflächen-Ig's können zwei Untergruppen diskriminiert werden: Transitional 1 B-Zellen (T1 B-Zellen) zeigen im Gegensatz zu Transitional 2 B-Zellen (T2 B-Zellen) geringe Level an IgD auf ihrer Oberfläche, beide zeigen aber hohe Level an IgM. (Durand et

1.3.4.2 Aktivierung von B-Zellen

Erkennt und bindet der BCR sein spezifisches Ag, bewirkt dies, dass es endozytiert und prozessiert wird. An ein MHC-II-Molekül gebunden wird es auf der Zelloberfläche der B-Zellen präsentiert. Zur vollständigen Aktivierung sind Ko-Signale erforderlich. Im Falle von thymusabhängigen (TD, engl.: t-cell-dependent) Ag, stammen sie von bereits differenzierten antigenspezifischen T_H-Zellen. Zytokine dieser Zellen induzieren die Proliferation und Differenzierung der B-Zelle zu AK-produzierenden Plasmazellen und GZ. Um die Antigenaffinität der Ig's zu erhöhen, kommt es mit T-Zell-Hilfe zur Affinitätsreifung und zum AK-Klassenwechsel. (MacLennan et al., 1997, O'Rourke et al., 1997)

Bei Thymusunabhängigen (TI, engl.: t-cell-independent) Ag stammen die weiteren Signale von den Pathogenen selbst. In diesem Aktivierungsmodus kann aufgrund der fehlenden T-Zell-Interaktion kein AK-Klassenwechsel und keine Affinitätsreifung erfolgen. So kann der Körper auf manche Erreger zwar sehr rasch aber nur unspezifisch reagieren. (MacLennan et al., 2003)

1.3.4.3 Regulatorische B-Zellen (Bregs)

Auch B-Zellen können regulatorische Funktionen aufweisen. Sie phänotypisch einheitlich zu beschreiben ist bisher allerdings noch nicht gelungen. Gemeinsam ist ihnen die Sekretion von IL10 als zentraler Mediator. Proinflammatorische Prozesse werden dadurch inhibiert und die Bildung von Tregs gefördert. Auch weitere Effekte, wie die Inhibierung der IFN γ - und TNF α -Sekretion konnten bisher nachgewiesen werden. (Mauri und Bosma, 2012, Mauri und Menon, 2015)

1.4 Abstoßungsreaktionen

Reagiert das Immunsystem des Empfängerorganismus auf das Transplantatgewebe, wird dies als Abstoßungsreaktion bezeichnet. Unbehandelt führt sie zum Funktionsverlust des Transplantats. Abstoßungsreaktionen werden nach ihrem zeitlichen Auftreten und der zugrunde liegenden Pathophysiologie in drei Gruppen eingeteilt: hyperakut, akut und chronisch.

1.4.1 Hyperakute Transplantatabstoßung

Die hyperakute Transplantatabstoßung tritt unmittelbar nach der Reperfusion des Transplantats auf. Klinisch kennzeichnend sind die, innerhalb von Min bis Stunden auftretende, bläuliche Verfärbung der Niere und eine Anurie. Grund für die Reaktion sind präformierte AK der Empfänger*innen gegen allogene (allo) Blutgruppen-Ag und MHC-Ag. Diese können durch unterschiedliche AB0-Systeme bereits vorhanden sein oder als Reaktion auf vorangegangene Bluttransfusionen, Tx oder im Rahmen einer Schwangerschaft gebildet worden sein. Nach Reperfusion reagieren die allo-AK auf Ag des Transplantat-Gefäßendothels

und aktivieren die Gerinnungskaskade und das Komplementsystem. Es kommt zur Thrombenbildung und nachfolgend zur Ischämie und Zerstörung des Gewebes. Die hyperakute Abstoßungsreaktion ist potentiell lebensbedrohlich, sodass die Transplantat-Nephrektomie die einzige effektive Therapie darstellt. Durch die Einführung der Kreuzprobe vor der NTx konnte das Risiko, diese Abstoßungsform zu entwickeln, auf ein Minimum gesenkt werden. Dabei werden präformierte AK im Serum der Empfänger*innen detektiert und die Zuordnung von Transplantat und Empfänger*in kann optimiert werden. (Kahan und Ponticelli, 2000, Murphy et al., 2009)

1.4.2 Akute Transplantatabstoßung

Die akute Transplantatabstoßung zeigt sich klinisch durch Fieber, Druckschmerzhaftigkeit über dem Transplantat, Flüssigkeitsretention, Oligurie und Proteinurie. Aufgrund der fehlenden Spezifität dieser Symptome wird differentialdiagnostisch immer eine akute Abstoßung in Erwägung gezogen, sobald sich eine akute Dysfunktion des Transplantats in Form eines Plasma-Kreatinin-Anstiegs äußert. Da sich die klinische Diagnose einer akuten Abstoßungsreaktion schwierig gestaltet, muss zur Sicherung eine Biopsie durchgeführt werden. (Kahan und Ponticelli, 2000) Je nach zu Grunde liegender Pathophysiologie unterscheidet man die akute zelluläre Abstoßungsreaktion von der akuten humoralen Abstoßungsreaktion (Cornell et al., 2008).

1.4.2.1 Akute zellulär vermittelte Transplantatabstoßung

Bei der akuten zellulären Abstoßungsreaktion kommt es durch Erkennung fremder MHC-I- und -II-Moleküle zur interstitiellen Akkumulation von mononukleären Zellen – insbesondere $CD4^+$ T-Zellen und $CD8^+$ T-Zellen, aber auch Makrophagen. Durch die Sekretion von zytotoxischen Granula (Perforin, Granzym A und B), Zytokinen ($IFN\gamma$, $TNF\beta$) und Chemokinen (CCL5, CCL3), sowie die Hochregulierung zytotoxischer Liganden kommt es zur Tubulitis. Häufig wird diese von einer Endothelialitis und gelegentlich einer Glomerulitis begleitet. (Cornell et al., 2008) Therapeutisch wird diese Form der Abstoßung mit einer parenteralen Corticosteroid-Bolustherapie behandelt. Zusätzlich muss die Basis-Immunsuppression angepasst werden. Bei Steroid-refraktären Abstoßungsreaktionen kann außerdem ein T-Zell depletierender AK verabreicht werden. (Bamoulid et al., 2015, Kidney Disease: Improving Global Outcomes Transplant Work, 2009)

1.4.2.2 Akute humoral vermittelte Transplantatabstoßung

Die akute humorale Abstoßung tritt seltener auf als die zellvermittelte Form und kann mit- oder ohne T-Zell-Komponente auftreten (El-Zoghby et al., 2009, Cornell et al., 2008). Durch AK, die sich gegen verschiedene Ag auf den Oberflächen der Zellen der Spender*innen richten – sogenannte Donor-spezifische Antikörper (DSA) – kommt es in peritubulären- und

glomerulären Kapillaren zur Aktivierung des Komplementsystems und zur Chemoattraktion von Monozyten und Neutrophilen. Effektorproteine dieser Zellen führen zu einer Abnahme der Kapillarfensterung, zur Ablösung der Basalmembran und zur Entstehung von Mikrothromben. Im Zusammenspiel mit NK-Zellen führen die AK außerdem zur Lyse von Endothelzellen. In schweren Fällen dieser Abstoßungsform kommt es zusätzlich zu Blutungen, Nekrosen der arteriellen Gefäßwände und Infektionen. (Cornell et al., 2008)

Wie bei der akuten zellvermittelten Abstoßung wird den Patient*innen auch bei der humoralen Abstoßungsreaktion eine Corticosteroid-Bolustherapie verabreicht. Zusätzlich wird therapeutisch auf die Produktion und Eliminierung von DSA durch Plasmazellen eingewirkt. Möglichkeiten dafür sind die intravenöse Gabe von Ig zur Unterdrückung und Modulation der AK-Produktion, oder AK, die gegen Lymphozyten gerichtet sind, wie zum Beispiel Rituximab (RTX) und die Plasmapherese. (Amore, 2015, Kidney Disease: Improving Global Outcomes Transplant Work, 2009)

1.4.3 Chronische Transplantatabstoßung

Die chronische Abstoßungsreaktion kann sich Wochen bis Jahre nach der NTx entwickeln. Die langsame Abnahme der glomerulären Filtrationsrate, kombiniert mit Proteinurie und arterieller Hypertension, ist klinisch wegweisend. Diese Abstoßungsform resultiert aus einer nicht adäquat aufrechterhaltenen Immunsuppression und bildet die gemeinsame Endstrecke mehrerer Pathologien. (Kahan und Ponticelli, 2000) Sie werden in alloreaktiv und nicht alloreaktiv eingeteilt: Die alloreaktiven Mechanismen entsprechen in ihrer Pathophysiologie denen der akuten Abstoßung. Der einzige Unterschied ist, dass sie hier subklinisch verlaufen und so zu einem langsam fortschreitenden Funktionsverlust des Organs führen. Zu den nicht alloreaktiven Komponenten gehören zum Beispiel Ischämie-Reperfusionsschäden, Infektionen oder Calcineurininhibitor-Toxizität, die das Organ langfristig schädigen. Das Zusammenspiel dieser Mechanismen führt zu einer chronischen Entzündung. (Murphy et al., 2009, Nankivell und Kuypers, 2011) Histopathologische Charakteristika sind: Fibrose, arteriosklerotische Ablagerungen in den Gefäßen und Atrophie der Glomeruli und Tubuli (Cornell et al., 2008). Dies führt letztlich zum irreversiblen Organversagen. Therapeutisch wird die Immunsuppression mit weniger nephrotoxischen Medikamenten optimiert und ACE-Hemmer oder AT-1-Rezeptor-Inhibitoren zur Reduzierung der Proteinurie eingesetzt. (Nankivell und Kuypers, 2011)

1.5 Konventionelle Immunsuppression

Um die Funktion des Transplantats zu erhalten, werden Patient*innen nach einer Organtransplantation mit einer immunsuppressiven Therapie behandelt. Ziel dieser Therapie ist es, die Abwehrreaktion gegen das fremde Organ zu unterdrücken. Dafür muss die medikamentöse Abstoßungsprophylaxe permanent und lebenslang eingenommen werden.

Gewöhnlich besteht sie aus einer anfänglichen Induktionstherapie und einer sich anschließenden Erhaltungstherapie. Alle eingesetzten Medikamente bergen durch die gewünschte Wirkung der Immunsuppression das Risiko, Infektionskrankheiten und maligne Erkrankungen als Nebenwirkungen zu begünstigen.

1.5.1 Induktionstherapie

Die Induktionstherapie ist eine hoch intensive Immunsuppression, die Patient*innen entweder vor, während oder direkt nach der Tx – meistens jedoch kurz vor der Reperfusion des Transplantats – erhalten, da das Risiko einer Transplantatabstoßung zu diesem Zeitpunkt am höchsten ist. Die Wahl des exakten Induktionsschemas erfolgt heute nach genauer Risiko-Nutzen-Abwägung individuell für jeden*jede Patient*in. Es werden dafür insbesondere folgende Immunsuppressiva eingesetzt: Glucocorticoide, Antithymozytenglobulin-AK und anti-CD25 AK. Ziel der Induktionstherapie ist es, eine frühe akute Abstoßungsreaktion zu verhindern und im Falle einer Immunreaktion, ihre Intensität abzumildern und somit das Transplantatüberleben zu verlängern. (Enderby und Keller, 2015, Hardinger et al., 2013, Hill et al., 2017)

1.5.2 Erhaltungstherapie

Die Erhaltungstherapie stellt die lebenslange Basistherapie von transplantierten Patient*innen dar. Das Ziel ist ebenfalls eine akute Abstoßungsreaktion, hier allerdings zu einem späteren Zeitpunkt, zu verhindern und das Transplantatüberleben zu gewährleisten. Die Therapie wird zum Zeitpunkt der Operation begonnen und die Dosen der einzelnen Medikamente mit der Zeit adjustiert und reduziert. So soll ein optimales Gleichgewicht erreicht werden, zwischen dem Risiko von Infektionen und Malignomen – als Nebenwirkungen der Immunsuppression – einerseits und einer ausreichenden immunsupprimierenden Wirkung andererseits.

Dafür hat sich die Kombination verschiedener Medikamente mit unterschiedlichen Wirkmechanismen als sinnvoll herausgestellt: Die Einzeldosen können geringer gehalten werden und so Nebenwirkungen, die mit jedem einzelnen Wirkstoff assoziiert sind, minimiert und die Effektivität in Bezug auf die Suppression des Immunsystems maximiert werden. Das am weitesten verbreitete konventionelle Therapieschema ist eine Dreifachkombination aus einem Calcineurininhibitor, einem Antimetaboliten und Prednisolon. (Kidney Disease: Improving Global Outcomes Transplant Work, 2009, Enderby und Keller, 2015, Denton et al., 1999)

1.5.3 Glucocorticoide

Glucocorticoide, wie Prednisolon inhibieren den intrazellulären Transkriptionsfaktor NF- κ B, wodurch sie über die Hemmung zahlreicher Entzündungs- und Immunmediatoren die

humorale und zelluläre Immunantwort herunterregulieren. Daher haben sie einen generellen anti-entzündlichen und immunsupprimierenden Effekt. Aufgrund von vielen potentiellen Nebenwirkungen (zum Beispiel Hypertonie, Glucoseintoleranz, Dyslipidämie, Elektrolytverschiebungen, Glaukom, psychiatrische Nebenwirkungen, Osteoporose etc.) wird in der Glucocorticoidtherapie immer eine möglichst geringe Dosis angestrebt. Kontrovers diskutiert wird dabei auch ein graduelles Ausschleichen der Glucocorticoide in der Erhaltungstherapie stabiler Transplantatempfänger*innen. (Denton et al., 1999, Enderby und Keller, 2015, Gallant und Kenny, 1986)

1.5.4 Calcineurininhibitoren

Calcineurininhibitoren sind ein wichtiger Bestandteil der immunsuppressiven Therapie nach einer Organtransplantation: Bei über 90% der Nierentransplantatempfänger*innen in den USA sind sie fester Bestandteil der Erhaltungstherapie (Hart et al., 2016). Verwendet werden die Wirkstoffe Ciclosporin und Tacrolimus. Über die Inhibierung der Proteinphosphatase Calcineurin, die ein Schlüsselenzym der TCR Signalkaskade darstellt, wird die Sekretion von insbesondere IL2, aber auch weiteren immunstimulierenden Zytokinen (zum Beispiel TNF α , IFN γ , IL3) gehemmt. Die Aktivierung und Proliferation von T-Zellen wird somit heruntergefahren und es resultiert die Inhibierung der zellulären Immunantwort. (Denton et al., 1999, Matsuda und Koyasu, 2000)

Eine gefürchtete Nebenwirkung der Calcineurintherapie ist die Nephrotoxizität, die zur Ausbildung einer chronischen Transplantatnephropathie beitragen kann. Weiterhin kann es zu neurotoxischen Wirkungen kommen (im Speziellen zu Tremor, Schwindel, Depressionen, Schlaf- und Sehstörungen etc.), sowie zu einer Glukoseintoleranz. Unter einer Therapie mit Tacrolimus kommt es häufiger zu neurotoxischen Nebenwirkungen und der Entwicklung eines Diabetes Mellitus. Patient*innen, die mit Ciclosporin behandelt werden, zeigen hingegen häufiger weitere Nebenwirkungen, wie Hypertonie, Hyperlipidämie, Hirsutismus und Gingivahyperplasie. Um Nebenwirkungen möglichst gering zu halten, werden regelmäßige Spiegelkontrollen durchgeführt und die Dosierung der Medikamente individuell angepasst. In der Klinik wird Tacrolimus meist Ciclosporin vorgezogen, da es bei einer größeren Potenz ein günstigeres Nebenwirkungsprofil zeigt. (Denton et al., 1999, Enderby und Keller, 2015)

1.5.5 Antimetabolite

Zu den Antimetaboliten werden die Wirkstoffe Azathioprin und Mycophenolat-Mofetil (MMF) gezählt. Beide inhibieren die zelluläre und humorale Immunantwort. Azathioprin wirkt, indem es als Purin-Analogon die DNA-Synthese inhibiert. MMF hemmt die De-Novo-Synthese von Purinbasen, die unerlässlich ist für die Proliferation von T- und B-Zellen, sodass es durch diesen Wirkstoff zu einer potenteren und selektiveren Inhibierung dieser Lymphozyten kommt. Mehrere Studien haben gezeigt, dass die Inzidenz an Abstoßungsreaktionen

unter MMF geringer ist als unter einer Azathioprin-Therapie, weshalb MMF in den meisten Zentren in der Standard-Immunsuppression Azathioprin vorgezogen wird. Unter der Therapie mit Antimetaboliten kann es zu einer dosisabhängigen Myelosuppression kommen, weshalb zu Beginn der Therapie regelmäßige Blutbildkontrollen durchgeführt werden müssen. Weitere mögliche Nebenwirkungen sind gastrointestinale Symptome. Die gravierendste Nebenwirkung von Azathioprin ist eine Leukopenie. Weiterhin kann eine Therapie mit diesem Wirkstoff in seltenen Fällen zu einer Pankreatitis, Hepatitis und Nicht-Melanom-Hautkrebs führen. (Enderby und Keller, 2015, Allison, 2005, Denton et al., 1999)

1.5.6 mTor-Inhibitoren

Die mTOR-Inhibitoren Sirolimus und Everolimus werden alternativ zu Antimetaboliten und Calcineurininhibitoren oder in Kombination mit Calcineurininhibitoren eingesetzt. Durch die Hemmung der mTOR-Kinase kommt es zu einer Inhibierung der IL2-gesteuerten T-Zell-Proliferation und somit zu einer verminderten zellulären Immunantwort. Therapieschema mit mTOR-Inhibitoren sind mit einem geringeren Risiko an CMV-Infektionen assoziiert. Nebenwirkungen dieser Medikamente sind Hyperlipidämie und Thrombozytopenie, die dosisabhängig auftreten. Weiterhin kommt es bei Patient*innen, deren Kombinationstherapie mTOR-Inhibitoren enthält, häufiger zu Lymphozelen und einer Myelosuppression. (Enderby und Keller, 2015, Hahn et al., 2019, Denton et al., 1999)

1.5.7 Antikörper

Der Einsatz von AK in der Induktionstherapie wird dann in Erwägung gezogen, wenn Calcineurininhibitoren erst später eingesetzt werden können oder die Glucocorticoid-Dosis reduziert werden soll. Weiterhin werden manche AK (T-Zell-depletierende AK) zur Therapie von Abstoßungsreaktionen verwendet. Ein Vorteil der AK-Therapien ist eine geringere Inzidenz von akuten Abstoßungsgeschehen. Dem gegenüber stehen allerdings ein erhöhtes Risiko für die Entwicklung von Infektionskrankheiten oder malignen Erkrankungen und hohe Therapiekosten.

Eingeteilt werden die AK-Therapien in T-Zell-depletierende- und nicht-T-Zell-depletierende AK. Zu Ersteren gehören das Antithymozytenglobulin, Muromonab-CD3 und Alemtuzumab (anti-CD52). Neben der Depletion von T-Zellen werden durch sie teilweise auch weitere Immunzellen depletiert. Zu den nicht-T-Zell-depletierenden AK zählen Daclizumab und Basiliximab, die den IL2-Rezeptor antagonisieren und somit zu einer Hemmung von T-Zell-Funktionen führen. Des Weiteren wird zur Erhaltungstherapie der AK Belatacept eingesetzt, der die Oberflächenmoleküle CD80 und CD86 auf APC blockiert. Dadurch wird ihre Interaktionsfähigkeit mit T-Zellen gestört und in der Folge die T-Zell-Aktivierung inhibiert. (Enderby und Keller, 2015, Denton et al., 1999, Hardinger et al., 2013, Masson et al., 2014)

1.6 Anti-CD20 AK

1.6.1 Molekulare Grundlagen

Der Anti-CD20 AK ist ein monoklonaler chimärer Mensch-Maus IgG1-AK, der sich gegen CD20 auf B-Zellen richtet (Reff et al., 1994). Dieses transmembranäre Oberflächenmolekül ist ein Differenzierungsmarker. Er wird auf den Zellstadien von der Prä-B- bis zur reifen B-Zelle exprimiert, von frühen B-Vorläuferzellen und Plasmazellen wird er allerdings nicht gebildet. (Cragg et al., 2005) Die Funktion von CD20 ist nicht abschließend geklärt. Man vermutet eine regulatorische Funktion beim Calciumtransport in die Zelle, der B-Zell-Aktivierung und Proliferation. Wird das CD20-Molekül durch den CD20 AK besetzt, ist keine Signalübertragung durch den BCR möglich. (Freissmuth et al., 2016, Tedder et al., 1986, Bubien et al., 1993)

1.6.2 Wirkmechanismen

Die Bindung des AK an CD20 induziert unterschiedliche Mechanismen, die zum Tod der CD20⁺ Zellen führen. Über die Aktivierung der Komplementkaskade kommt es zur Komplement-vermittelten Zytotoxizität, über den Fcγ-Rezeptor zu einer AK-abhängigen zellvermittelten Zytotoxizität. Außerdem wird vermutet, dass die AK-Bindung auch direkt die Apoptose induzieren kann. Resultat ist die Depletion der CD20⁺ Zellen. (Reff et al., 1994, Freissmuth et al., 2016) Da frühe B-Vorläuferzellen CD20⁻ sind, regeneriert sich die B-Zell-Population im Verlauf wieder (Grillo-Lopez et al., 2000).

1.6.3 Anwendungsbereiche

Ende der 90er Jahre wurde der Anti-CD20 AK RTX für die Behandlung von Non-Hodgkin-Lymphomen entwickelt (Grillo-Lopez et al., 1999). Heute ist er in Europa zusätzlich zur Therapie der chronischen lymphatischen Leukämie, der Rheumatoiden Arthritis, Pemphigus vulgaris und der Granulomatose mit Polyangiitis und mikroskopische Polyangiitis zugelassen (Roche, 2020). Ohne Zulassung (sogenannter Off-Label-Use) wird er zunehmend bei immunologischen Nieren- und rheumatologischen Erkrankungen eingesetzt (Kronbichler et al., 2017, Schioppo und Ingegnoli, 2017).

1.6.4 Anwendung in der Transplantationsmedizin

Die Behandlung von Abstoßungsreaktionen variiert zwischen Transplantationseinrichtungen. In einer Umfrage in den USA gaben 28,6% (8 / 28) an, RTX in der Behandlung der humoralen Abstoßung routinemäßig zu verwenden (Burton et al., 2015). Die Verwendung erfolgt dabei ohne Zulassung. In der Therapie der akuten humoralen Abstoßung konnten in bisherigen Studien keine übereinstimmenden Ergebnisse zur Wirkung von RTX gewonnen werden: Teilweise wirkte sich die Behandlung positiv auf Transplantatüberleben und -

funktion aus, in anderen Studien konnten allerdings keine Vorteile durch die RTX-Therapie erzielt werden. In der Behandlung chronischer humoraler Abstoßungsreaktionen überwiegen Studienergebnisse, die keinen Vorteil zeigen oder sogar nachteilige Effekte implizieren. Die heterogene Studienlage zeigt, dass die Evidenz zur Verwendung von RTX in der Abstoßungstherapie sehr schwach ist. (Macklin et al., 2017)

1.7 MHC-Komplex im kongenen Rattentransplantationsmodell

Der bereits erwähnte MHC-Komplex definiert eine Zelle aufgrund seines hochgradigen Polymorphismus und Polygenie als körpereigen. So dient er dem Immunsystem nicht nur zur Präsentation von Pathogenen, sondern erlaubt auch die Differenzierung zwischen fremden und eigenen Zellen. (Stephens et al., 1999) Im Zuge einer allo-Tx wird dies besonders wichtig. Allo bezeichnet dabei die Herkunft des transplantierten Gewebes: es wird zwischen zwei Individuen derselben Spezies übertragen. Anhand der allo-MHC-Moleküle erkennt das Immunsystem der Empfänger*innen die Zellen des transplantierten Gewebes als fremd. Es wird aktiviert gegen die fremden Zellen vorzugehen und es kommt zur Alloreaktivität mit nachfolgender Abstoßung. (Hernandez-Fuentes et al., 1999) Damit dies verhindert wird, erhalten Patient*innen nach einer Organtransplantation eine immunsuppressive Therapie. Um die Abstoßungsreaktion eines Nierentransplantates und den Einfluss einer Therapie mit einem Anti-CD20 AK unter standardisierten Bedingungen untersuchen zu können, wurde in der vorliegenden Arbeit das Rattentransplantationsmodell ohne Immunsuppression von Pöhnert et al. verwendet. Das Modell ermöglicht die Beurteilung MHC-bezogener Abstoßungsreaktionen, da zwei zueinander MHC-kongene Rattenstämme verwendet wurden: Bis auf die MHC-I und -II Gensegmente sind die Stämme genetisch identisch. (Poehnert et al., 2010)

Das Immunsystem der Ratte ähnelt nach bisherigem Forschungsstand dem des Menschen, sodass die Übertragbarkeit von Daten aus Rattenmodellen gegeben ist. Der MHC-Komplex der Ratte unterscheidet sich minimal von dem des Menschen: Die RT1.B/D-Region bildet den MHC-II-Komplex. Die zwei Regionen des MHC-I-Komplexes sind die centromer gelegene RT1.A-Region und die telomerwärts gelegene RT1.C-Region. (Dressel et al., 2001)

1.8 Zielsetzung und Fragestellung

Wie sich die Depletion von B-Zellen durch eine Anti-CD20 AK-Therapie genau auf die Interaktionen von Immunzellen und die immunologischen Abläufe einer akuten Transplantatabstoßung auswirkt, ist bisher noch nicht geklärt (Macklin et al., 2017, Xu et al., 2013, Kamburova et al., 2013). Dabei steht auch die Frage im Raum, ob die Behandlung mit dem Anti-CD20 AK im Zuge einer Abstoßungsreaktion prinzipiell überhaupt zu positiven Effekten führt oder sogar auch negative Effekte verursacht oder begünstigt. Ziel dieser Arbeit ist es, den Einfluss der CD20⁺ B-Zell-Depletion auf die Pathophysiologie der akuten zellulär

vermittelten- und der akuten humoral vermittelten Transplantatabstoßung näher zu untersuchen. Insbesondere wird die Auswirkung der B-Zell-Depletion auf die T-Zell-Funktion und somit auf die Zellinteraktionen durchleuchtet. Dafür wurde ein AK verwendet, der wie RTX im Menschen, CD20⁺ B-Zellen in der Ratte depletiert. Folgende Fragen wurden betrachtet:

1. Wie verändert sich die Zusammensetzung der B-Zell-Subpopulationen durch die Anti-CD20 Therapie?
2. Welche Auswirkung hat die Depletion auf die AK-Produktion der B-Zellen?
3. Sind die T-, NK- und NKT-Zellen von Transplantat-Empfänger*innen nach der B-Zell-Depletion reaktiver?
4. Beeinflusst die Anti-CD20 AK Therapie die Population Toleranz-induzierender Zellen, wie regulatorische B- und T-Zellen?
5. Wie ist das Nierengewebe zwei Wochen nach der NTx organisiert?
6. Welche Zellen sind im Zellinfiltrat in den Transplantaten nachweisbar und wie ist der Einfluss des Anti-CD20 AK auf die Zusammensetzung dieser Infiltrate?

Diese Fragen sollten mit Hilfe des MHC-kongenem Rattentransplantationsmodells unter Einbeziehung von durchflusszytometrischen Analysetechniken, histologischen Untersuchungen sowie der Anwendung eines Enzyme Linked Immuno Spot Assay's (EliSpot) bearbeitet werden.

2 Material und Methoden

Im Folgenden Text werden chemische Bezeichnungen abgekürzt. Die vollen chemischen Namen sind im Abkürzungsverzeichnis am Ende der Arbeit aufgeführt.

2.1 Genehmigung der Tierversuche

Die Tierversuche und die damit einhergehenden Experimente wurden im Vorhinein gemäß dem Tierschutzgesetz genehmigt. Das zugehörige Aktenzeichen ist G11/046. Alle Eingriffe an der Ratte wurden unter Berücksichtigung der Richtlinien des Tierschutzgesetzes durchgeführt. Der Basiskurs zum tierexperimentellen Arbeiten mit der Maus wurde im März 2016 von der Doktorandin am Universitätsklinikum Hamburg Eppendorf absolviert und qualifizierte somit zum nicht-invasiven Arbeiten mit den Versuchstieren.

2.2 Tiermodell

Die Tierexperimente wurden in der Versuchstierhaltung der Forschungseinrichtung „Campus Forschung“ des Universitätsklinikums Hamburg Eppendorf durchgeführt.

Die Versuchsratten wurden dafür aus der Zucht der Medizinischen Hochschule Hannover bezogen. Das Tierlaboratorium des Universitätsklinikums Hamburg Eppendorf, unter Leitung von Dr. rer. nat. Andreas Haemisch, gewährleistete eine artgerechte Haltung der Versuchsratten: Sie hatten dauerhaft Zugang zu Wasser und Nahrung ad libitum und ein konstanter Tag-Nacht-Rhythmus wurde eingehalten. Außerdem bestanden standardisierte atmosphärische Bedingungen.

Zur Beantwortung der zu Anfangs gestellten Fragen wurde ein NTx-Modell für eine akute gemischt zellulär und humorale Abstoßungsreaktion ohne Immunsuppression in kongenen Rattenstämmen, welches von Poehnert et al. etabliert wurde, verwendet (Poehnert et al., 2010).

Es sind männliche Ratten der kongenen Inzuchtstämme LEWIS (LEW) und LEWIS.1W (LEW.1W) verwendet worden. Ihr genetischer Hintergrund ist mit Ausnahme der MHC-Haplotypen identisch (Tabelle 1 (Tab.), Abb.2). Für Vorversuche wurden außerdem Ratten des Auszuchtstammes Wistar eingesetzt, die von der Tierzucht des UKE bezogen wurden.

Tab. 1: MHC-Haplotypen der verschiedenen LEW-Stämme.

Der MHC-Komplex in der Ratte wird als RT1-Komplex bezeichnet. Im Gegensatz zum Menschen besitzt dieser zwei MHC-Klasse-I Regionen. Die zentromerwärts gelegene Region wird als „RT1.A“ bezeichnet und die telomerwärts gelegene als „RT1.C“. Die MHC-Klasse-II Region werden in der Ratte als „RT1.B/D“ bezeichnet. Die Buchstaben „l“ und „u“ stellen die unterschiedlichen Haplotypen der RT1-Komplexe zwischen den beiden Rattenstämmen dar. Abk.: MHC = major histocompatibility complex, LEW = LEWIS, LEW.1W = LEWIS.1W. (Dressel et al., 2001, Kunes et al., 1996).

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

2.3 Nierentransplantation in der Ratte

LEW Männchen erhielten ein allovitales Nierentransplantat von MHC-kongeneten alters- und gewichtsentsprechenden LEW.1W Männchen. Zum Zeitpunkt der NTx waren die Versuchstiere circa zwei Monate alt und wogen 230 bis 320 g. Die allo NTx wurde, wie durch Koch et al. beschrieben, durchgeführt (Koch et al., 2005). Vor der Implantation der Transplantatnieren wurde eine Nephrektomie der linken Eigennieren des Empfängers durchgeführt. Die Transplantatnieren wurden dann orthotop transplantiert. Dabei wurde die Ischämiezeit der Niere unter 30 Min gehalten. Die Ureteranastomose erfolgte End-zu-End ohne Verwendung eines Stents. Um das Überleben der Tiere bis zum Versuchsende zu gewährleisten, wurde auf eine Nephrektomie der rechten Niere verzichtet.

Der Eingriff erfolgte in einer 3%-igen Isofluran-Inhalationsnarkose mit einer Sauerstoffflussrate von 0,8 l / Min. Als Schmerzmedikation wurde intraoperativ Novaminsulfon subcutan injiziert (100 mg / kg Körpergewicht (KG)). Postoperativ wurde Novaminsulfon (125 mg / 200 ml) zur Analgesie dem Trinkwasser beigegeben.

Die gesamten Operationen wurden freundlicherweise von Sabrina Christiansen für mich durchgeführt.

Es wurden sechs Versuchsgruppen generiert (n = Anzahl, d = Tag):

Versuchsgruppe 1 (n = 2): LEW-Normaltiere

Die Tiere in dieser Gruppe erhielten keine Behandlung und dienten somit als Kontrollgruppe.

Versuchsgruppe 2 (n = 3): LEW-Normaltier + Anti-CD20

Den drei Tieren dieser Gruppe wurde zu Versuchsbeginn der B-Zell depletierende AK Anti-CD20 intravenös mit einer Konzentration von 1 mg pro kg KG injiziert. Alle drei Tiere wurden planmäßig sieben Tage nach der Injektion getötet.

Versuchsgruppe 3 (n = 5): allo NTx (LEW.1W → LEW) d14 + NaCl

Zu Versuchsbeginn erfolgte die allo NTx LEW.1W → LEW. Sieben Tage nach der Operation wurden die Tiere mit 300 µl NaCl intravenös behandelt. Am 14. Tag nach der OP wurden alle fünf Tiere planmäßig getötet.

Versuchsgruppe 4 (n = 6): allo NTx (LEW.1W → LEW) d14 + Anti-CD20

Die allo NTx LEW.1W → LEW stellte den Start des Versuches dar. Sieben Tage nach der NTx wurde den Tieren der Anti-CD20 AK intravenös injiziert. Alle Tiere wurden planmäßig an Tag 14 nach der OP getötet.

Versuchsgruppe 5 (n = 3): allo NTx (LEW.1W → LEW) d30 + NaCl

Die drei Tiere wurden zu Versuchsbeginn einer allo NTx LEW.1W → LEW unterzogen. Am siebten Tag nach dem Eingriff wurde ihnen je 300 µl NaCl intravenös injiziert. Planmäßig wurden die Tiere vier Wochen nach der Operation getötet. Diese Versuchsgruppe wurde 2015 bereits von einer im gleichen Labor arbeitenden Masterstudentin erhoben.

Versuchsgruppe 6 (n = 5): allo NTx (LEW.1W → LEW) d30 + Anti-CD20

Alle fünf Tiere erhielten am Versuchsanfang eine allo NTx LEW.1W → LEW. Sieben Tage nach der Operation wurden die Tiere mit dem Anti-CD20 AK intravenös behandelt. Die Euthanasie der fünf Tiere fand planmäßig in der vierten Woche post OP statt. Auch diese Versuchsgruppe wurde von der Masterstudentin 2015 generiert.

Der mouse anti rat CD20 AK, wurde von der Firma Genentech bezogen (CD20 ID: OR-211486; mIgG2a 5D2) und bei -80°C gelagert. Die Ausgangskonzentration betrug 29 mg / ml und eingesetzt wurde eine Konzentration von 1 mg / kg KG. Um das Injektionsvolumen zu vergrößern, wurde die entsprechende Konzentration in einer 1:10 Verdünnung mit NaCl auf ein Gesamtvolumen von 300 µl eingestellt. Die Lösung wurde in die Vena dorsalis penis subfascialis injiziert.

Material

Isofluran		Abbvie, USA
Narkosegerät Isofluran Vaporizer		Rothacher & Partner, Schweiz
Rasierapparat favorita 2 GT 104		Aesculap, Deutschland
Mikroskop SZ61		Carl Zeiss Surgical, Deutschland
Nahtmaterial	10 – 0 Ethilon	
	8 – 0 Ethilon	
	3 – 0 Vicryl	Ethicon, USA
	6 – 0 Seide	Catgut, USA
Wattestäbchen		Karl Beese, Deutschland
Mullkompressen		Fink & Walter, Deutschland

Tabotamp	Ethicon, USA
Foliodrape	Hartmann, Deutschland
Hochfrequenz Chirurgie Gerät Erbotom ICC 50	Erbe, Deutschland
Heparin-Rotexmedica	Rotexmedica, Deutschland
Venenverweilkatheter	Braun, Deutschland
Novaminsulfon-Ratiopharm® (Injektionslösung & Tropfen)	Ratiopharm, Deutschland
NaCl	Braun, Deutschland
OP-Besteck	Fine Science Tools, Deutschland
Einmal-Injektions-Kanülen	Braun, Deutschland
Einwegspritze 10 ml	Braun, Deutschland
Insulinspritze	Braun, Deutschland
1 ml Spritze	Braun, Deutschland
Haut-Desinfektionsspray	Bode Chemie, Deutschland
3M Transpore Pflaster	3M, Deutschland
Knetgummi	

2.4 Überwachung des Zustandes der Versuchstiere

2.4.1 Überwachung des Allgemeinzustandes

Im postoperativen Verlauf wurde der Allgemeinzustand der Tiere in den ersten 48 Stunden nach der NTx zwei Mal täglich überprüft und im weiteren Versuchsverlauf einmal täglich. Dabei wurden Parameter wie KG, Körperhaltung, Bewegung und Verhalten des Tieres, Fellbeschaffenheit, Nahrungsaufnahme aber auch die Ausscheidung der Ratten kontrolliert. Außerdem wurden auf versuchsspezifische Kriterien, wie Platzbauch, Hämatom am Auge und Serumkreatinin geachtet. Entsprechend dem im Tierversuchsantrag festgelegten Belastungsscore wurde für jedes Tier täglich ein Punktwert ermittelt. Je nach Höhe des Scores wurden verschiedene Maßnahmen eingeleitet. Überschritt der Score 20 Punkte für mehr als 24 Stunden, bedeutete dies, dass der Allgemeinzustand des Tieres nicht mehr zu tolerieren ist. Das Tier musste dann vorzeitig aus dem Versuch genommen und eingeschläfert werden.

Die originale Scoringtabelle ist dem Anhang dieser Arbeit beigefügt (Anhang 1).

Material

Waage	Wedo, Deutschland
-------	-------------------

2.4.2 Überwachung der Nierenfunktion

Überwachung im metabolischen Käfig

Zur Überwachung der Nierenfunktion anhand der Bestimmung der Albuminkonzentration im Urin der Versuchstiere, wurden die Tiere für 24 Stunden in einem metabolischen Käfig beobachtet. Dies erfolgte einmal vor der NTx und einmal in der zweiten Woche nach dem Eingriff. Die Tiere hatten freien und unlimitierten Zugang zu Futter und Wasser. Kot und Urin wurden separat aufgefangen. Nach 24 Stunden wurde die Menge an produziertem Urin notiert. 1 ml des Urins wurde durch Zentrifugation (3600 rounds per minute (rpm), Raumtemperatur (RT), 5 Min) gereinigt und bis zur Messung bei -20°C gelagert.

Material

Metabolische Käfige	Leihgabe der Forschungstierhaltung des UKE
Centrifuge MiniSpin® plus	Eppendorf, Deutschland
Reagiergefäße 1,5 ml	Sarstedt, Deutschland

Bestimmung von Serumkreatinin

Zur weiteren Überwachung der Nierenfunktion wurden die Serumkreatinin-Werte der Tiere bestimmt. Dies erfolgte zum Zeitpunkt der retrobulbären Blutentnahme mit 32 µl EDTA-Vollblut. Das Blut wurde auf einen Kreatinin-Teststreifen gegeben und mit Hilfe eines Kreatinin-Analysators gemessen.

Material

EDTA-Röhrchen	Sarstedt, Deutschland
Reflotron Creatinine Teststreifen	Roche Diagnostics, Schweiz
Kreatinin-Analysator Reflovet Plus	Roche Diagnostics, Schweiz

2.5 Probengewinnung und –lagerung

2.5.1 Retrobulbäre Blutentnahme

Zur Blutentnahme wurde das Versuchstier in eine kurze Isofluran-Narkose gelegt (Dauerstoffflussrate von 0,8 l / Min und 3-5% Isofluran). Dem Tier wurde dann eine Glaskapillare unter drehenden Bewegungen in den inneren Augenwinkel eingeführt und der retrobulbär liegende Venenplexus angestochen. Das Blut wurde für die Fluorescence-activated cell sorting-Analyse (FACS-Analyse) in einem EDTA-Röhrchen und für die Serumgewinnung in einem Reaktionsgefäß aufgefangen. Zur Blutstillung wurde die Punktionsstelle komprimiert und anschließend Augen- und Nasensalbe zur Pflege auf das Auge aufgetragen.

Material

Glaskapillaren	Brand, Deutschland
----------------	--------------------

Heparin-Röhrchen
Augen- und Nasensalbe

Sarstedt, Deutschland
Bepanthen, Deutschland

2.5.2 Serumgewinnung

Für die Färbung von Donor-spezifischen AK musste das Serum aus dem peripheren Blut isoliert werden. Damit das Blut vollständig gerinnen konnte, stand es für mind. 2 Stunden. Zur Aufreinigung des Serums wurde das Blut zentrifugiert (3500 rpm, RT, 5 Min) und das Serum anschließend bei -20°C gelagert.

Material

Centrifuge 5417R

Eppendorf, Deutschland

Serumaufbereitung für die Immunhistologie

In der Immunhistologie wird Rattenserum verwendet, um unspezifische Bindungen zwischen AK und Proteinen im Gewebe zu verhindern. Zur Aufbereitung des Rattenserums wurde es für mind. 2 Stunden stehen gelassen und im Anschluss hitzeinaktiviert (56°C für 30 Min). Nach Aufreinigung durch zweimalige Zentrifugation (3200 rpm, RT, 30 Min) wurde das überstehende Serum in 1,5 ml Reaktionsgefäße überführt und bei -20°C gelagert.

Material

Zentrifugationsröhrchen 15 ml

Greiner Bio-One, Deutschland

2.5.3 Töten der Versuchstiere

Am Ende des Versuches wurden die Versuchstiere in eine Isofluran-Narkose gelegt. Dem betäubten Tier wurde wie oben beschrieben Blut abgenommen. Dabei wurde ein EDTA-Röhrchen mit circa 500 µl Blut gefüllt, ein Heparin-Röhrchen mit circa 200 µl und für die Serumgewinnung ein 15 ml Zentrifugationsröhrchen mit so viel Blut wie möglich gefüllt. Anschließend wurde bei dem Tier mittels CO₂-Narkose ein Atemstillstand herbeigeführt und daraufhin eine Herzpunktion mit Aspiration des Blutes durchgeführt. Dies führte zum Tod des Tieres.

Nach der Fixierung des Tieres auf einer Korkmatte wurde das Fell mit 70%igem Ethanol desinfiziert und anschließend mit der Unterhaut von der Körperfaszie getrennt. Die Bauchhöhle wurde bis zum Rippenbogen eröffnet und eine Exploration des Bauchraumes vorgenommen. Anschließend wurde die NTx Niere entnommen und von ihrer Kapsel befreit. Nach einer ausführlichen phänotypischen Beschreibung wurde die Niere mit einer sterilen Skalpellklinge transversal in zwei Hälften geteilt. Eine Hälfte wurde für pathologische Untersuchungen in Formalin (4%) konserviert. Für immunohistochemische Zwecke wurde die

andere Hälfte in Cryo-Röhrchen überführt und in flüssigem Stickstoff kryokonserviert. Auch Gewebestücke der Leber wurden auf Stickstoff eingefroren.

Material

Petrischalen	Fisher Scientific, USA
Einwegskalpelle	Braun, Deutschland
Nunc Cryo-Röhrchen	Thermo Fisher Scientific, China
Rotilabo®-Schraubdeckeldosen	Roth, Deutschland
4% gep. Formalin	Universitätsklinikum Hamburg Eppendorf, Deutschland

2.5.4 Lymphozytenisolierung aus der Milz

Um Untersuchungen an Lymphozyten der Milz durchführen zu können, wurde dem getöte-ten Tier die Milz entnommen und portioniert. 2 / 5 des Organs wurden für immunhistoche-mische Zwecke in Cryo-Röhrchen in Stickstoff kryokonserviert. Der Rest der Milz wurde weiter zerkleinert und mit der Rückseite des Stempels einer 2 ml Spritze durch einen 70 µm Cellstrainer gedrückt. Dabei wurde das Gewebe kontinuierlich mit sterilem Medium 199 ge-spült, bis ein 50 ml Zentrifugationsröhrchen mit der Suspension gefüllt war. Bis zur weiteren Verarbeitung unter der Cleanbench wurde die Zellsuspension auf Eis gelagert. Alle folgen-den Schritte erfolgten bei 4°C. Die Probe wurde zentrifugiert (1500 rpm, 10 Min) und der Überstand anschließend verworfen. Um selektiv die Erythrozyten in der Probe zu lysieren, wurde das Pellet in 25 ml Erylysepuffer gelöst und für 5 Min inkubiert. Daraufhin wurde die Probe zwei Mal mit Medium 199 gewaschen. Um tote Zellen von lebendigen zu differenzie-ren, wurden sie mit Trypanblau gefärbt und anschließend mit der Zählkammer gezählt (de-taillierte Beschreibung der Zellzählung siehe Abschnitt 2.6.2).

Material

Einwegspritze 2 ml	Braun, Deutschland
70 µm Cellstrainer	BD Falcon, USA
Medium 199	Gibco Life Technologies, USA
Zentrifugationsröhrchen 50ml	Greiner Bio-One, Deutschland
Centrifuge 5804R	Eppendorf, Deutschland
Trypanblau	Invitrogen Life Technologies, USA

Erylysepuffer (pH 7,5)

NH ₄ Cl	155 mM
KHCO ₃	10 mM
EDTA	1 mM

Destilliertes (dest.) H₂O

ad 1000 ml

Der pH-Wert von 7,5 wurde mit HCl oder NaOH eingestellt, der Puffer steril filtriert und bei 4 °C im Dunkeln gelagert.

2.5.5 Lymphozytenisolierung aus den Lymphknoten

Auch die Lymphozyten der Lymphknoten wurden für Analysezwecke isoliert. Dafür wurden dem Tier die mandibulären-, zervikalen-, axillären-, iliakalen-, jejunalen- und ein Nierenständiger Lymphknoten entnommen. Letzterer wurde in flüssigem Stickstoff kryokonserviert, die anderen in eine mit Medium 199 gefüllte sterile Petrischale überführt. Pro Tier konnten circa 20-30 Lymphknoten geborgen werden. Anschließend wurde mit Hilfe von zwei Pinzetten die Kapsel der Lymphknoten zerstört, sodass die Lymphozyten austreten konnten. Die so entstandene Zellsuspension wurde, wie unter Punkt 2.5.5 beschrieben, in ein 50 ml Zentrifugationsröhrchen überführt. Bis zur weiteren Verarbeitung unter der Cleanbench wurde die Suspension auf Eis gelagert. Alle weiteren Schritte wurden bei 4°C durchgeführt. Die Zellsuspension wurde zentrifugiert (1500 rpm, 10 Min) und der Überstand verworfen. Das Zellpellet wurde daraufhin zwei Mal mit 25 ml Medium 199 gewaschen. Die Lebendzellzahlbestimmung erfolgte wie in Punkt 2.5.4.

Material

Einwegspritze 2 ml	Braun, Deutschland
70 µm Cellstrainer	BD Falcon, USA
Medium 199	Gibco Life Technologies, USA
Petrischalen	Nunc, Dänemark
Zentrifugationsröhrchen 50ml	Greiner Bio-One, Deutschland
Kryo-Röhrchen	Thermo Scientific, USA
Centrifuge 5804R	Eppendorf, Deutschland
Trypanblau	Invitrogen Life Technologies, USA

2.5.6 Kryokonservierung von Zellen

Um die Vitalität von Zellen über einen langen Zeitraum aufrecht zu erhalten, werden sie bei -196°C in flüssigem Stickstoff kryokonserviert. Zunächst muss dafür entsprechendes Einfriermedium hergestellt werden. Dazu werden FBS, welches durch einen hohen Proteingehalt eine Schutzfunktion für die Zellen bietet, und DMSO (ein Gefrierschutzmittel) verwendet (Freshney, 2016). In unterschiedlichen Konzentrationen werden diese mit Medium 199 zu zwei Einfriermedien verarbeitet.

Die Zellen wurden zentrifugiert (1500 rpm, 4°C, 10 Min), der Überstand verworfen, das Zellpellet im ersten Einfriermedium aufgenommen und eine Konzentration von 2×10^7 Zellen /

ml eingestellt. Die Probe wurde 5 Min auf Eis stehen gelassen. Für die weiteren Schritte ist schnelles Arbeiten erforderlich, da DMSO zelltoxisch wirkt (Douay et al., 1982). Tröpfchenweise wurde das zweite Einfriermedium zur Zellsuspension hinzugefügt und eine Konzentration von 1×10^7 Zellen / ml eingestellt. Je 1 ml der Zellsuspension wurde in ein Kryoröhrchen überführt und dieses in eine 4°C kalte Einfrierhilfedose sortiert. Die Dose wurde mind. über Nacht und maximal sieben Tage bei -80°C gelagert. Dann wurden die Kryoröhrchen zur dauerhaften Lagerung in flüssigen Stickstoff überführt.

Material

DMSO	Sigma-Aldrich, Deutschland
Einfrierhilfedose Nalgene Mr. Frosty	Sigma-Aldrich, Deutschland
Kryo-Röhrchen	Thermo Scientific, USA

Einfriermedium

Einfriermedium 1:	46% Medium 199
	54% FBS
Einfriermedium 2:	80% FBS
	20% DMSO

2.6 Lymphozytenmonitoring

2.6.1 Isolierung von Leukozyten aus dem peripheren Blut

Für die Aufarbeitung von Leukozyten aus dem peripheren Blut wurden 200-500 µl EDTA-Vollblut 1:10 mit Erylysepuffer versetzt. Nach 5-minütiger Inkubation wurde die Probe zentrifugiert (1500 rpm, 4°C, 10 Min) und der Überstand verworfen. Das Pellet wurde gelöst und mit Medium 199 auf 12 ml aufgefüllt. Es folgten zwei weitere Waschschrirte. Je nach Größe des Pellets, wurde es in 1-3 ml FACS-Waschpuffer gelöst und die Lebendzellzahlbestimmung wie unter 2.5.5 durchgeführt. Bis zur weiteren Verwendung wurde die Zellsuspension bei 4°C gelagert.

Material

Centrifuge 5810R	Eppendorf, Deutschland
------------------	------------------------

FACS-Waschpuffer

PBS	9,55 g
BSA	5 g
NaN3	1 g
Dest. H2O	ad 1000 ml

Die Lagerung des Puffers erfolgte bei 4°C im Dunkeln.

2.6.2 Zellzählung mit der Zählkammer

Bestimmung der Leukozytenzahl

Um die Leukozytenzahl pro ml der Zellsuspension zu bestimmen, wurde EDTA-Vollblut 1:20 mit Türks-Lösung versetzt, gemischt und 10 µl davon in eine Neubauer-Zählkammer gegeben. Die Türk'sche Lösung besteht aus Gentianaviolett, durch welches die Leukozyten angefärbt werden und aus Eisessig. Dieser führt zur Lyse der Erythrozyten in der Zellsuspension. Mit Hilfe eines Lichtmikroskops wurden vier Großquadrate, bestehend aus 16 Kleinquadraten ausgezählt und der Mittelwert der gezählten Leukozytenzahlen ermittelt. Das Ergebnis, welches anhand der unten stehenden Formel berechnet wurde, gibt die Anzahl an Leukozyten pro Milliliter der Zellsuspension an (Formel 1).

$$\left(\frac{\text{Summe der 4 Großquadrate}}{4} \right) \times \text{Verdünnungsfaktor} \times 10^4 = \text{Leukozytenzahl pro ml Zellsuspension}$$

Formel 1: Formel zur Berechnung der Leukozytenzahl mit der Neubauer-Zählkammer.

Bestimmung der Zellviabilität

Die Viabilität der Zellen wurde mit Trypanblau bestimmt. Aufgrund der Eigenschaft von Trypanblau, tote Zellen dunkelblau zu färben, erscheinen lebende Zellen im Lichtmikroskop als helle leuchtende Kugeln. Zur Bestimmung wurde die Probe im Verhältnis 1:10 mit Trypanblau versetzt. Davon wurden 10 µl in die Neubauer-Zählkammer gegeben und wie oben beschrieben ausgezählt und berechnet (Abb. 3). Das berechnete Ergebnis entspricht der Anzahl lebender Zellen in einem ml der Zellsuspension.

Material

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

2.6.3 Durchflusszytometrie

Prinzip

Mit Hilfe der Durchflusszytometrie, die von Dittrich und Göhde entwickelt wurde, können quantitative Bestimmungen von intrazellulären Proteinen und Oberflächenmolekülen erfolgen (Dittrich und Goehde, 1973). Dafür werden Ag-AK-Reaktionen mit fluoreszenzmarkierten spezifischen AK ausgenutzt (Tab. 2).

Die Grundlage der FACS-Analyse ist eine mit AK gefärbte Einzelzellsuspension. Die Zellen werden bei der Messung einzeln durch eine Kapillare geleitet und gelangen in die Durchflusszelle des Zytometers. Dort passieren sie separat einen fokussierten Laserstrahl, durch

dessen Licht die Zellen angeregt werden. Dabei entstehendes Streu- und Fluoreszenzlicht der an die AK gebundenen Fluorochrome, wird einzeln detektiert.

Bei der entstehenden Lichtstreuung unterscheidet man das Vorwärtsstreulicht (FSC, engl.: Forward Scatter), welches durch das Volumen der Zelle bestimmt wird, von dem Seitwärtsstreulicht (SSC, engl.: Side Scatter), welches durch die Größe, Granularität und die Binnenstruktur der Zellen beeinflusst wird. Anhand dieser beiden Parameter können zum Beispiel Granulozyten und Lymphozyten differenziert werden.

Zur weiteren Charakterisierung der Zellen muss auf die Emissionen der mit Fluoreszenzfarbstoffen markierten Zellen zurückgegriffen werden. Die Fluorochrom markierten AK sind spezifisch gegen ein Oberflächenmolekül beziehungsweise (bzw.) intrazelluläres Protein der zu detektierenden Zellen gerichtet. Durch die Verwendung verschiedenfarbiger Laser und Filter können mehrere Farbstoffe pro Messung erfasst werden. (Sack et al., 2007)

Das hier verwendete Gerät FACSCanto der Firma BD ist mit zwei Lasern ausgestattet: Einem blauen Laser mit einer Anregungswellenlänge von 488 nm und einem roten mit einer Anregungswellenlänge von 633 nm. Mit der verwendeten Software FACSDiva der Firma BD wurden die Messergebnisse ausgewertet. Die Darstellung der Ergebnisse erfolgte in Dot-Plots. Aus diesen können Aussagen darüber getroffen werden, wie häufig die Zellen mit den untersuchten Eigenschaften in der Probe vorkommen. Zuerst wurden die zu analysierenden Zellen gated und anschließend die Rohwerte in Relation gesetzt zu der Gesamtlymphozytenzahl, also der Gesamtheit an CD45⁺ Zellen. Um absolute Zellzahlen zu bestimmen, wurde die prozentuale Angabe der untersuchten Lymphozytensubpopulation auf die absolute Lymphozytenzahl angewandt. Letztere wurde aus der, mit Hilfe der Türk-Lösung bestimmten Anzahl an Leukozyten und der mittels Blutausstrich (siehe unten) ermittelten prozentualen Lymphozytenzahl bestimmt.

Immunfluoreszenzfärbung von Oberflächenmarkern

Um Aussagen über die Quantität von bestimmten Zellen machen zu können, mussten diese zuerst anhand von Oberflächenmarkern identifiziert werden.

Dazu wurde die zu untersuchende Zellsuspension in eine 96-Well-Kulturzellplatte überführt (1x10⁵ bis 1x10⁶ Zellen / 100 µl / Well). Nach 2-minütiger Zentrifugation (1500 rpm, 4°C, 2 Min) wurden die primären AK (CD3-FITC, CD4-PE, CD8-APC, CD45-PE-Cy7, CD161-APC, GTaRt-IgG-FITC, CD45RA-PE, IgD-Biotin, CD4-FITC, CD25-PE, Ms-IgG1-PE, siehe Tab. 2) in der entsprechenden Verdünnung in die jeweiligen Wells gegeben und für 15 Min bei 4°C inkubiert. Anschließend wurde die Platte drei Mal mit FACS-WP gewaschen und die sekundären AK IgM-FITC und Strep-APC, sowie Mausserum in die jeweiligen Wells pipetiert. Letzteres wird verwendet, um unspezifische Protein-AK-Bindungen zu verhindern. Nach 20-minütiger Inkubation und drei Waschdurchgängen wurden die sekundären AK

CD45RA-PE und IgD-Biotin hinzugegeben. Diese inkubierten für weitere 15 Min. Die Proben wurden erneut drei Mal gewaschen und Strep-APC als tertiärer AK in die jeweiligen Wells pipettiert. Nach 15-minütiger Inkubationszeit und drei Waschdurchläufen wurden die Zellen in FACS-Röhrchen überführt, die bereits 200 µl FACS-WP enthielten. Die gesamte Durchführung erfolgte auf Eis. Bis zur Messung am Durchflusszytometer wurden die Proben bei 4°C gelagert.

Intrazelluläre Immunfluoreszenzfärbung

Zur Beurteilung der Menge an Tregs (anhand des Proteins FoxP3 und dem Oberflächenmarker CD25) wurden zusätzlich intrazelluläre Färbungen durchgeführt. Diese erfolgten ebenfalls in einer 96-Well-Kulturzellplatte (1×10^5 bis 1×10^6 Zellen / 100 µl / Well). Nach Zentrifugation (1500 rpm, 4°C, 2 Min) erfolgte die Färbung mit den primären AK (CD4-FITC, CD45-PE-Cy7, CD25-PE, MS-IgG1-PE) wie oben beschrieben. Nach drei Waschschritten wurden die Zellen mit Fix/Perm (1:4) in einer 20-minütigen Inkubation permeabilisiert. Im Anschluss wurden die Proben drei Mal mit Perm-Puffer (1:10) gewaschen. Es folgte eine 15-minütige Inkubation mit Perm-Puffer. Nach drei Waschschritten folgte die intrazelluläre Färbung mit den in Perm-Puffer optimal verdünnten AK (FOXP3-AlexaFluor647, MslgG1-AlexaFluor647), die für 15 Min inkubierten. Anschließend wurde die Platte drei Mal gewaschen, bevor die Zellen in FACS-Röhrchen überführt wurden. Diese enthielten bereits 200 µl FACS-WP. Direkt im Anschluss wurden die Proben am Durchflusszytometer gemessen. Der Versuch wurde auf Eis durchgeführt und alle Inkubationszeiten erfolgten bei RT.

Tab. 2: In der Durchflusszytometrie verwendete AK.

Abk.: AK = Antikörper, CD = cluster of differentiation, TCR = t cell receptor, NK-Zellen = natürliche Killer-Zellen, Ig = Immunglobulin, Tregs= regulatorische T-Zellen, Strep = Streptavidin, FOXP3 = Forkhead-Box-Protein P3, GtaRt = goat anti rat.

AK	Klon	Farbstoff	Hersteller	Konzentration	Verdünnung	Zielstruktur
CD3	1F4	FITC	BioLegend	0,5 mg / ml	1:40	CD3-Komplex der mit TCR assoziiert ist → T-Zellen
CD4	W3/25	PE	BioLegend	0,2 mg / ml	1:200	T-Zell Co-Rezeptor → T-Zellen, Makrophagen
CD4	W3/25	FITC	BioLegend	0,5 mg / ml	1:80	Siehe oben
CD8a	OX-8	APC	eBioscience	0,2 mg / ml	1:40	CD8 α → Zytotoxische T-Zellen, Makrophagen
CD25	OX-39	PE	BioLegend	0,2 mg / ml	1:20	IL2-Rezeptor α -Kette → Aktivierte T- & B-Zellen, dendritische Zellen
CD45	OX-1	PE/Cy7	BioLegend	0,2 mg / ml	1:40	Protein-Tyrosin-Phosphatase auf allen Leukozyten
CD45RA	OX-33	PE	BioLegend	0,2 mg / ml	1:100	Protein-Tyrosin-Phosphatase auf B-Zellen
CD161	10/78	APC	BioLegend	0,5 mg / ml	1:40	NK-Zellen
GtaRt	Polyklonal, Goat anti Rat	FITC	Dianova	1,5 mg / ml	1:40	IgG
FOXP3	150D	AlexaFluor647	BioLegend	100 μ g / ml	1:4	Transkriptionsfaktor in Tregs

IgG1	MOPC-21	AlexaF-luor647	BioLegend	500 µg / ml	1:20	Isotypkontrolle
IgG1	MOPC-21	AlexaF-luor647	BioLegend	500 µg / ml	1:75	Siehe oben
IgG1	MOPC-21	PE	BioLegend	0,2 mg / ml	1:20	Siehe oben
IgD	MARD-3	Biotin	AbD Serotec	0,5 mg / ml	1:1000	IgD
Strep	Ref: 17-4317	APC	Affymetrix e-Bioscience	0,2 mg / ml	1:100	Biotin → biotinylierte-Primär-AK
IgM	MRM-47	FITC	BioLegend	0,5 mg / ml	1:40	IgM
Mausserum	-	-	Sigma-Aldrich	-	1:2	Bindung unspezifischer Oberflächenproteine

Material

FACSCanto	BD Bioscience, USA
FACSDiva	BD Bioscience, USA
96-Well-Kulturzellplatte	Brand, Deutschland
MixMate	Eppendorf, Deutschland
FACS-Röhrchen	Sarstedt, Deutschland
FOXP3 Fix/Perm Buffer Set	BioLegend, USA
Brefeldin A	Sigma-Aldrich, Deutschland
Monensin	BioLegend, USA
LPS	Sigma-Aldrich, Deutschland
X-Vivo	Lonza, Schweiz
Centrifuge 5810	Eppendorf, Deutschland
FACS-Lysing Solution	BD Bioscience, USA
Dest. H ₂ O	Institutsanlagen des UKE, Deutschland
DPBS (1X)	Gibco Life Technologies, USA
CO ₂ -Inkubator HERAcell	Thermo Scientific, USA

2.6.4 Differentialblutbild

Anfertigung der Blutausstriche

Um die Zusammensetzung der Leukozyten im peripheren Blut zu beurteilen, wurden quantitative Bestimmungen von Lymphozyten, Monozyten und Granulozyten mittels Differentialblutbild zu jedem Zeitpunkt einer Blutentnahme durchgeführt. Dafür wurden 5 µl EDTA-Vollblut auf einen Objektträger gegeben. Ein Deckgläschen wurde in einem 45° Winkel am

Rand des Blutropfens angesetzt und das Blut schnell und gerade über den Objektträger gezogen. Der Ausstrich trocknete an der Raumluft.

Material

Objektträger	Hecht Assistent, Deutschland
Deckgläschen für Haemacytometer	Thermo Scientific, USA

Panoptische Färbung der Blutausstriche nach Pappenheim

Der trockene Blutausstrich wurde mit May-Grünwald-Lösung für 3 Min gefärbt, anschließend mit dest. H₂O gewaschen und dieses ebenfalls 3 Min einwirken gelassen. Nach erneutem Spülen erfolgte die Färbung mit Giemsa-Gebrauchslösung (1:20) für 15 Min. Der Ausstrich wurde gewaschen und an der Luft trocknen gelassen. Unter einem Lichtmikroskop wurde der Blutausstrich wie folgt ausgezählt: 100 Leukozyten wurden gezählt und den Monozyten, Lymphozyten oder Granulozyten zugeordnet. Anschließend konnte daraus der Anteil der Lymphozyten im Vollblut wie folgt bestimmt werden (Formel 2).

$$\left(\frac{\text{Leukozytenzahl}}{100}\right) \times \text{Lymphozytenzahl} = \text{Anteil der Lymphozyten im Vollblut in \%}$$

Formel 2: Berechnung des Lymphozytenanteil im Vollblut.

Material

Giemsa-Stammlösung	Carl Roth, Deutschland
May-Grünwald-Lösung	Merck, Deutschland
Olympus Mikroskop CX41	Olympus, Deutschland

Giemsa-Gebrauchslösung (10 ml)

Dest. H ₂ O	10 ml
Giemsta-Stammlösung	0,5 ml

2.7 Färbung Donor-spezifischer Antikörper

Prinzip

DSA, die nach einer Tx gebildet werden und sich gegen MHC Klasse I und MHC Klasse II Ag der Spender*innen richten, können zu einer humoralen akuten oder chronischen Abstoßung der NTx-Niere führen (Han et al., 2009). Um den Einfluss dieser AK auf die Abstoßung der Nieren beurteilen zu können, wurde das Vorhandensein und die Menge an DSA in den Seren von transplantierten Ratten überprüft. Dazu wurden die Seren der Versuchstiere mit erylysierten Lymphozyten eines LEW.1W Tieres inkubiert. Zusätzlich wurden die Proben mit einem PE markierten CD4 AK – der an T-Zellen, Makrophagen und Monozyten bindet – und einem Ziege-anti-Ratte IgG FITC AK gefärbt (Tab. 3). Letzterer wies gebundenes Ig

nach. Mit Hilfe dieser Doppelfärbung wurden vier Subpopulationen in der Zellsuspension nachgewiesen: CD4⁺/IgG⁻, CD4⁺/IgG⁺, CD4⁻/IgG⁺, CD4⁻/IgG⁻.

Wie oben bereits beschrieben, unterscheidet man MHC-Klasse I Ag, die auf allen kernhaltigen Zellen und Thrombozyten exprimiert werden von MHC-Klasse II Ag, die zusätzlich auf APC zu finden sind. Dies sind zum Beispiel B-Zellen. (Banchereau et al., 2000) AK, die gegen MHC-Klasse II Ag gerichtet sind, wurden nicht nachgewiesen. Zur Analyse der gegen MHC-Klasse I gerichteten AK wurde die CD4⁺/IgG⁺ Population herangezogen. Zur Auswertung wurde mit Hilfe des Programms FLOWJo von der Firma Tree Star® Inc. das geometrische Mittel berechnet. Zur Berechnung des Endergebnisses wurde folgende Formel verwendet (Formel 3).

$$DSA = \text{geometrisches Mittel (Serum auf LEW.1W - Zellen)} \\ - \text{geometrisches Mittel (Serum auf LEW - Zellen)}$$

Formel 3: Formel zu Berechnung des Endergebnisses an DSA.

Abk.: DSA = Donor-spezifische Antikörper.

Durchführung

Zur Gewinnung von LEW.1W Lymphozyten wurde eine retrobulbäre Blutentnahme durchgeführt und die Lymphozyten wie unter Punkt 2.6.1 beschrieben isoliert. Die Färbung der DSA erfolgte in einer 96-Well-Kulturzellplatte. Nach Zentrifugation (1500 rpm, 4°C, 2 Min) inkubierten die Lymphozyten (1x10⁵ – 1x10⁶ Zellen / 100 µl / Well) für 20 Min mit 1:4 verdünntem Testserum. Anschließend wurden die Proben drei Mal gewaschen und eine 15-minütige Inkubation bei 4°C mit dem Goat-anti-Rat IgG FITC AK erfolgte. Nach weiteren drei Waschschritten wurde der AK Mouse-anti-Rat CD4 PE hinzugegeben und inkubierte 15 Min bei 4°C. Die Proben wurden erneut gewaschen, in FACS-Röhrchen überführt und sofort im Anschluss am FACSCanto gemessen.

Tab. 3: Für die Färbung von DSA verwendete AK.

Abk.: DAS = Donor-spezifische Antikörper, AK = Antikörper, Ig = Immunglobulin, CD= cluster of differentiation, T_H-Zellen = T-Helfer-Zellen.

AK	Klon	Farbstoff	Hersteller	Konzentration	Verdünnung	Target
IgG	Polyklonal	FITC	Dianova	1,5 mg / ml	1:40	B-Zellen
CD4	W3/25	PE	BioLegend	0,2 mg / ml	1:200	T _H -Zellen, Monozyten, Makrophagen, dendritische Zellen

2.8 IFN γ Enzyme Linked Immuno Spot Assay

Prinzip

Mit Hilfe des EliSpot, welcher in der Literatur erstmals durch Czerkinsky et. al beschrieben wurde, kann die Reaktivität der Immunzellen von Transplantatempfänger*innen auf Zellen der Spender*innen ermittelt werden (Czerkinsky et al., 1983). In der vorliegenden Arbeit wurde der EliSpot verwendet, um zu untersuchen, ob und in welchem Maße die Reaktivität der Zellen von Transplantatempfänger*innen nach einer B-Zell-Depletion gegenüber den Zellen der Spender*innen verändert ist. Der EliSpot, dessen Prinzip in Abb. 6 veranschaulicht wird (Abb. 6), ist eine Methode zum Nachweis und zur Quantifizierung von sezernierten Zytokinen, die an der Versuchsplatte immobilisiert werden. Durch die Bestimmung der Immunreaktion jeder einzelnen Zelle, wird eine hohe Sensitivität gewährleistet. (JoVE Science Education Database. Immunologie, 2020)

Der hier etablierte EliSpot-Ansatz detektiert das Zytokin IFN γ , welches von CD4⁺ - und CD8⁺ T_H-Zellen produziert wird. Durchgeführt wurde der Ansatz in 96-Well-Mikrotiterplatten mit PVDF-Membranen. Diese wurden mit einem Anti-IFN γ -AK (Erstantikörper) gecoatet. Die Stimulation der T_H-Zellen des Transplantatempfängers erfolgte durch MHC-Oberflächenmoleküle auf den Spenderzellen. In dem hier etablierten Ansatz wurde mit Splenozyten gearbeitet: Splenozyten von drei LEW.1W Tieren wurden gepooled und dienten als Spenderzellen. Diese wurden mit Splenozyten der Empfänger (LEW) kultiviert. Damit die Spenderzellen nicht durch die Empfängerzellen zur Zytokinproduktion aktiviert werden konnten, wurden sie durch eine γ -Bestrahlung mit 30 Gy inaktiviert. (Jung et al., 2016, Goto et al., 2013, BestardCrespo et al., 2013, Wallgren et al., 2006) Zur Überprüfung der generellen Fähigkeit der Empfängerzellen, IFN γ zu produzieren, wurden sie in einer Positivkontrolle mit PMA und Ionomycin stimuliert (Caraher et al., 2000).

Im Verlauf produzierten die stimulierten Empfängerzellen IFN γ . Dieses wurde auf der Platte durch den Erstantikörper gebunden. Detektiert wurde das immobilisierte Zytokin mit Hilfe einer Immunfärbung: Ein biotinylierter Zweitantikörper, der selektiv ein anderes IFN γ -Epitop bindet als der Erstantikörper, wurde eingesetzt und die äußerst starke Streptavidin-Biotin-Bindung ausgenutzt. Mit einer alkalischen Phosphatase (Reporterenzym) konjugiertes Streptavidin wurde hinzugegeben. Als Substrat diente BCIP/NBT-Puffer. Die Produktion und Immobilisierung eines IFN γ -Moleküls wurde dann durch einen lila Punkt auf der Membran sichtbar. Diese wurden von einem speziellen EliSpot-Reader gezählt. Über die Anzahl der Punkte wurde auf die Anzahl der aktivierten Zellen rückgeschlossen. Der Grenzwert, ab dem eine Probe als positiv und der Empfänger als alloreaktiv bezeichnet wird, wird in der Literatur einheitlich mit 25 oder mehr Punkten pro Well angegeben (BestardCruzado et al., 2013, Crespo et al., 2015).

EliSpot

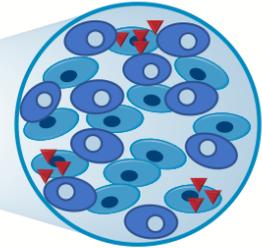
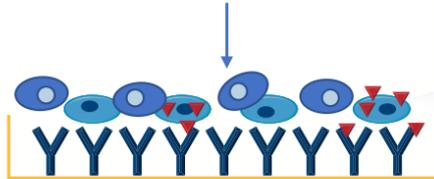
Coaten der Membranen der Mikrotiterplatte mit Erstantikörper



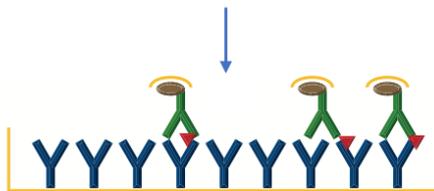
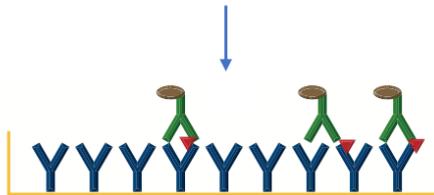
Inkubation der Empfängerzellen mit Stimulator (in diesem Falle Spenderzellen)



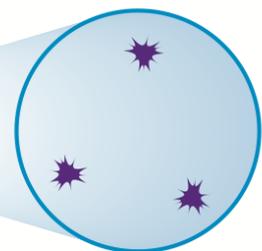
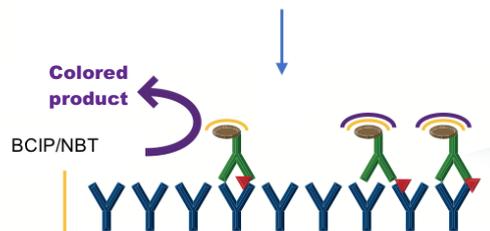
Zellen werden durch Waschen entfernt
von stimulierten Empfängerzellen gebildetes IFN- γ wird vom Erstantikörper gebunden



Inkubation des Zweitantikörpers zur Detektion von gebundenem IFN- γ



Enzymatische Reaktion



Auslesen und Analysieren

Key	
Y	Erstantikörper
Blue circle	Empfängerzellen
Red triangle	IFN- γ
Green Y	Zweitantikörper
Brown dot	Biotin
Yellow arc	Streptavidin
Purple arc	Reaktionsprodukt
BCIP:	5-bromo-4-chloro-3-indolyphosphate p-toluidine salt
NBT:	Nitroblautetrazoliumchlorid
Colored product:	Lilanes Substrat
Blue circle	Spenderzellen

Abb. 2: Graphische Darstellung des Ablaufes eines EliSpot-Assays.

(Abcam). Abk.: EliSpot = Enzyme Linked Immuno Spot Assay, IFN = Interferon, Key = Legende.

Versuchsaufbau

- a) Negativ Kontrolle: Für die negativ Kontrolle wurde nur EliSpot Medium in die entsprechenden Wells pipettiert.
- b) Grundaktivität der Zellen: Die Grundaktivität ist die Aktivität, mit der die Zellen ohne Stimulationsreiz IFN γ produzieren. Um diese zu quantifizieren, wurden die Zellen nur mit EliSpot Medium inkubiert. Diese Kontrolle wurde mit allen Versuchstieren und pro Platte einmal mit den Zellen des Spender-Pools durchgeführt.
- c) Positiv Kontrolle: Zur Überprüfung der generellen Aktivierbarkeit der Empfängerzellen zur IFN γ Produktion wurden die Zellen mit 1:33333 verdünntem PMA und 1:2000 verdünntem Ionomycin stimuliert.
- d) Testansatz: Im Testansatz wurden die Transplantatempfängerzellen (LEW) mit Zellen des Spender-Pools (LEW.1W) inkubiert.

Alle Ansätze und Kontrollen erfolgten in Triplikaten.

Material

Bestrahlungsgerät RS225	Gulmay medical, UK
PMA	Sigma-Aldrich, Deutschland
Ionomycin	Calbiochem, USA
RPMI1640	Merck, Deutschland
Penicillin/Streptomycin	Merck, Deutschland
2-Mercaptoethanol	Sigma-Aldrich, Deutschland

EliSpot Medium

RPMI1640 mit 2.0 g / L NaHCO ₃ , mit L-Glutamin	500 ml
FBS hitzeinaktiviert	50 ml
Pen/Strep	5 ml
2-Mercaptoethanol	50 μ M

Die Lagerung des Mediums erfolgte bei 4°C im Dunkeln. Verwendet wurde es für maximal vier Wochen nach Ansatz.

Coaten und Blocken der 96-Well-Platte

Alle folgenden Schritte wurden unter der Cleanbench durchgeführt. Der EliSpot Ansatz wurde in einer 96-Well-Platte durchgeführt, deren PVDF-Membranen vor dem Coaten angefeuchtet werden mussten. Dafür wurden 50 μ l 70%igen Ethanol pro Well verwendet. Nach 30 Sekunden Inkubation wurde die Platte zwei Mal mit bidestilliertem (bidest.) H₂O gewaschen. Die Membranen erschienen nun transparent.

Zum Coaten wurden 100 μ l des 1:10 verdünnten Capture-AK in jedes Well pipettiert. Nach 18-stündiger Inkubation bei 4°C wurde die Platte drei Mal mit PBS gewaschen. Anschließend wurden 100 μ l Block-Puffer in jedes Well gegeben, der für 2 Stunden inkubierte. Bis

zum Testansatz wurde die Platte bei 4°C gelagert. Das Beenden des Blockens erfolgte kurz vor dem Testansatz, indem die Platte drei Mal gewaschen wurde.

Material

Multiscreen-IP,0,45µm, sterile Platten	Merck Millipore, Deutschland
Ethanol absolut	Greiner, Deutschland
Bidest. H ₂ O	AppliChem, Deutschland
Rat IFN γ Capture-AK	Abcam, UK
UHT Milch, fettarm	Gut & Günstig, Deutschland

Block-Puffer

DPBS (1x)	5 ml
UHT Milch, fettarm	5 ml

Der Blocking Buffer wurde immer kurz vor dem Gebrauch frisch angesetzt.

70%iger Ethanol (100 ml)

70 ml Ethanol absolut mit H₂O auf 100 ml auffüllen.

Auftauen vitaler Splenozyten

Zum Auftauen der kryokonservierten Splenozyten wurden die Nunc-Röhrchen aus dem Stickstofftank in eine -80°C kalte Einfrierhilfe-Dose überführt. Um die Zellsuspension anzutauen, wurde sie in einem warmen Wasserbad (37°C) geschwenkt, bis nur noch ein kleiner Teil gefroren war. Die Probe wurde in ein Zentrifugationsröhrchen mit 10 ml warmen Auftaumedium (37°C) überführt. Nach Zentrifugation (280 g, RT, 10 Min) wurde der Überstand verworfen, das Pellet in 10 ml Auftaumedium gelöst und erneut gewaschen. Je nach Größe des Pellet wurde es in 2-5 ml EliSpot Medium aufgenommen. Die Zellen inkubierten dann für 2 Stunden bei 37°C. Die Lebendzellzahlbestimmung erfolgte wie unter 2.5.5 beschrieben. Zur weiteren Verwendung wurde die Zellzahl nach erneutem Waschen auf 3×10^6 Zellen / ml eingestellt.

Material

Wasserbad	GFL, Deutschland
DNase	PanReac AppliChem, ITW Reagents, Deutschland

Auftaumedium (50 ml)

FBS hitzeinaktiviert	10 ml
RPMI 1640 mit 2.0 g / L NaHCO ₃ , mit L-Glutamin	40 ml
PenStrep	500 µl
DNase1	500 µl

Das Auftaumedium wurde bei 4°C im Dunkeln gelagert.

EliSpot Testansatz

Die Splenozyten der Spender und Empfänger, sowie die Negativ- und Positivkontrollen wurden nach dem Auftauen in die Wells verteilt (3×10^5 / Well). Es folgte eine Inkubation bei 37°C für 42 Stunden. Die Platte wurde ausgeschlagen und PBS-Tween für eine 10-minütige Inkubation bei 4°C hinzugefügt. Nach 3-maligem Waschen, wurde der Detection-AK (1:10) hinzugegeben und inkubiert für 1 Stunde und 30 Min. Es folgten drei Waschschritte bevor Streptavidin-AP (1:10) in jedes Well gegeben wurde und für 1 Stunde inkubiert. Dann wurde die Probe erneut drei Mal gewaschen, der Boden der Platte entfernt und beide Seiten unter laufendem dest. H₂O gewaschen. Daraufhin wurde BCIP/NBT-Puffer in jedes Well gegeben. Nach einer 5-minütigen Inkubation wurde die Platte erneut unter laufendem dest. H₂O gewaschen. Zum Trocknen wurde sie dann bei 4°C und Dunkelheit gelagert. Ausgelesen wurde die Platte mit einem EliSpot Reader. Zur Kontrolle wurden die Punkte einzeln nachgezählt. Zur Berechnung der Produktionsaktivität der Zellen wurde die unten aufgeführte Formel angewendet (Formel 4).

$$\text{Mittelwert Punktzahl im Testansatz} - (\text{Mittelwert Grundaktivität Spenderpool} + \text{Mittelwert Grundaktivität Versuchstier}) = \text{Produktionsaktivität}$$

Formel 4: Formel zur Berechnung des Endergebnisses im EliSpot.

Abk.: EliSpot = Enzyme Linked Immuno Spot Assay.

Material

Tween 20	Sigma-Aldrich, Deutschland
Detection-AK	Abcam, UK
Streptavidin-AP	Abcam, UK
Gebrauchsfertiger BCIP/NBT-Puffer	Abcam, UK
EliSpot Reader AID Fluorescent Lamp	Aid, Deutschland

PBS-Tween

DPBS (1X)	500 ml
Tween 20	500 µl

2.9 Histologische Untersuchungen

2.9.1 Herstellung von Paraffinschnitten

Um die NTx-Nieren histologisch auswerten zu können, wurden von ihnen Paraffinschnitte angefertigt. Zur Entwässerung wurden die in Formalin-fixierten Nieren in einer aufsteigenden Alkoholreihe mit Ethanol durchtränkt. Das Gewebe wurde in das Intermedium Xylol überführt, bevor es in heißem, flüssigem Paraffin eingebettet wurde. Der Paraffin-Gewebe-Block erkaltete auf Eis und wurde für mind. 2 Stunden bei -20°C gelagert. Mit einem

Mikrotom wurden 3 µm dicke Gewebeschnitte angefertigt, die in einem Wasserbad aufgefangen wurden. Daraus wurden sie auf Glasobjektträger aufgezogen und mind. über Nacht trocknen gelassen.

Material

Paraffin	Kooperative Nutzung des Anatomischen Institutes des UKE, Deutschland
Xylol	Geyer, Deutschland
Mikrotom Microm HM335E	Thermo Scientific, USA

2.9.2 Hämatoxylin-Eosin-Färbung

Zur Beurteilung der Gewebemorphologie der NTx-Nieren wurde eine Hämatoxylin-Eosin Färbung der Paraffinschnitte angefertigt. Die Färbung besteht aus zwei Einzelfärbungen: Hämatoxylin färbt anionische Strukturen blau-violett, sodass insbesondere die Zellkerne und Glykosaminoglykane angefärbt werden. Eosin färbt kationische Strukturen rosa-rot: vor allem zytoplasmatische Proteine und Kollagen nehmen eine rote Farbe an. (Schärer, 2016) Um das Paraffin aus den Gewebeschnitten zu entfernen, wurden sie zwei Mal für 10 Min in Xylol gegeben. Die Wässerung des Gewebes erfolgte dann in einer absteigenden Alkoholreihe (100%, 100%, 96%, 90%, 80%, 70%). Anschließend wurde das Gewebe für mind. 5 Min in dest. H₂O oder PBS gegeben. Die erste Färbung erfolgte mit Mayers-Hämalaun für 15 Min mit anschließender 15-minütiger Spülung mit Leitungswasser. Es folgte die einminütige Färbung mit Eosin. Daraufhin inkubierten die Objektträger drei Mal je 2 Min in 100%igem Ethanol. Nachfolgend wurde das Gewebe zwei Mal für je 5 Min in Xylol gegeben. Dann wurden die Objektträger mit Eukitt® quick-hardening mounting medium eingedeckt.

Material

Mayers Hämatoxylinlösung	Sigma-Aldrich, Deutschland
Eosin Y	AppliChem, Deutschland
Eukitt® quick-hardening mounting medium	Sigma-Aldrich, Deutschland

2.9.3 PAS-Reaktion

Um die bindegewebigen Anteile histologischer Präparate beurteilen zu können, wird die PAS-Reaktion verwendet, die in der Literatur erstmals 1948 durch Hotchkiss beschrieben wurde (Hotchkiss, 1948). Mit dieser Methode werden Bindegewebsfasern, Zellwände und Basalmembranen angefärbt. Dazu wurden die Paraffinschnitte zwei Mal für je 5 Min in XEM gegeben. Anschließend wurde das Gewebe über eine absteigende Alkoholreihe gewässert (100%, 100%, 96%, 90%, 80%, 70%). Die Objektträger wurden für 5 Min in Leitungswasser überführt und kurz mit dest. H₂O gespült. Nachdem die 10-minütige Färbung mit 1%iger

Perjodsäure durchgeführt wurde, wurden die Schnitte 10 Min in Leitungswasser gespült. Nach 2-maligem Waschen in dest. H₂O folgte die 20-minütige Inkubation in Schiffs' Reagenz. Im Anschluss wurde das Gewebe 5 Min in warmem Leitungswasser gespült, bevor die 5-minütige Kernfärbung mit Mayers Hämalaun erfolgte. Die Schnitte wurden 10 Min unter fließendem Leitungswasser gewaschen und in einer aufsteigenden Alkoholreihe (70%, 96%, 100%) entwässert. Das Gewebe stand dann für 5 Min in 100%igem Ethanol. Es folgten zwei 5-minütige Inkubationen in XEM. Anschließend wurden die Gewebeschnitte mit Eukitt® quick-hardening mounting medium eingedeckt.

Material

Xylolersatzmedium (XEM)	National Diagnostics, USA
Perjodsäure	Carl Roth, Deutschland
Schiffs' Reagenz	Merck, Deutschland

2.10 Immunhistologische Untersuchungen

2.10.1 Herstellung von Kryoschnitten

Um immunhistologische Untersuchungen mit den NTx-Nieren durchführen zu können, mussten vorerst Kryoschnitte angefertigt werden. Bei Versuchsende wurden kleine Gewebestücke der NTx-Nieren in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Bis zur weiteren Verwendung für die Immunhistologie wurden sie dann bei -80°C gelagert. Kurz vor dem Schneiden wurde das Gewebe im Kryostaten auf -18°C „erwärmt“. Mit dem Kryostaten CytoStar NX70 der Firma Thermo Scientific wurden dann 3 µm dicke Gewebeschnitte angefertigt, die auf Objektträger aufgezogen wurden. Sie trockneten für mind. 2 Stunden und max. 12 Stunden an der Luft. Bis zur weiteren Verarbeitung wurden sie bei -20°C gelagert.

Material

Aquatex	Merck, Deutschland
Kryostat CytoStar NX70	Thermo Scientific, USA

2.10.2 Immunhistologische Färbung

Prinzip

Mit Hilfe der Immunhistologie können in histologischen Gewebeschnitten spezifische Proteine, Polysaccharide und andere Strukturen nachgewiesen werden. Die Voraussetzung dafür ist, dass gegen die Zielstruktur AK gebildet werden können. Diese werden mit Fluorochromen konjugiert, sodass man über Farbreaktionen Aufschluss über das Vorhandensein und die Lokalisation der Strukturen in den Geweben erhält (Tab.4). Hier wurde diese Methode angewendet, um zu untersuchen, welche Zellen in den Infiltraten der NTx-Nieren vorhanden sind. (Noll und Schaub-Kuhnen, 2000)

Durchführung

Die Fixierung des Gewebes erfolgte für 10 Min in eiskaltem Aceton bei -20°C. Danach trockneten die Schnitte für mind. 10 Min unter dem Abzug. Das Gewebe wurde mit dem DAKO Pen umrandet, bevor die Schnitte für 10 Min mit Rattenserum (1:10) inkubierten, um unspezifische Hintergrundfärbungen zu vermeiden. Nach Abklopfen des Serums wurden die Objektträger mit dem primären AK bestückt, der für 45 Min bei 4°C einwirkte. Dann wurden die Objektträger zwei Mal in PBS gewaschen. Der sekundäre AK, der im gleichen Verhältnis mit NRS verdünnt wurde, inkubierte für 60 Min bei 4°C. Es erfolgten zwei Waschschriffe mit PBS, bevor die Inkubation mit Substratlösung für 20 – 30 Min folgte. Nach zweimaligem Waschen mit Leitungswasser wurden die Zellkerne mit Mayers Hämalaun gefärbt. Die Objektträger wurden zwei Mal gespült und bläuten dann für 10 Min unter laufendem Leitungswasser nach. Die Gewebeschnitte wurden mit Tissue Tex und Deckgläsern eingedeckt.

Für die TCR-Färbung inkubierte das Rattenserum 60 Min, der primäre AK über Nacht.

Tab. 4: Für die immunhistologische Färbung verwendete AK.

Abk.: AK = Antikörper, TCR = t cell receptor, CD = cluster of differentiation, Ig = Immunglobulin.

AK	Klon	Hersteller	Konzentration	Verdünnung	Target
Rat B Lymphocytes	Ki-B1-R	BMA Bio-medicals	0,1 mg / ml	1:100	Reife B-Zellen, Plasmazellen
Rat TCR α/β	R73	BioLegend	0,5 mg / ml	1:5000	TCR α & β , Erythrozyten
RAM	Polyklonal	Dianova	0,8 mg / ml	1:20	Maus-IgG
CD68	ED1	Dianova	250 μ g	1:5000	Makrophagen, Monozyten, dendritische Zellen

Material

Aceton	Geyer, Deutschland
DAKO Pen	Dako, Dänemark
Normales Rattenserum	eigene Herstellung
Tissue Tek	Sakura, Niederlande
3-Amino-9-Ethylcarbazol	Sigma-Aldrich, USA
N-N-Dimethylformamid	Sigma-Aldrich, Deutschland
NA-Acetat	Merck, Deutschland

Wasserstoffperoxid 30% (H₂O₂)
Deckgläser

Merck, Deutschland
Roth, Deutschland

AEC-Stammlösung

3-Amino-9-Ethylcarbazol 20 mg
N-N-Dimethylformamid 5 ml

Die Lösung wurde filtriert und wurde für eine Woche aufbewahrt.

AEC-Substratlösung

AEC-Stammlösung 333 µl
Na-Acetat-Puffer 4,6 ml
H₂O₂ 5 µl

Die Lösung wurde filtriert und sofort verwendet.

Na-Acetat-Puffer

Na-Acetat (pH 5,2) 0,41 g
Dest. H₂O 45 ml

Die Lösung wird auf 50 ml mit dest. H₂O aufgefüllt. Die Lagerung erfolgt bei RT

2.11 Statistische Auswertung

Die statistische Auswertung erfolgte mit der Software GraphPad PRISM von GraphPad Software Inc., Version 7 (Mac OS X). Dabei wurden unabhängige T-Tests zum Vergleich zweier Gruppen verwendet. Zusätzlich wurde ein Log-Rank Test durchgeführt. Ein signifikanter Unterschied wurde bei einem p-Wert kleiner 0,05 festgestellt.

3 Ergebnisse

3.1 Ausschluss von Tieren

Einige Versuchstiere sind vorzeitig aus dem Versuch ausgeschieden (Tab. 5). Aufgrund des vorzeitigen Ausscheidens aus dem Versuch konnten keine vollständigen Datensätze für die jeweiligen Tiere generiert werden, sodass sie nicht in die statistischen Analysen aufgenommen wurden. Das Überleben aller Tiere wurde mit einer Kaplan-Meier Kurve (Abb. 4) dargestellt. Tiere, die aufgrund eines chirurgischen Problems vorzeitig aus dem Versuch ausschieden, wurden dabei nicht berücksichtigt. Mit Hilfe eines Log-Rank Test wurde die Gruppe der Tiere, die nach der NTx einen Anti-CD20 AK verabreicht bekommen hat, mit der Gruppe verglichen, die stattdessen NaCl injiziert bekam. Dabei ist kein signifikanter Unterschied zwischen den beiden Versuchsgruppen detektiert worden.

Tab. 5: Aus dem Versuch ausgeschlossene Tiere mit Ausschlussgrund.

Abk.: LEW = LEWIS, Allo = allogene, d = Tag.

Tier	Gruppe	Überleben [d]	Ausschlussgrund
LEW 299	Allo NTx d30 + Anti-CD20	29	Unzureichender Allgemeinzustand
LEW 301	Allo NTx d30 + Anti-CD20	4	Chirurgisches Problem
LEW 306	Allo NTx d30 + Anti-CD20	4	Unzureichender Allgemeinzustand
LEW 311	Allo NTx d30 + Anti-CD20	6	Unzureichender Allgemeinzustand
LEW 314	Allo NTx d14 + Anti-CD20	14	Unzureichender Allgemeinzustand
LEW 316	Allo NTx d14 + Anti-CD20	0	Chirurgisches Problem
LEW 319	Allo NTx d14 + Anti-CD20	0	Chirurgisches Problem
LEW 324	Allo NTx d14 + Anti-CD20	14	Unzureichender Allgemeinzustand

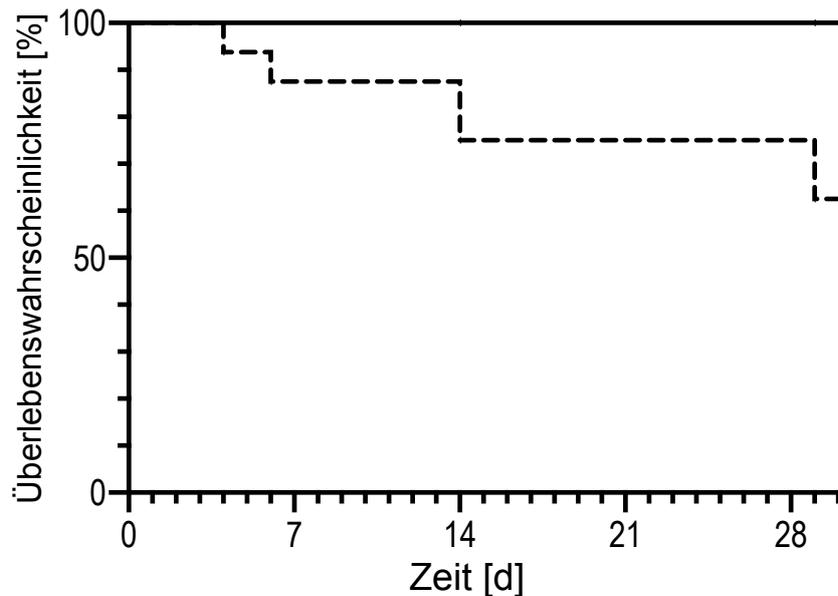


Abb. 3: Überlebenswahrscheinlichkeit der Versuchstiere über vier Wochen in %.

Keines der Versuchstiere in der ‚allo NTx + NaCl‘ Versuchsgruppe ist vorzeitig aus dem Versuch ausgeschieden, aus der ‚allo NTx + Anti-CD20‘ Gruppe sind insgesamt drei Tiere vorzeitig aus dem Versuch ausgeschlossen worden. Die Signifikanz wurde mit Hilfe eines Log-Rank Test geprüft. Durchgezogene Linie: ‚allo NTx + NaCl‘, gestrichelte Linie: ‚allo NTx + Anti-CD20‘. Abk.: d = Tag, allo = Allogen, NTx = Nierentransplantation.

3.2 Gewicht der Tiere im Versuchsverlauf

Nach der NTx bzw. der Injektion nehmen die Tiere aller Gruppen bis drei Tage nach der NTx kontinuierlich an Gewicht ab. Die ‚LEW-Normaltiere‘-Gruppe zeigt zu diesem Zeitpunkt ihr geringstes Gewicht. Für die anderen drei Versuchsgruppen (Gruppe 3 und 5 wurden in einem Graphen dargestellt, sowie Gruppe 4 und 6) konnte das niedrigste Gewicht sieben Tage nach der NTX bzw. der Injektion gemessen werden. Das Gewicht der Tiere der ‚allo NTx + NaCl‘-Gruppe liegt ab dem 23. Tag nach der OP über dem Ausgangsgewicht, das der ‚allo NTx + Anti-CD20‘- Gruppe an Tag 18. Die Tiere der ‚LEW-Normaltier + Anti-CD20‘- und der ‚LEW-Normaltiere‘-Gruppe erreichen das Ausgangsniveau ihres Gewichtes über den Versuchsverlauf nicht wieder. Zwischen den einzelnen Versuchsgruppen sind zu keinem Zeitpunkt signifikante Unterschiede zu beobachten. Ein Diagramm zur Veranschaulichung ist im Anhang zu finden (Anhang 2).

3.3 Überwachung der Nierenfunktion

Es sind keine relevanten Anstiege in den Kreatinin-Werten der Versuchstiere zu detektieren, da keine Nephrektomie der zweiten Eigenniere durchgeführt wurde (Anhang 3). So konnte die Nierenaktivität über die verbliebene Eigenniere gewährleistet werden. Daher hätten die Albuminkonzentrationen im Urin nur eine beschränkte Aussagekraft über die Funktion des Transplantats gegeben, sodass diese Daten nicht ausgewertet wurden.

3.4 FACS-Analysen des peripheren Blutes

Für die Analysen der Immunzellen im peripheren Blut für den Zeitraum prä NTx bis zwei Wochen nach der NTx wurden die Versuchsgruppen 3 und 5 zu ‚allo NTx + NaCl‘ zusammengefasst und die Versuchsgruppen 4 und 6 zu ‚allo NTx + Anti-CD20‘. Die genauen absoluten und relativen Zellzahlen, sowie die p-Werte der einzelnen Analysen sind im Anhang dieser Arbeit zu finden (Anhang 4 – Anhang 16).

3.4.1 Lymphozyten gesamt

Die Lymphozytenzahlen sind in folgendem Diagramm (Abb. 5) aufgeführt. Zu keinem Versuchszeitpunkt ist der Unterschied zwischen den Versuchsgruppen signifikant.

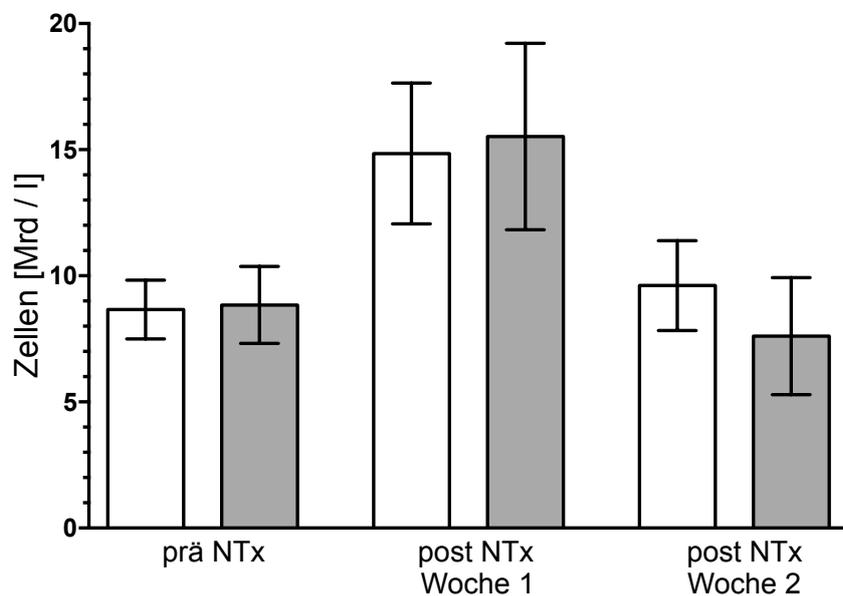


Abb. 4: Lymphozyten (CD45⁺) im peripheren Blut in Mrd / l.

Weiß: ‚allo NTx + NaCl‘, grau: ‚allo NTx + Anti-CD20‘. Signifikanz getestet mit einem ungepaarten t-Test. Abk.: NTx = Nierentransplantation, allo = allogene.

3.4.2 T-Zellen

Zu keinem Zeitpunkt im Versuchsverlauf sind signifikante Unterschiede zwischen den beiden Versuchsgruppen in der absoluten Anzahl der gesamten T-Zellen (Abb. 6), der T_H-Zellen (Abb. 7), der zytotoxischen T-Zellen (Abb. 8), der NKT-Zellen (Abb. 9), der regulatorischen CD4⁺ CD25⁺ T-Zellen (Abb. 10) und der regulatorischen CD4⁺ FoxP3⁺ T-Zellen (Abb. 11) zu verzeichnen. In den nachfolgenden Diagrammen sind die Ergebnisse grafisch dargestellt.

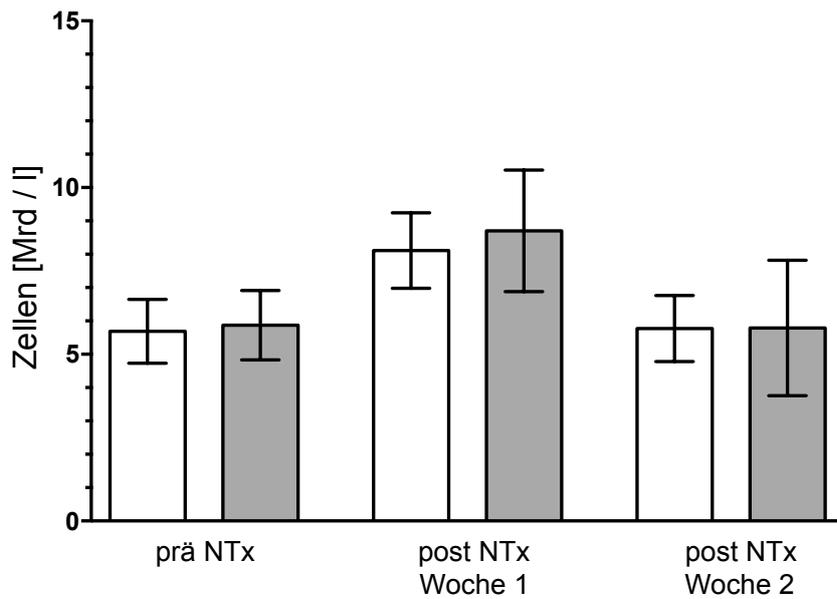


Abb. 5: T-Zellen (CD3⁺) im peripheren Blut in Mrd / l.

Weiß: ,allo NTx + NaCl', grau: ,allo NTx + Anti-CD20'. Signifikanz getestet mit einem ungepaarten t-Test. Abk.: NTx = Nierentransplantation, allo = allogene.

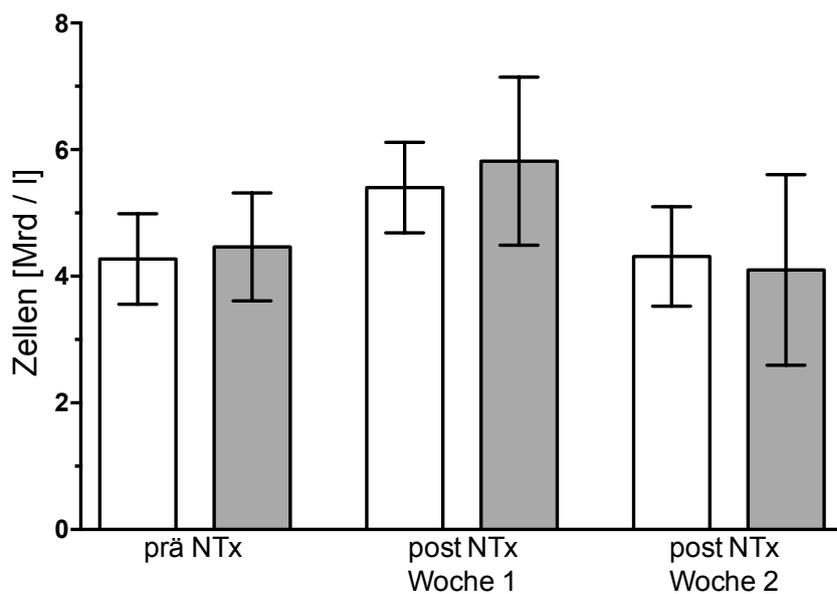


Abb. 6: T_H-Zellen (CD3⁺ CD4⁺) im peripheren Blut in Mrd / l.

Weiß: ,allo NTx + NaCl', grau: ,allo NTx + Anti-CD20'. Signifikanz getestet mit einem ungepaarten t-Test. Abk.: T_H-Zellen = T-Helfer-Zellen, NTx = Nierentransplantation, allo = allogene.

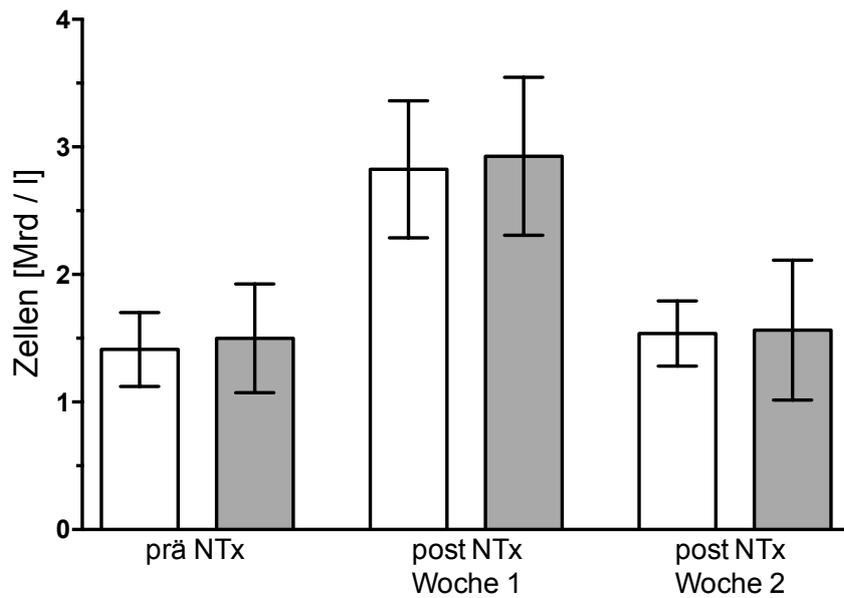


Abb. 7: Zytotoxische T-Zellen (CD3⁺ CD8⁺) im peripheren Blut in Mrd / l.

Weiß: ‚allo NTx + NaCl‘, grau: ‚allo NTx + Anti-CD20‘. Signifikanz getestet mit einem ungepaarten t-Test. Abk.: NTx = Nierentransplantation, allo = allogene.

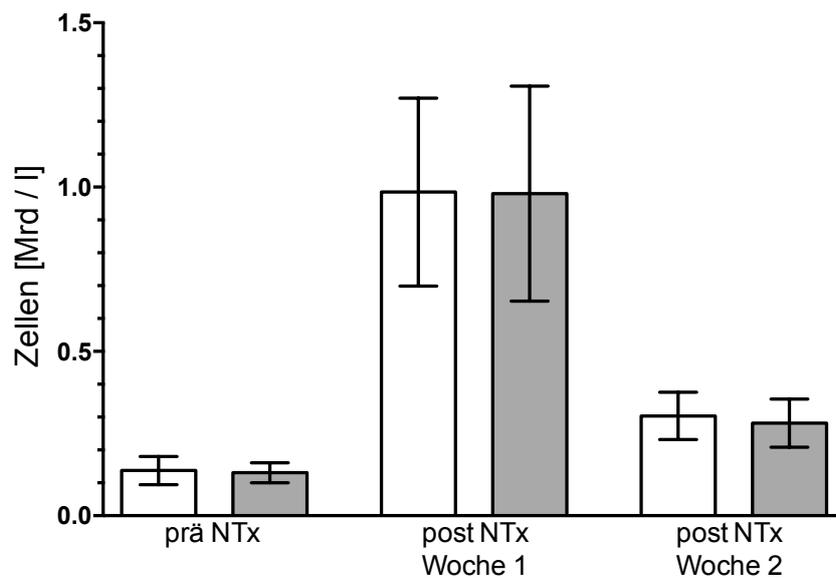


Abb. 8: NKT-Zellen (CD3⁺ CD161⁺) im peripheren Blut in Mrd / l.

Weiß: ‚allo NTx + NaCl‘, grau: ‚allo NTx + Anti-CD20‘. Signifikanz getestet mit einem ungepaarten t-Test. Abk.: NKT-Zellen = Natürliche Killer T-Zellen, NTx = Nierentransplantation, allo = allogene.

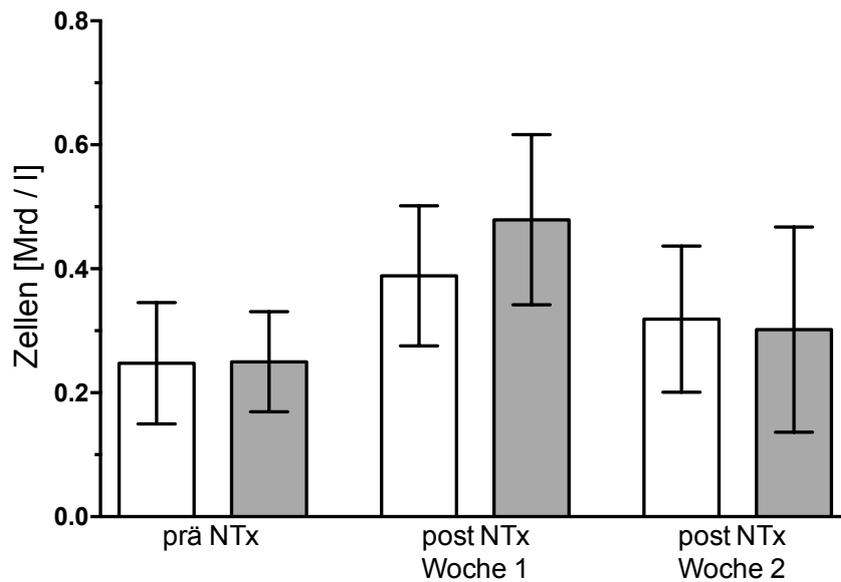


Abb. 9: Tregs (CD4⁺ CD25⁺) im peripheren Blut in Mrd / l.

Weiß: ‚allo NTx + NaCl‘, grau: ‚allo NTx + Anti-CD20‘. Signifikanz getestet mit einem ungepaarten t-Test. Abk.: Tregs = regulatorische T-Zellen, NTx = Nierentransplantation, allo = allogene.

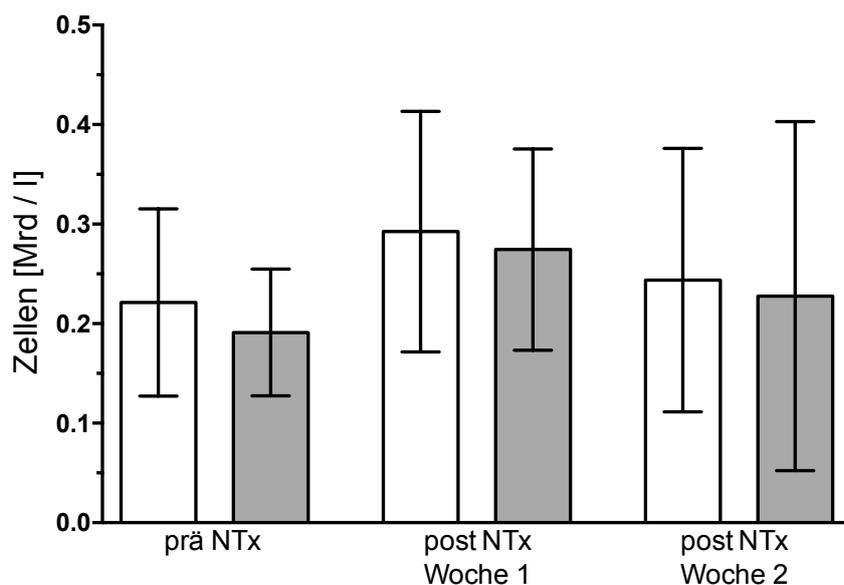


Abb. 10: Tregs (CD4⁺ FoxP3⁺) im peripheren Blut in Mrd / l.

Weiß: ‚allo NTx + NaCl‘, grau: ‚allo NTx + Anti-CD20‘. Signifikanz getestet mit einem ungepaarten t-Test. Abk.: Tregs = regulatorische T-Zellen, NTx = Nierentransplantation, allo = allogene.

3.4.3 NK-Zellen

Die Ergebnisse der NK-Zellen sind in dem untenstehenden Diagramm abgebildet (Abb. 12). Zu keinem Zeitpunkt im Versuchsverlauf sind signifikante Unterschiede zu detektieren.

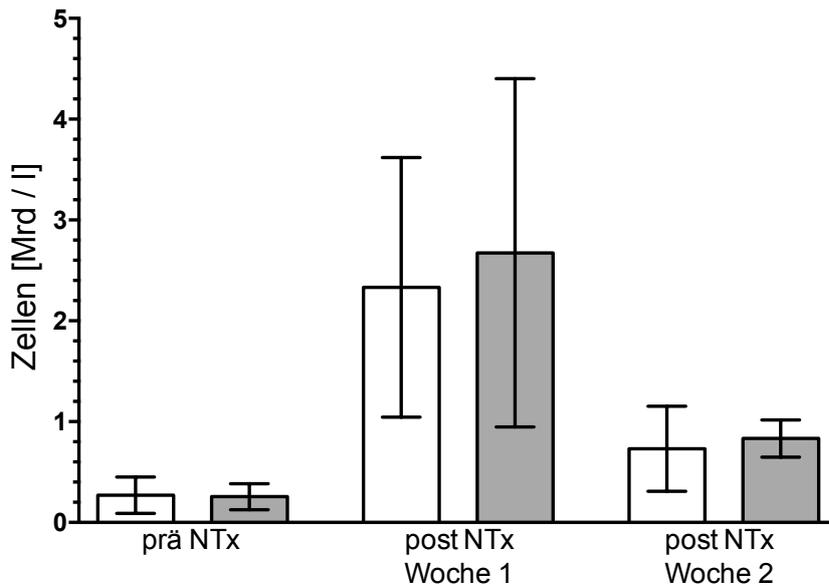


Abb. 11: NK-Zellen (CD3⁺ CD161^{high}) im peripheren Blut in Mrd / l.

Weiß: ‚allo NTx + NaCl‘, grau: ‚allo NTx + Anti-CD20‘. Signifikanz getestet mit einem ungepaarten t-Test. Abk.: NK-Zellen = natürliche Killerzellen, NTx = Nierentransplantation, allo = allogene.

3.4.4 B-Zellen

Die Ergebnisse der B-Zellen sind in den untenstehenden Diagrammen abgebildet. Vor der NTx und eine Woche danach können zwischen den Gruppen weder in den gesamten B-Zellzahlen noch in den B-Zell-Subpopulationen signifikante Unterschiede nachgewiesen werden.

In der zweiten Woche nach der OP und eine Woche nach der Injektion des AK bzw. von NaCl sind in der Versuchsgruppe absolut gesehen signifikant weniger B-Zellen insgesamt (Abb. 13) zu beobachten, als in der Kontrollgruppe. Für die B-Zell-Subpopulationen konnte Folgendes herausgefunden werden: Im Verhältnis zu der jeweils gesamten B-Zell-Population sind in der Versuchsgruppe ebenfalls signifikant weniger naive reife B-Zellen (Abb. 16) als in der Kontrollgruppe zu detektieren. Auch sind weniger T2 B-Zellen (Abb. 15) in der Versuchsgruppe zu beobachten, dieser Unterschied ist allerdings nicht signifikant. T1 B-Zellen (Abb. 14) sind in der Versuchsgruppe signifikant in größerer Anzahl vorhanden als in der Kontrollgruppe, genauso wie Switched B-Zellen (Abb. 17).

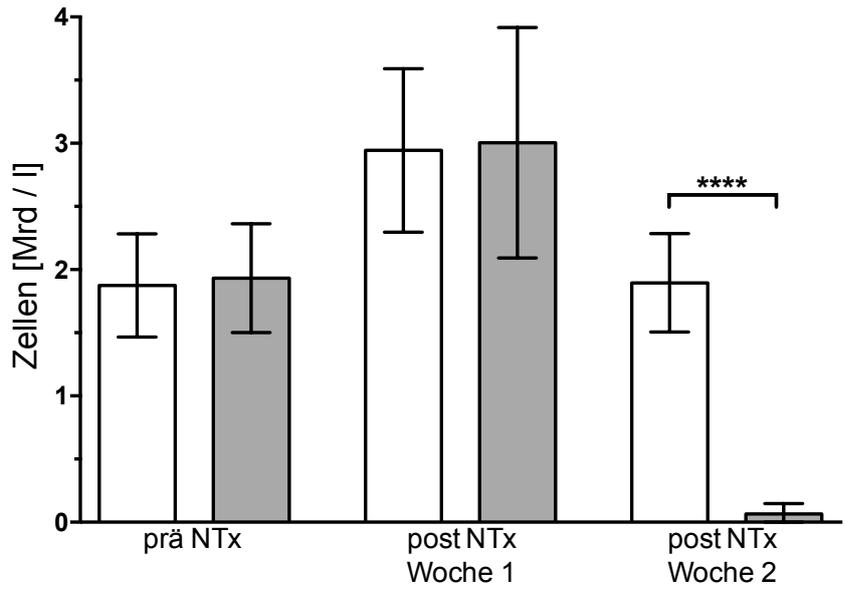


Abb. 12: B-Zellen (CD45RA⁺ IgG⁺) im peripheren Blut in Mrd / l.

Weiß: ,allo NTx + NaCl', grau: ,allo NTx + Anti-CD20'. Signifikanz getestet mit einem ungepaarten t-Test: **** < 0,0001. Abk.: NTx = Nierentransplantation, allo = allogene.

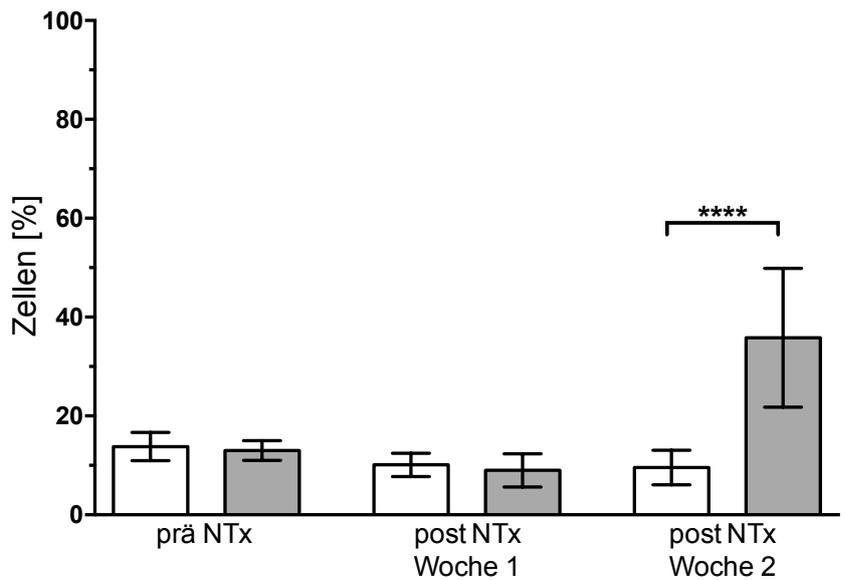


Abb. 13: T1 B-Zellen (IgD^{low} IgM^{medium}) im peripheren Blut in % im Verhältnis zur gesamten B-Zell-Population.

Weiß: ,allo NTx + NaCl', grau: ,allo NTx + Anti-CD20'. Signifikanz getestet mit einem ungepaarten t-Test: **** < 0,0001. Abk.: NTx = Nierentransplantation, T1 B-Zellen = Transitional 1 B-Zellen, allo = allogene.

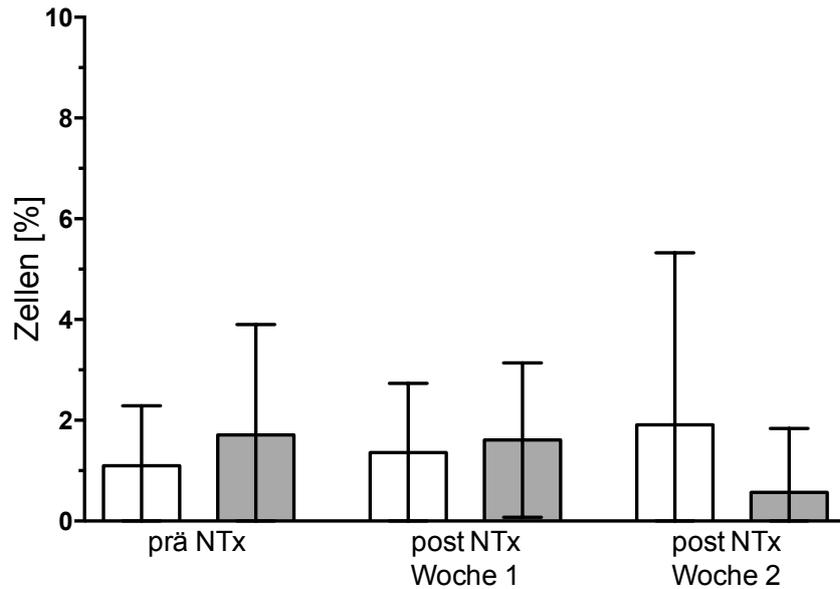


Abb. 14: T2 B-Zellen (IgD^{high} IgM^{high}) im peripheren Blut in % im Verhältnis zur gesamten B-Zell-Population.

Weiß: ,allo NTx + NaCl', grau: ,allo NTx + Anti-CD20'. Signifikanz getestet mit einem ungepaarten t-Test. Abk.: NTx = Nierentransplantation, T2 B-Zellen = Transitional 2 B-Zellen, allo = allogene.

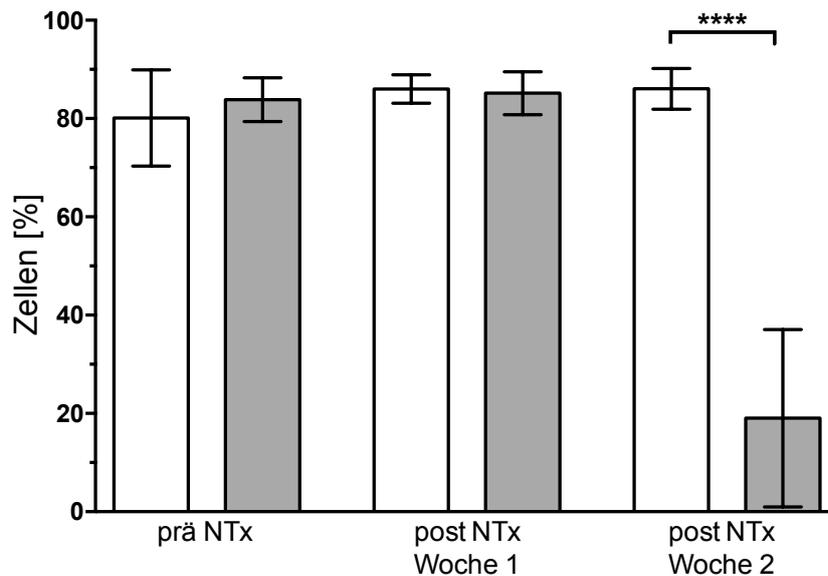


Abb. 15: Naive reife B-Zellen (IgD^{medium} IgM^{medium}) im peripheren Blut in % im Verhältnis zur gesamten B-Zell-Population.

Weiß: ,allo NTx + NaCl', grau: ,allo NTx + Anti-CD20'. Signifikanz getestet mit einem ungepaarten t-Test: **** < 0,0001. Abk.: NTx = Nierentransplantation, allo = allogene.

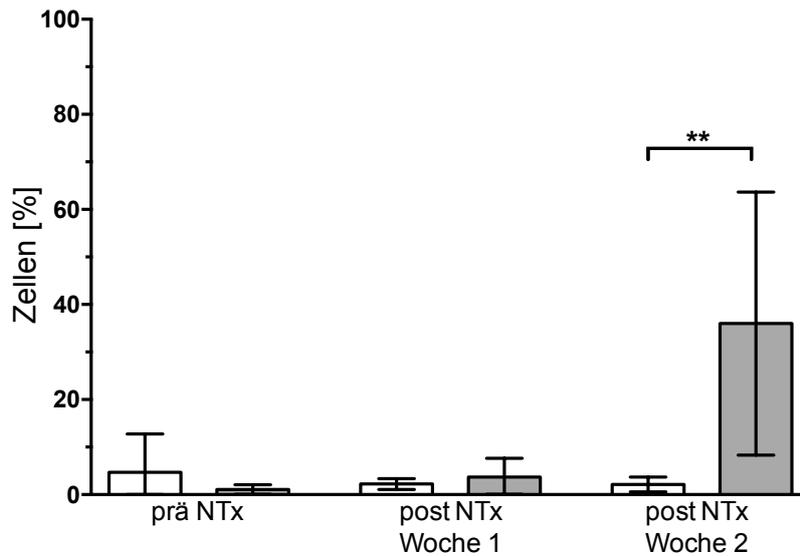


Abb. 16: Switched B-Zellen (IgD⁺ IgM⁺) im peripheren Blut in % im Verhältnis zur gesamten B-Zell-Population.

Weiß: ‚allo NTx + NaCl‘, grau: ‚allo NTx + Anti-CD20‘. Signifikanz getestet mit einem ungepaarten t-Test: ** = 0,0032. Abk.: NTx = Nierentransplantation, allo = allogren.

3.5 FACS-Analysen der Milz

Im Anhang dieser Arbeit sind die genauen Zellzahlen aufgeführt (Anhang 17 – Anhang 26).

3.5.1 T-Zellen

Zwei Wochen nach der NTx sind in der Milz der Versuchsgruppe im Vergleich zur Kontrollgruppe signifikant mehr T-Zellen (Abb. 19) zu detektieren. Dies ist ebenso in den Subpopulationen zu beobachten: In der Versuchsgruppe sind signifikant mehr T_H-Zellen (Abb. 20), mehr zytotoxische T-Zellen (Abb. 21) und mehr NKT-Zellen (Abb. 22) zu messen.

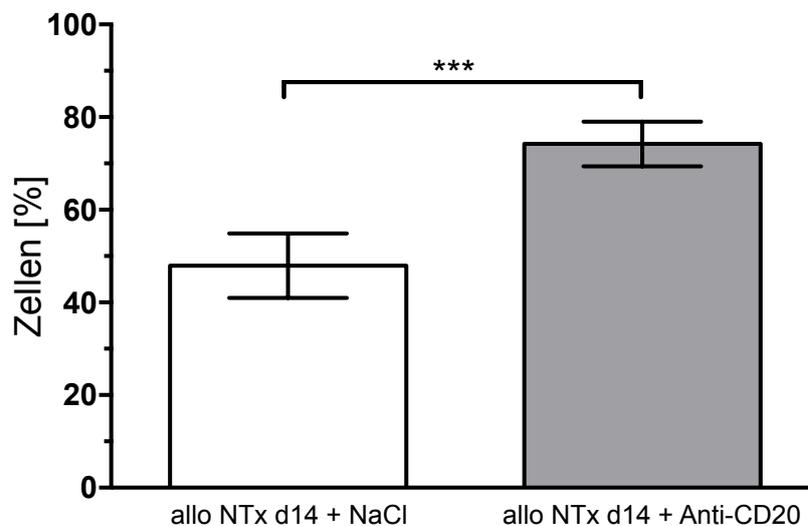


Abb. 17: T-Zellen (CD3⁺) in der Milz, zwei Wochen post NTx in % im Verhältnis zur gesamten Lymphozyten-Population.

Weiß: ‚allo NTx d14 + NaCl‘, grau: ‚allo NTx d14 + Anti-CD20‘. Signifikanz getestet mit einem ungepaarten t-Test: *** = 0,0001. Abk.: allo = allogren, d = Tag, NTx = Nierentransplantation.

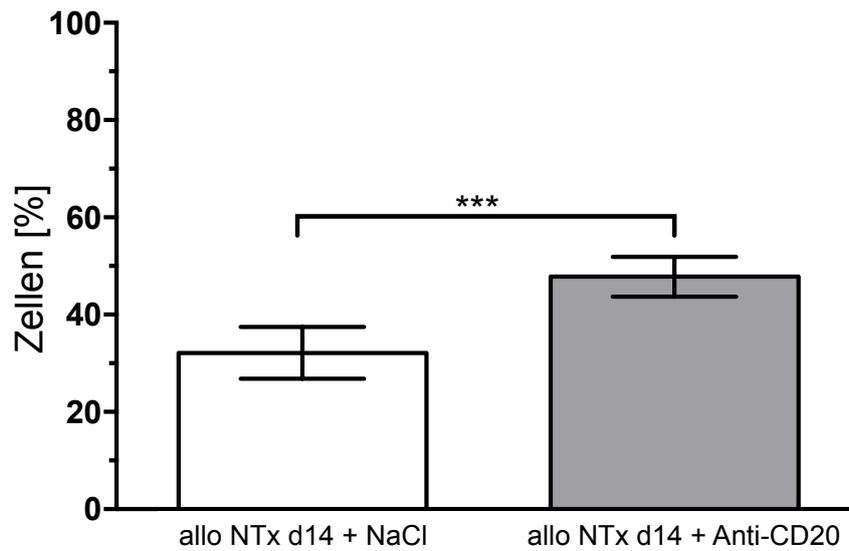


Abb. 18: T_H-Zellen (CD3⁺ CD4⁺) in der Milz, zwei Wochen post NTx in % im Verhältnis zur gesamten Lymphozyten-Population.

Weiß: ,allo NTx d14 + NaCl', grau: ,allo NTx d14 + Anti-CD20'. Signifikanz getestet mit einem ungepaarten t-Test: *** = 0,0008. Abk.: allo = allogene, d = Tag, T_H-Zellen = T-Helfer-Zellen, NTx = Nierentransplantation.

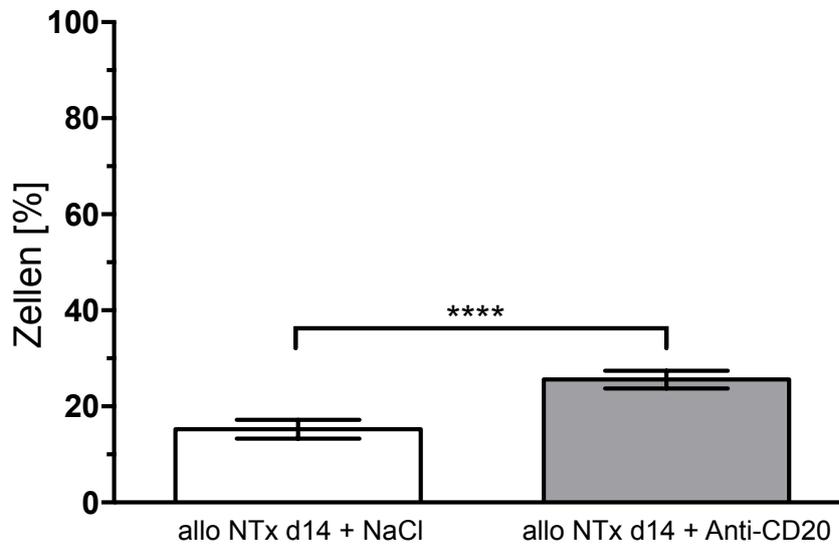


Abb. 19: Zytotoxische T-Zellen (CD3⁺ CD8⁺) in der Milz, zwei Wochen post NTx in % im Verhältnis zur gesamten Lymphozyten-Population.

Weiß: ,allo NTx d14 + NaCl', grau: ,allo NTx d14 + Anti-CD20'. Signifikanz getestet mit einem ungepaarten t-Test: **** < 0,0001. Abk.: allo = allogene, d = Tag, NTx = Nierentransplantation.

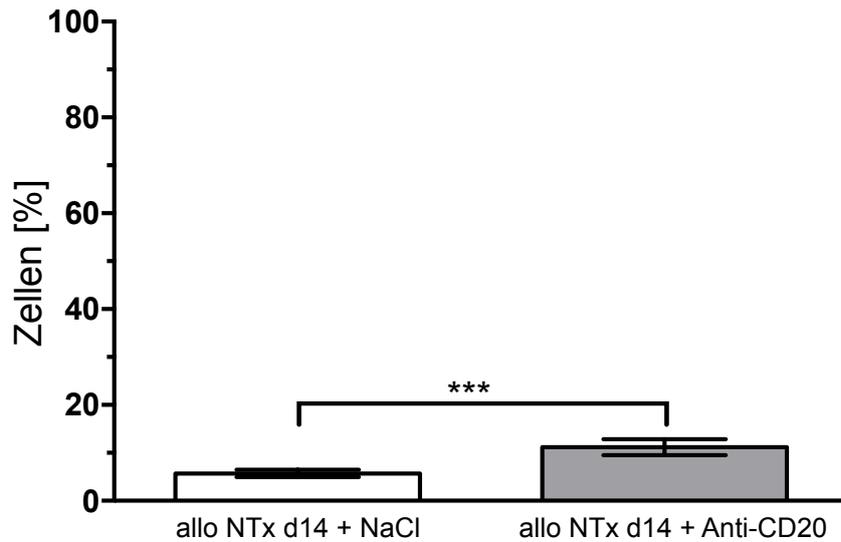


Abb. 20: NKT-Zellen (CD3⁺ CD161⁺) in der Milz, zwei Wochen post NTx in % im Verhältnis zur gesamten Lymphozyten-Population.

Weiß: ‚allo NTx d14 + NaCl‘, grau: ‚allo NTx d14 + Anti-CD20‘. Signifikanz getestet mit einem ungepaarten t-Test: *** = 0,0002. Abk.: allo = allogene, d = Tag, NKT-Zellen = Natürliche Killer T-Zellen, NTx = Nierentransplantation.

3.5.2 NK-Zellen

Zwei Wochen nach der NTx sind in der Versuchsgruppe signifikant mehr NK-Zellen zu messen als in der Kontrollgruppe. Dies ist in dem folgenden Diagramm (Abb. 23) einzeln dargestellt.

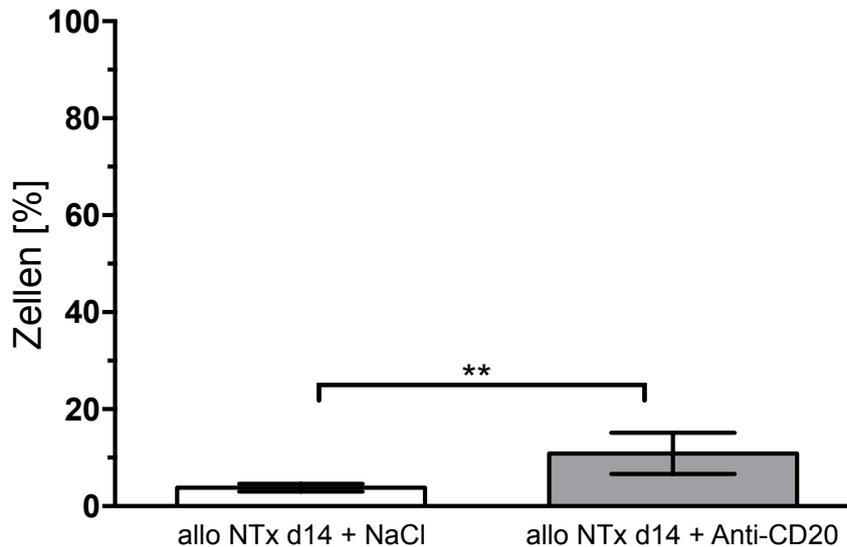


Abb. 21: NK-Zellen (CD3⁻ CD161^{high}) in der Milz, zwei Wochen post NTx in % im Verhältnis zur gesamten Lymphozyten-Population.

Weiß: ‚allo NTx d14 + NaCl‘, grau: ‚allo NTx d14 + Anti-CD20‘. Signifikanz getestet mit einem ungepaarten t-Test: ** = 0,0064. Abk.: allo = allogene, d = Tag, NK-Zellen = natürliche Killerzellen, NTx = Nierentransplantation.

3.5.3 B-Zellen

Zwei Wochen post OP ist kein signifikanter Unterschied zwischen den Versuchsgruppen in Bezug auf die gesamten B-Zellzahlen (Abb. 24) in der Milz zu beobachten. Dabei muss die große Standardabweichung in der ‚allo NTx d14 + Anti-CD20‘-Gruppe beachtet werden. Im Verhältnis zu der gesamten B-Zellpopulation konnten für die B-Zell-Subpopulationen folgende Ergebnisse ermittelt werden: T1 B-Zellen (Abb. 25) sind zwei Wochen nach der NTx in der Versuchsgruppe in signifikant größerer Anzahl vorhanden als in der Kontrollgruppe. Dahingegen sind signifikant weniger T2 B-Zellen (Abb. 26) und naive reife B-Zellen (Abb. 27) in der Versuchsgruppe zu detektieren. Switched B-Zellen (Abb. 28) sind signifikant vermehrt in der Versuchsgruppe zu beobachten im Vergleich zu der Kontrollgruppe.

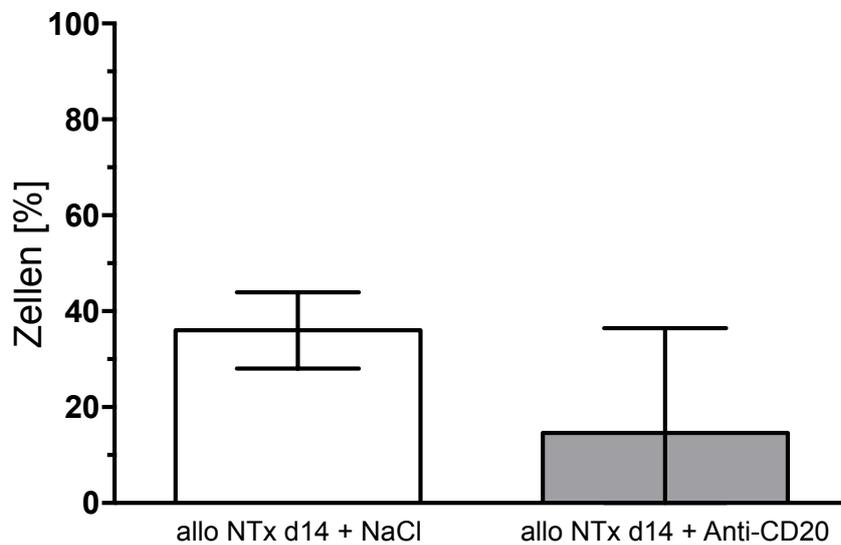


Abb. 22: B-Zellen (CD45RA⁺ IgG⁺) in der Milz, zwei Wochen post NTx in % im Verhältnis zur gesamten Lymphozyten-Population.

Weiß: ‚allo NTx d14 + NaCl‘, grau: ‚allo NTx d14 + Anti-CD20‘. Signifikanz getestet mit einem ungepaarten t-Test. Abk.: allo = allogene, d = Tag, NTx = Nierentransplantation.

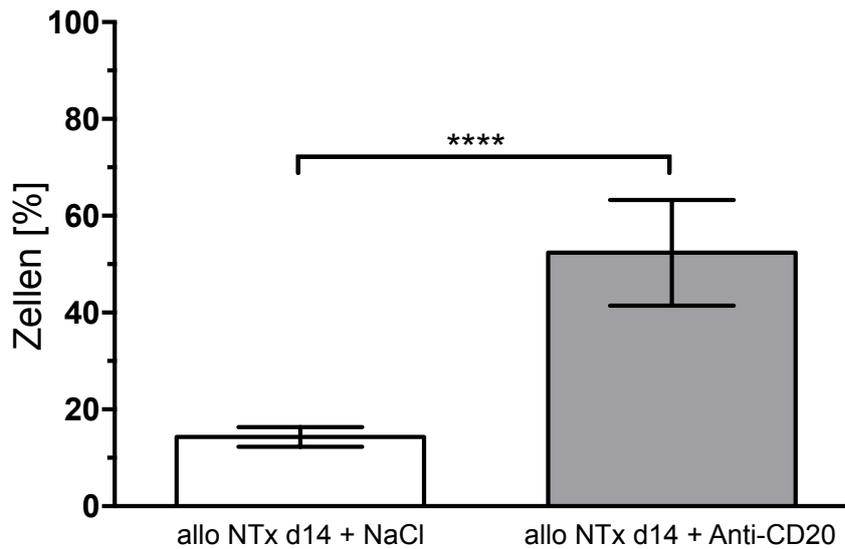


Abb. 23: T1 B-Zellen (IgD^{low} IgM^{medium}) in der Milz, zwei Wochen post NTx in % im Verhältnis zur gesamten B-Zell-Population.

Weiß: ‚allo NTx d14 + NaCl‘, grau: ‚allo NTx d14 + Anti-CD20‘. Signifikanz getestet mit einem ungepaarten t-Test: **** < 0,0001. Abk.: allo = allogene, d = Tag, NTx = Nierentransplantation, T1 B-Zellen = Transitional 1 B-Zellen.

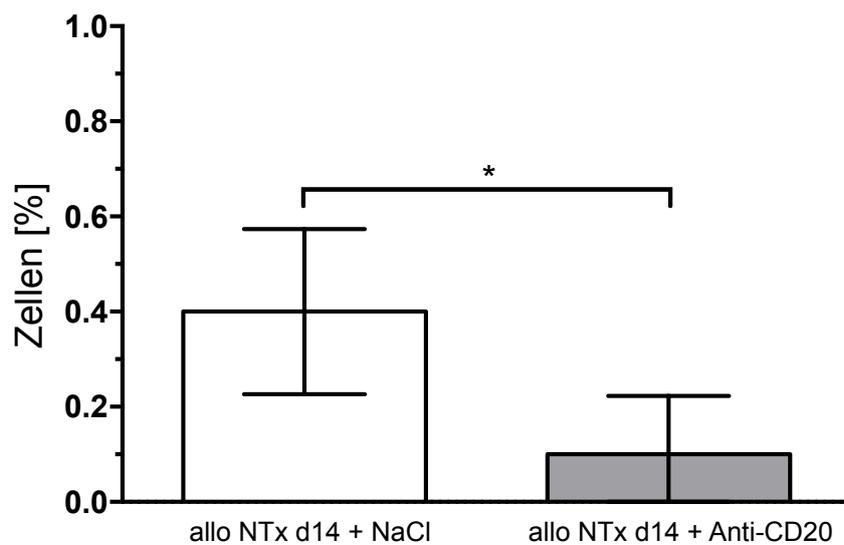


Abb. 24: T2 B-Zellen (IgD^{high} IgM^{high}) in der Milz, zwei Wochen post NTx in % im Verhältnis zur gesamten B-Zell-Population.

Weiß: ‚allo NTx d14 + NaCl‘, grau: ‚allo NTx d14 + Anti-CD20‘. Signifikanz getestet mit einem ungepaarten t-Test: * = 0,0133. Abk.: allo = allogene, d = Tag, NTx = Nierentransplantation, T2 B-Zellen = Transitional 2 B-Zellen.

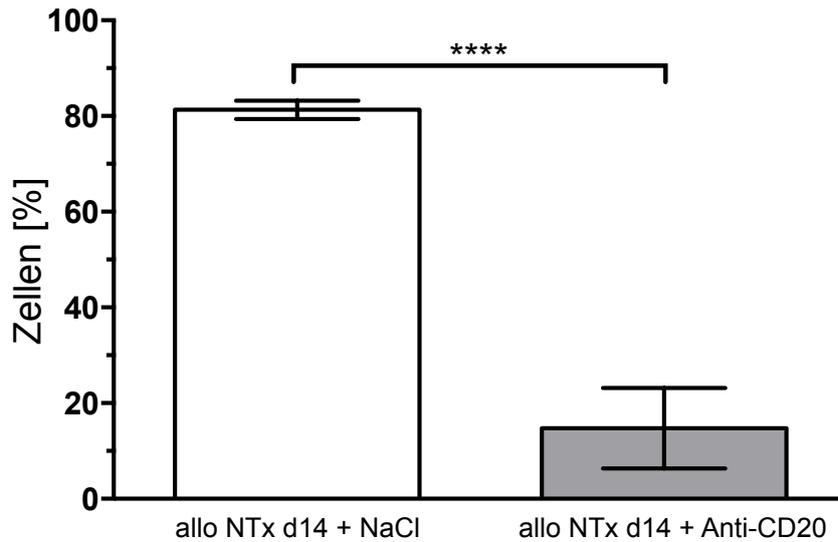


Abb. 25: Naive reife B-Zellen ($IgD^{\text{medium}} IgM^{\text{medium}}$) in der Milz, zwei Wochen post NTx in % im Verhältnis zur gesamten B-Zell-Population.

Weiß: ‚allo NTx d14 + NaCl‘, grau: ‚allo NTx d14 + Anti-CD20‘. Signifikanz getestet mit einem ungepaarten t-Test: **** < 0,0001. Abk.: allo = allogene, d = Tag, NTx = Nierentransplantation.

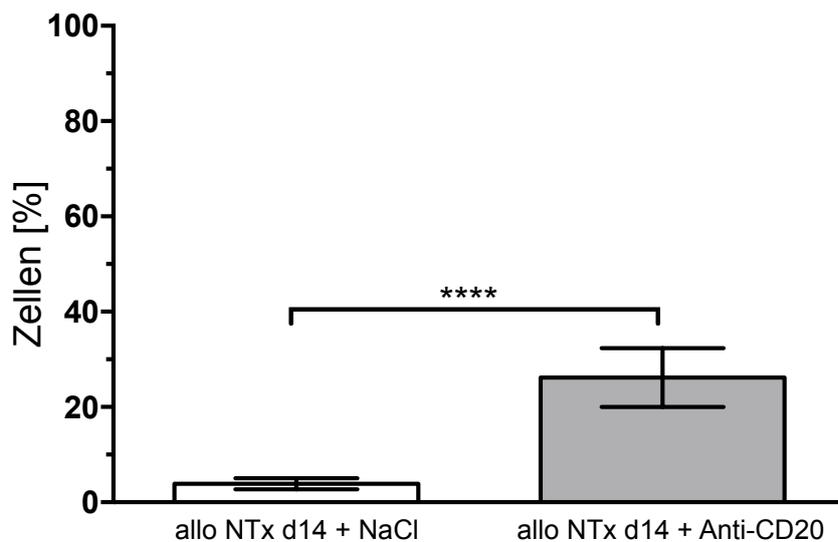


Abb. 26: Switched B-Zellen ($IgD^- IgM^-$) in der Milz, zwei Wochen post NTx in % im Verhältnis zur gesamten B-Zell-Population.

Weiß: ‚allo NTx d14 + NaCl‘, grau: ‚allo NTx d14 + Anti-CD20‘. Signifikanz getestet mit einem ungepaarten t-Test: **** < 0,0001. Abk.: allo = allogene, d = Tag, NTx = Nierentransplantation.

3.6 FACS-Analysen der Lymphknoten

Die genauen Zellzahlen sind im Anhang dieser Arbeit angegeben (Anhang 27 – Anhang 36).

3.6.1 T-Zellen

Zwei Wochen nach der NTx zeigt die Versuchsgruppe signifikant mehr T-Zellen in den Lymphknoten als die Kontrollgruppe (Abb. 30). Das gleiche ist in den Subpopulationen der

T_H- Zellen (Abb. 31), der zytotoxischen T-Zellen (Abb. 32) und der NKT-Zellen (Abb. 33) zu beobachten.

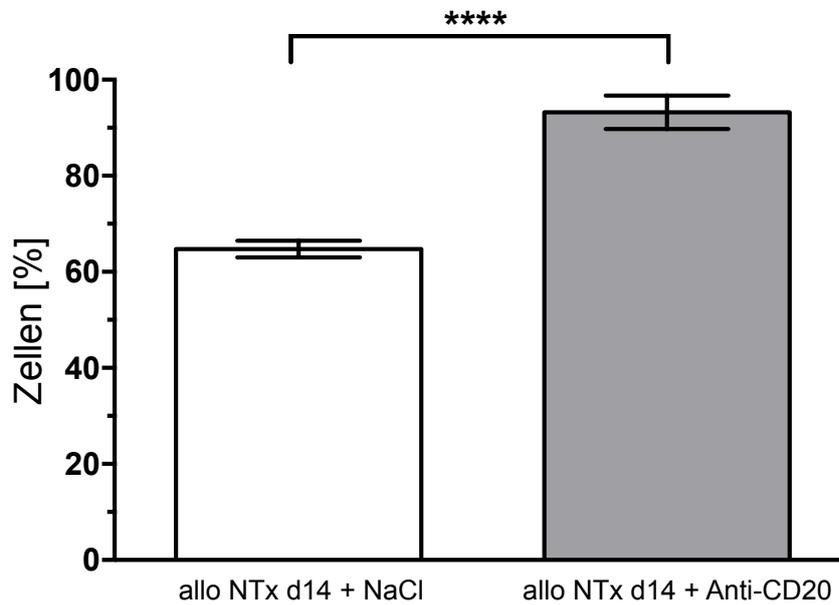


Abb. 27: T-Zellen (CD3⁺) in den Lymphknoten, zwei Wochen post NTx in % im Verhältnis zur gesamten Lymphozyten-Population.

Weiß: ‚allo NTx d14 + NaCl‘, grau: ‚allo NTx d14 + Anti-CD20‘. Signifikanz getestet mit einem ungepaarten t-Test: **** < 0,0001. Abk.: allo = allogene, d = Tag, NTx = Nierentransplantation.

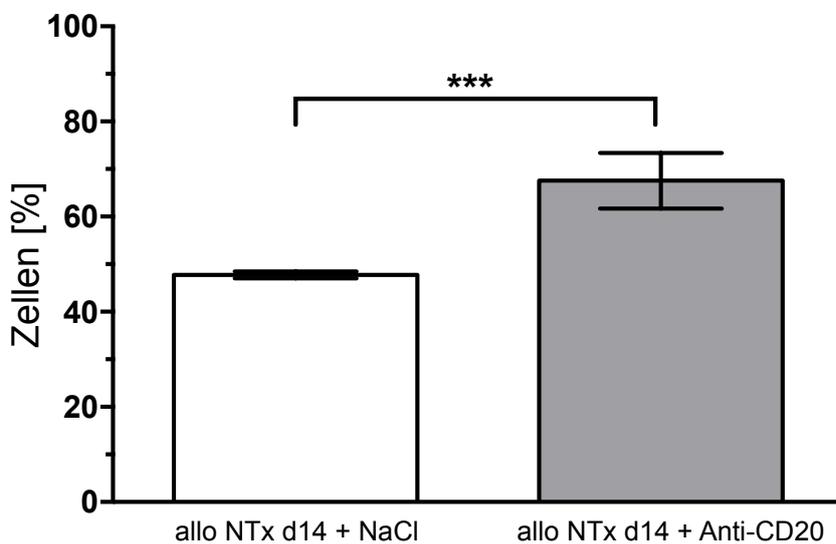


Abb. 28: T_H-Zellen (CD3⁺ CD4⁺) in den Lymphknoten, zwei Wochen post NTx in % im Verhältnis zur gesamten Lymphozyten-Population.

Weiß: ‚allo NTx d14 + NaCl‘, grau: ‚allo NTx d14 + Anti-CD20‘. Signifikanz getestet mit einem ungepaarten t-Test: *** = 0,0001. Abk.: allo = allogene, d = Tag, T_H-Zellen = T-Helfer-Zellen, NTx = Nierentransplantation.

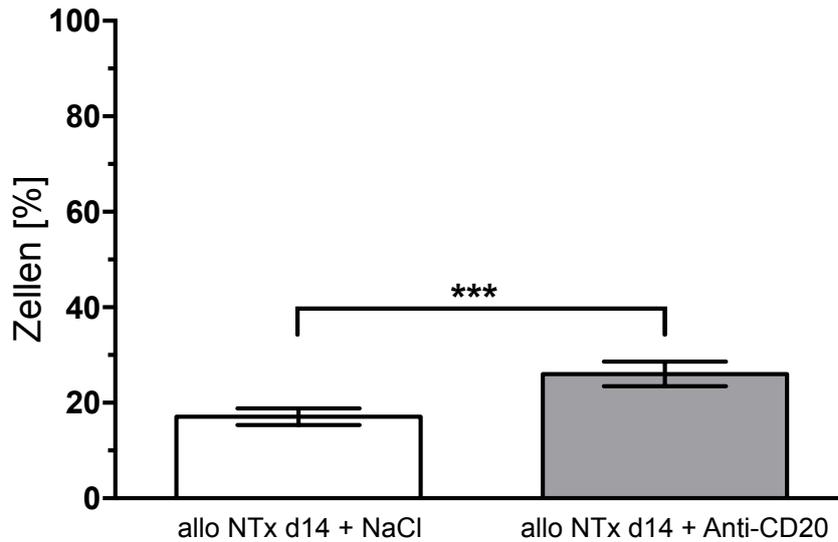


Abb. 29: Zytotoxische T-Zellen (CD3⁺ CD8⁺) in den Lymphknoten, zwei Wochen post NTx in % im Verhältnis zur gesamten Lymphozyten-Population.

Weiß: ‚allo NTx d14 + NaCl‘, grau: ‚allo NTx d14 + Anti-CD20‘. Signifikanz getestet mit einem ungepaarten t-Test: *** = 0,0004. Abk.: allo = allogene, d = Tag, NTx = Nierentransplantation.

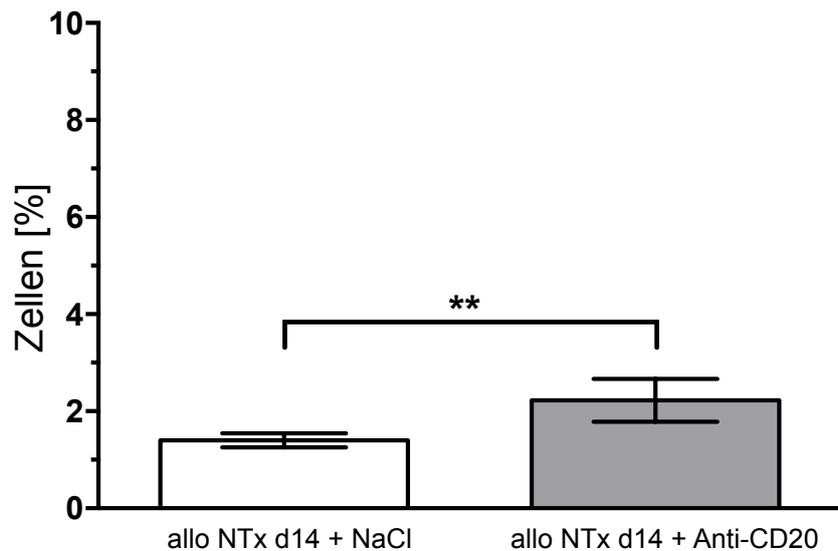


Abb. 30: NKT-Zellen (CD3⁺ CD161⁺) in den Lymphknoten, zwei Wochen post NTx in % im Verhältnis zur gesamten Lymphozyten-Population.

Weiß: ‚allo NTx d14 + NaCl‘, grau: ‚allo NTx d14 + Anti-CD20‘. Signifikanz getestet mit einem ungepaarten t-Test: ** = 0,0053. Abk.: allo = allogene, d = Tag, NKT-Zellen = Natürliche Killer T-Zellen, NTx = Nierentransplantation.

3.6.2 NK-Zellen

Zwei Wochen nach der NTx ist kein signifikanter Unterschied zwischen den NK-Zellen der Lymphknoten der beiden Versuchsgruppen zu detektieren, was in dem Diagramm (Abb. 34) veranschaulicht ist.

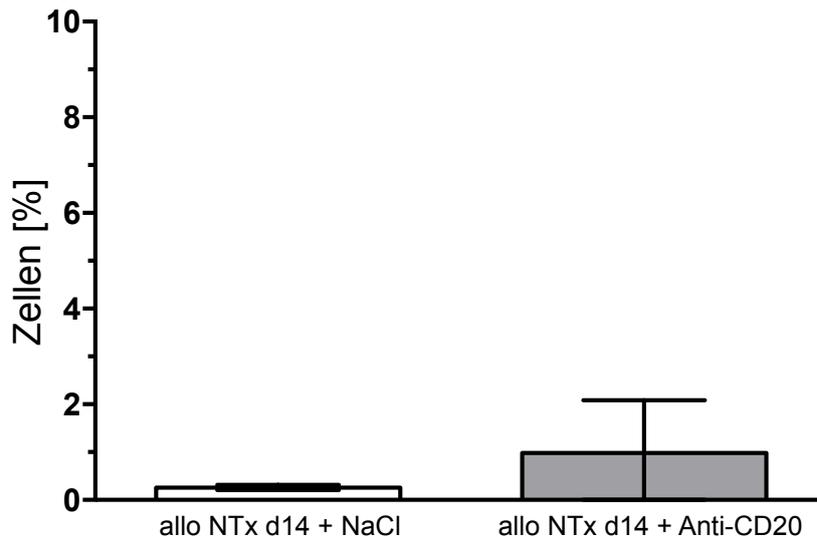


Abb. 31: NK-Zellen (CD3⁺ CD161^{high}) in den Lymphknoten, zwei Wochen post NTx in % im Verhältnis zur gesamten Lymphozyten-Population.

Weiß: ‚allo NTx d14 + NaCl‘, grau: ‚allo NTx d14 + Anti-CD20‘. Signifikanz getestet mit einem ungepaarten t-Test. Abk.: allo = allogenen, d = Tag, NK-Zelle = natürliche Killerzelle, NTx = Nierentransplantation.

3.6.3 B-Zellen

Zwei Wochen post OP sind in den Lymphknoten der Versuchsgruppe signifikant weniger B-Zellen insgesamt zu detektieren als in der Kontrollgruppe (Abb. 35). Für die B-Zell-Subpopulationen konnten im Verhältnis zu der gesamten B-Zellpopulation folgende Ergebnisse ermittelt werden: Es sind signifikant mehr T1 B-Zellen (Abb. 36) und Switched B-Zellen (Abb. 39) in der Versuchsgruppe zu verzeichnen als in der Kontrollgruppe. T2 B-Zellen (Abb. 37) und naive reife B-Zellen (Abb. 38) sind in den Lymphknoten der Versuchsgruppe zu diesem Zeitpunkt in geringerer Anzahl zu beobachten als in der Kontrollgruppe. Für die Subpopulation der naiven reifen B-Zellen ist dieser Unterschied signifikant. Die T2 B-Zell-Population unterscheidet sich nicht signifikant voneinander. Dabei muss auf die große Standardabweichung in den Ergebnissen der T2 B-Zellen hingewiesen werden.

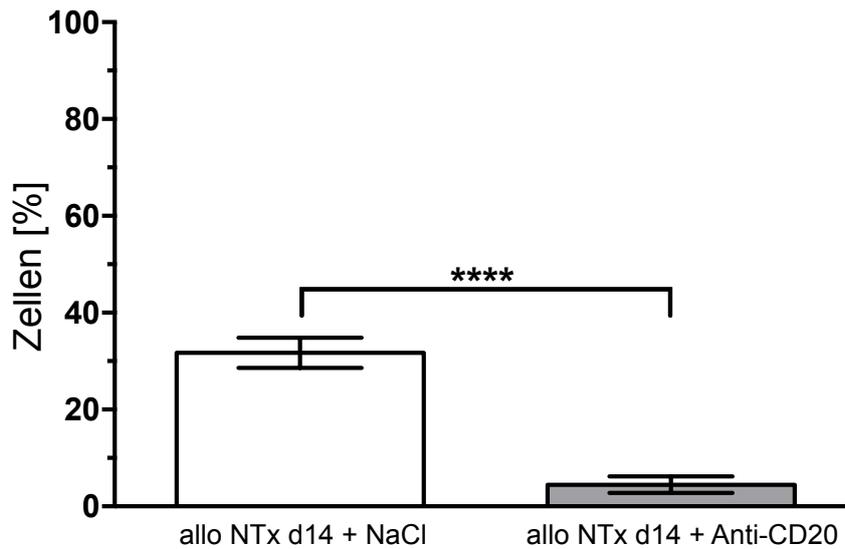


Abb. 32: B-Zellen (CD45RA⁺ IgG⁺) in den Lymphknoten, zwei Wochen post NTx in % im Verhältnis zur gesamten Lymphozyten-Population.

Weiß: ‚allo NTx d14 + NaCl‘, grau: ‚allo NTx d14 + Anti-CD20‘. Signifikanz getestet mit einem ungepaarten t-Test: **** < 0,0001. Abk.: allo = allogene, d = Tag, NTx = Nierentransplantation.

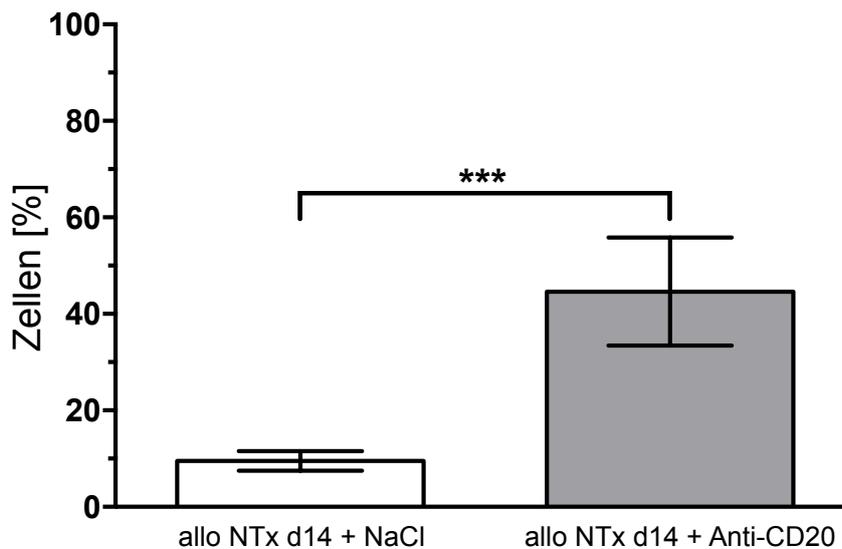


Abb. 33: T1 B-Zellen (IgD^{low} IgM^{medium}) in den Lymphknoten, zwei Wochen post NTx in % im Verhältnis zur gesamten B-Zell-Population.

Weiß: ‚allo NTx d14 + NaCl‘, grau: ‚allo NTx d14 + Anti-CD20‘. Signifikanz getestet mit einem ungepaarten t-Test: *** = 0,0002. Abk.: allo = allogene, d = Tag, NTx = Nierentransplantation, T1 B-Zellen = Transitional 1 B-Zellen.

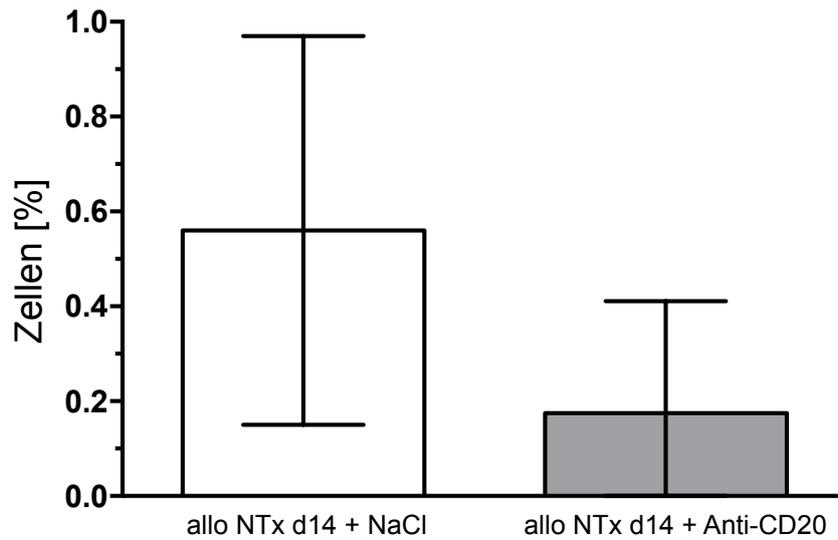


Abb. 34: T2 B-Zellen ($IgD^{high} IgM^{high}$) in den Lymphknoten, zwei Wochen post NTx in % im Verhältnis zur gesamten B-Zell-Population.

Weiß: ‚allo NTx d14 + NaCl‘, grau: ‚allo NTx d14 + Anti-CD20‘. Signifikanz getestet mit einem ungepaarten t-Test. Abk.: allo = allogene, d = Tag, NTx = Nierentransplantation, T2 B-Zellen = Transitional 2 B-Zellen.

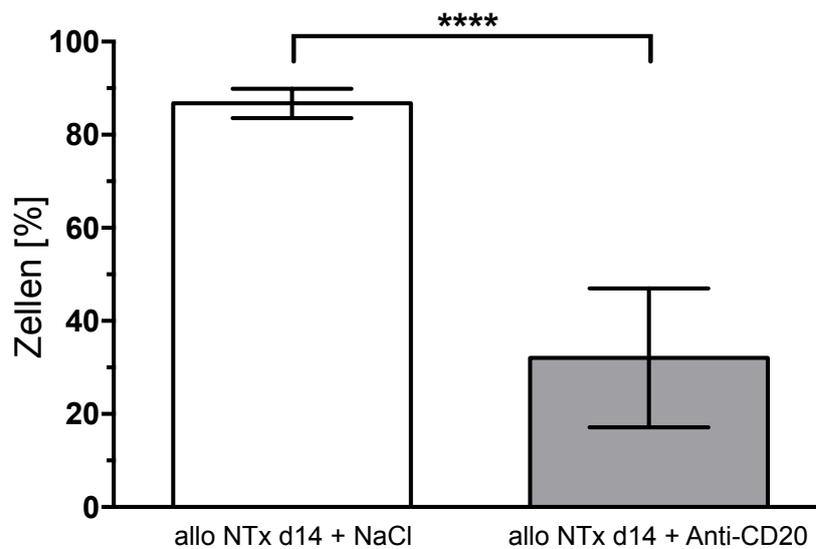


Abb. 35: Naive reife B-Zellen ($IgD^{medium} IgM^{medium}$) in den Lymphknoten, zwei Wochen post NTx in % im Verhältnis zur gesamten B-Zell-Population.

Weiß: ‚allo NTx d14 + NaCl‘, grau: ‚allo NTx d14 + Anti-CD20‘. Signifikanz getestet mit einem ungepaarten t-Test: **** < 0,0001. Abk.: allo = allogene, d = Tag, NTx = Nierentransplantation.

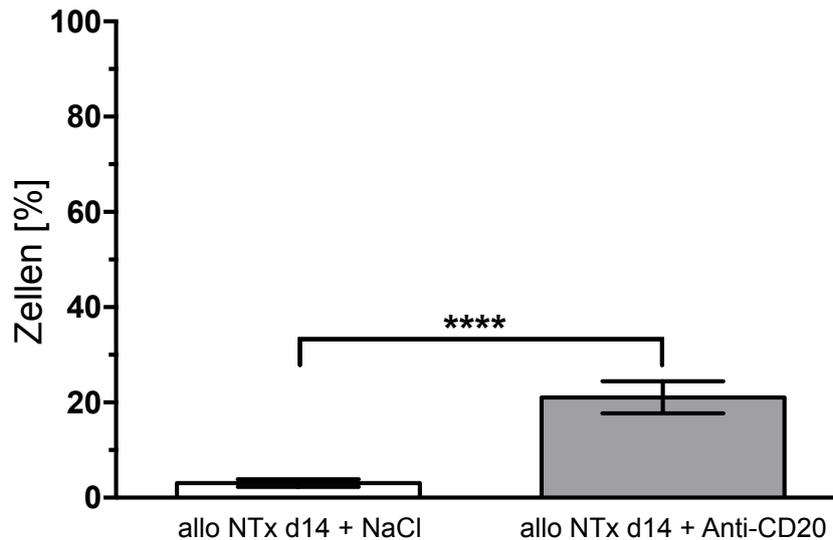


Abb. 36: Switched B-Zellen (IgD⁺ IgM⁺) in den Lymphknoten, zwei Wochen post NTx in % im Verhältnis zur gesamten B-Zell-Population.

Weiß: ‚allo NTx d14 + NaCl‘, grau: ‚allo NTx d14 + Anti-CD20‘. Signifikanz getestet mit einem ungepaarten t-Test: **** < 0,0001. Abk.: allo = allogene, d = Tag, NTx = Nierentransplantation.

3.7 Färbung Donor-spezifischer Antikörper

Die Ergebnisse des Gruppenvergleiches an produzierten DSA sind im nachfolgenden Diagramm veranschaulicht (Abb. 40). Im Anhang dieser Arbeit sind die genauen Angaben zu finden (Anhang 37). Vor der NTx ist eine geringe Menge an DSA in beiden Gruppen zu detektieren. Zwei Wochen nach der OP sind in der Kontrollgruppe signifikant mehr DSA produziert worden als in der Versuchsgruppe. Vier Wochen post NTx nähern sich die Werte der beiden Gruppe wieder aneinander an und zeigen keine signifikanten Unterschiede mehr. In der Versuchsgruppe ist zu diesem Zeitpunkt eine große Standardabweichung zu verzeichnen.

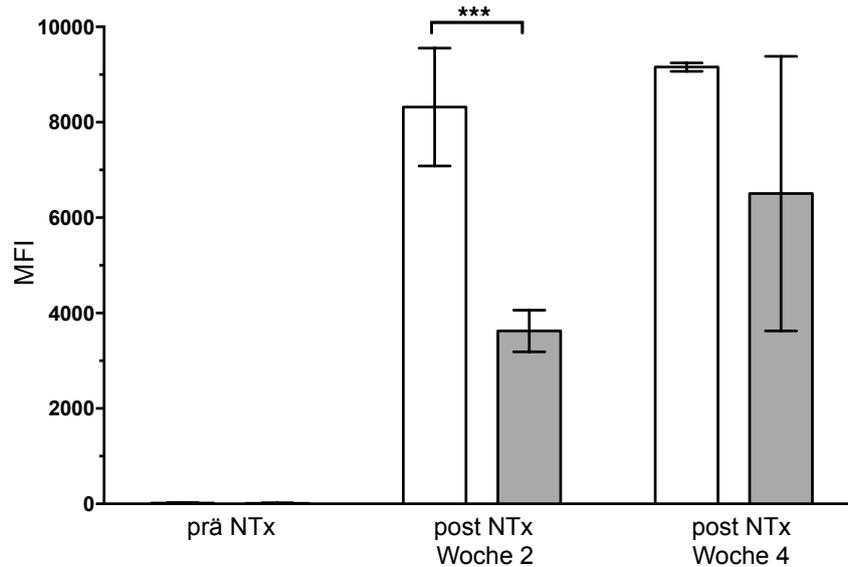


Abb. 37: Produktion von DSA im Gruppenvergleich.

Weiß: Vergleichsgruppe, grau: Versuchsgruppe, die Anti-CD20 verabreicht bekommen hat. Für den Zeitpunkt ‚prä NTx‘, wurde die ‚LEW-Normaltiere‘-Gruppe als Vergleichsgruppe mit der ‚LEW-Normaltier + Anti-CD20‘-Gruppe als Versuchsgruppe verglichen. Für den Zeitpunkt ‚post NTx Woche 2‘ wurde die ‚Allo NTx d14 + NaCl‘-Gruppe mit der Versuchsgruppe ‚Allo NTx d14 + Anti-CD20‘ verglichen, und für den Zeitpunkt ‚post NTx Woche 4‘ entsprechend die ‚Allo NTx d30 + NaCl‘-Gruppe mit der Versuchsgruppe ‚Allo NTx d30 + Anti-CD20‘. Signifikanz getestet mit einem ungepaarten t-Test: *** = 0,0004. Abk.: DSA = Donor-spezifische Antikörper, MFI = Mean Fluorescent Intensity, NTx = Nierentransplantation, allo = allogene.

3.8 EliSpot im Rattenmodell

3.8.1 Etablierung des EliSpot im Rattenmodell

Etablierung der Positivkontrolle

Für die Etablierung der Positivkontrolle wurden zwei Substanzen getestet: Concanavalin-A (4 µg / ml) und PMA + Ionomycin. Die LEW.1W Splenozyten (2×10^5 Zellen / Well) inkubierten für 20 Stunden mit den Reagenzien. Die Ergebnisse sind im Folgenden aufgeführt (Tab. 6):

Tab. 6: Punkteanzahl nach Stimulation von LEW.1W Splenozyten mit PMA + Ionomycin bzw. Concanavalin A.

Abk.: LEW.1W = LEWIS.1W, \bar{x} = Mittelwert.

Konzentration	\bar{x} (Punkte / Well)
PMA 30 ng / ml + Ionomycin 0,5 μ g / ml	397
PMA 40 ng / ml + Ionomycin 0,5 μ g / ml	380
PMA 50 ng / ml + Ionomycin 0,5 μ g / ml	102
PMA 30 ng / ml + Ionomycin 1 μ g / ml	698
PMA 40 ng / ml + Ionomycin 1 μ g / ml	661
PMA 50 ng / ml + Ionomycin 1 μ g / ml	643
Concanavalin A (4 μ g / ml)	272

Als Positivkontrolle für den EliSpot-Ansatz wurde die Stimulation mit 30 ng / ml PMA + 0,5 μ g / ml Ionomycin ausgewählt. Durch eine gleichmäßige und starke Stimulation kann die Fähigkeit der Zellen IFN γ zu produzieren offensichtlich überprüft werden.

Die Splenozyten des Spender-Pools konnten durch PMA (40 ng / ml) + Ionomycin (0,5 μ g / ml) und durch Concanavalin-A (4 μ g / ml) trotz vorheriger Bestrahlung zur IFN γ -Produktion stimuliert werden: Es wurde ein Mittelwert von 202 Punkte / Well detektiert.

Die Grundaktivität der Spender-Pool-Zellen beträgt im Mittel 3 Punkte / Well.

Verringerung der Produktivität der Spenderzellen + Reaktivität der Splenozyten von Versuchstieren auf Spender-Pool Zellen

Im zweiten Vorversuch wurde untersucht, ob mit einer verlängerten Inkubationszeit der Spender-Pool-Splenozyten nach dem Auftauen eine geringere IFN γ -Synthese erzielt werden kann. Die Spender-Pool-Zellen wurden nach dem Auftauen für 20 Stunden im Brutschrank stehen gelassen. Nach dieser Zeit zeigen die Spender-Pool-Splenozyten nach Stimulation durch PMA und Ionomycin eine stark verringerte Stimulierbarkeit zur IFN γ -Produktion: Im Mittel konnten nur 3 Punkte / Well detektiert werden.

Weiterhin wurde die Reaktivität von Normaltier 326 und Versuchstier 212 (allo NTx LEW.1W → LEW) auf die Zellen des Spender-Pools untersucht (Inkubationszeit nach Auftauen: 20 Stunden bei 37°C). Es wurden folgende Ergebnisse berechnet (Tab. 7):

Tab. 7: Reaktivität des Normaltieres und des Versuchstieres (allo NTx) auf die Spenderzellen, nachdem diese für 20 Stunden nach dem Auftauen inkubierten.

Abk.: \bar{x} = Mittelwert.

Versuchsansatz	\bar{x} (Punkte / Well)
Normaltier + Spender	3
Versuchstier (allo NTx) + Spender	6
Grundaktivität Spender	0

Zeitreihe der Spender-Pool-Zellen

Es wurde geprüft, wie lange die Inkubationszeit der aufgetauten Spenderzellen angesetzt werden muss, damit diese eine möglichst geringe IFN γ -Aktivität nach Stimulierung aufweisen. Dazu wurde eine Zeitreihe mit unterschiedlichen Inkubationszeiten der Spender-Splenozyten nach dem Auftauen durchgeführt: 2-, 5- und 10 Stunden. Die Zellen zeigen mit zunehmender Länge der Inkubationszeit eine geringere IFN γ -Produktion (Tab. 8):

Tab. 8: IFN γ -Aktivität von stimulierten Spenderzellen, nachdem diese verschiedene Inkubationszeiten nach dem Auftauen durchliefen.

Abk.: IFN γ = Interferon γ , \bar{x} = Mittelwert.

Inkubationszeit nach dem Auftauen (Stunden)	\bar{x} (Punkte / Well)
2	203
5	152
10	29

In diesem Ansatz wurden die Spenderzellen zusätzlich mit Splenozyten des Versuchstieres 212 versetzt. Mit zunehmender Inkubationszeit der Spenderzellen nach deren Auftauen werden die Zellen des Versuchstieres geringer stimuliert (Tab. 9).

Tab. 9: Reaktivität der Zellen des Versuchstieres auf die Spenderzellen, die verschiedene Inkubationszeiten nach dem Auftauen durchliefen.

Abk.: \bar{x} = Mittelwert.

Inkubationszeit nach dem Auftauen (Stunden)	\bar{x} (Punkte / Well)
2	33
5	27
10	21

Für die weiteren Vorversuche wurde festgelegt, dass die Spender-Pool-Zellen nach dem Auftauen 2 Stunden inkubieren. Dies rührt daher, dass die Grundaktivität der Spender-Pool-Zellen in den Kontrollen im Mittel über die ersten drei Vorversuche nur 1 Spot / Well beträgt. Zudem wurde der Aspekt der Stimulation der Spenderzellen durch die Zellen des

Versuchstieres folgendermaßen beurteilt: Alle Ansätze werden mit Zellen desselben Spender-Pools durchgeführt. Beim Vergleich der Endergebnisse untereinander hebt sich die Aktivität der Spenderzellen folglich auf.

LEW.1W-Splenozyten + Wista-Splenozyten: weitere negativ Kontrolle

Um nachzuweisen, dass die Reaktivität der LEW-Zellen in den vorherigen Ansätzen auf die Vorimmunisierung durch die allo NTx zurückzuführen ist, wurden Splenozyten einer Wistar-Ratte (zu LEW.1W Ratten komplett MHC-inkompatibel) mit Zellen des Spender-Pools inkubiert (Tab. 10).

Tab. 10: Reaktivität von Wista-Zellen auf Spenderzellen.

Abk.: \bar{x} = Mittelwert.

Versuchsansatz	\bar{x} (Punkte / Well)
Wista-Splenozyten + Spender	0
Positivkontrolle	236
Grundaktivität Wista	0

Die LEW.1W Splenozyten des Spender-Pools konnten die Wistar-Splenozyten nicht zur IFN γ -Produktion stimulieren. Somit kann dieser Ansatz als weitere negativ Kontrolle für die Methode gelten.

Die Positivkontrolle zeigt die Fähigkeit zur IFN γ -Produktion deutlich.

Das Ausbleiben der IFN γ -Produktion der Wista-Zellen nach Stimulation mit Spender-Pool-Zellen ist auf das Fehlen einer Vorimmunisierung mit Zellen dieses Stammes zurückzuführen. Dies zeigt demnach auch, dass die Aktivität der Versuchstierzellen in den Ansätzen Spender + Versuchstier (212) auf deren Vorimmunisierung mit LEW.1W-Zellen im Rahmen der NTx zurückzuführen ist.

Erhöhte Zellkonzentration + verlängerte Inkubationszeit

Um zu untersuchen, ob sich höhere Zellkonzentrationen und verlängerte Inkubationszeiten auf die Aktivität der Versuchstierzellen auswirken, wurden alle Zellen mit einer Konzentration von 3×10^5 Zellen / Well eingesetzt. Außerdem wurde die Inkubationszeit mit den Spenderzellen von 20 auf 42 Stunden verlängert. Als Responder wurden das Versuchstier 212 und Wista-Splenozyten als Kontrolle eingesetzt.

Die Veränderungen bewirken eine stärkere Aktivität der Versuchstierzellen (Tab. 11):

Tab. 11: Reaktivität der Zellen in erhöhter Zellkonzentration und nach verlängerter Inkubationszeit auf Spenderzellen.

Abk.: \bar{x} = Mittelwert.

Versuchsansatz	\bar{x} (Punkte / Well)
Versuchstier + Spender	42
Wista-Splenozyten + Spender	0

Nach diesem Vorversuch wurde der Versuchsaufbau, wie im Methodenteil beschrieben, festgelegt. Es wurden die im Folgenden aufgeführten Gruppen gemessen (Tab. 12).

Tab. 12: Versuchsgruppen im EliSpot.

Abk.: n = Anzahl, d = Tag, allo = allogene.

Gruppe	n
LEW-Normaltiere	2
LEW-Normaltier + Anti-CD20	3
Allo NTx d14 + NaCl	5
Allo NTx d14 + Anti-CD20	6
Allo NTx d30 + NaCl	2
Allo NTx d30 + Anti-CD20	5

Die Werte der ‚LEW-Normaltiere‘-Gruppe wurden als prä-NTx-Wert verwendet, die der ‚LEW-Normaltier + Anti-CD20‘-Gruppe als prä-NTx-Wert mit Anti-CD20 Behandlung.

3.8.2 Ergebnisse im EliSpot

Die genauen Spotanzahlen sind im Anhang im Detail aufgeführt und im Folgenden grafisch dargestellt (Anhang 38, Abb. 41). Der Gruppenvergleich zeigt zu keinem Zeitpunkt signifikante Unterschiede.

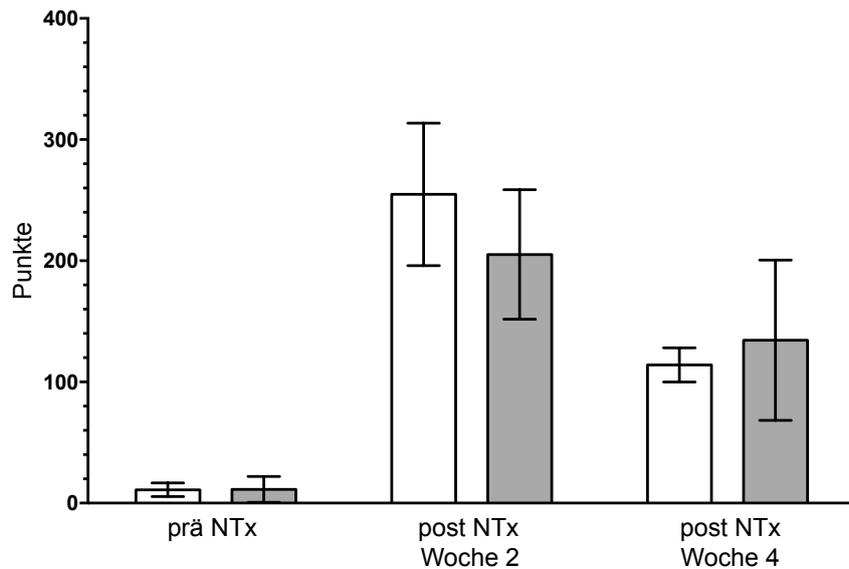


Abb. 38: Durchschnittliche T-Zell-Reaktivität auf Spender-Splenozyten vor und nach der NTx.

Weiß: Vergleichsgruppe, grau: Versuchsgruppe, die Anti-CD20 verabreicht bekommen hat. Für den Zeitpunkt ‚prä NTx‘, wurde die ‚LEW-Normaltiere‘-Gruppe als Vergleichsgruppe mit der ‚LEW-Normaltier + Anti-CD20‘-Gruppe als Versuchsgruppe verglichen. Für den Zeitpunkt ‚post NTx Woche 2‘ wurde die ‚Allo NTx d14 + NaCl‘-Gruppe mit der Versuchsgruppe ‚Allo NTx d14 + Anti-CD20‘ verglichen, und für den Zeitpunkt ‚post NTx Woche 4‘ entsprechend die ‚Allo NTx d30 + NaCl‘-Gruppe mit der Versuchsgruppe ‚Allo NTx d30 + Anti-CD20‘. Die Signifikanz wurde getestet mit einem ungepaarten t-Test. Abk.: NTx = Nierentransplantation, allo = allogren, d = Tag.

3.9 Histologische Färbung der NTx-Nieren

Zur Beurteilung des bindegewebigen Aufbaus der NTx-Nieren zwei Wochen post NTx, wurde die PAS-Reaktion verwendet. Aufgrund der starken Destruktion der Organe konnte die Auswertung nicht nach allgemeingültigen histologischen Kriterien erfolgen.

Deutlich zu erkennen ist die geringe Anzahl an Zellkernen und das weitestgehende Fehlen intakter Nephronstrukturen (Abb. 44, Abb. 45). Stattdessen sind fibrotische Umbauprozesse, genauso wie bereits sklerotisch und ödematös veränderte Bereiche zu beobachten (Abb. 42, Abb. 43). Der Großteil der Nieren zeigt zudem Einblutungen (Abb. 44, Abb. 45), in deren Umgebung mononukleäre Zellinfiltrate zu erkennen sind (Abb. 46, Abb. 47). Die Gewebe sind nekrotisch verändert, wobei das Ausmaß variiert. Es lassen sich keine Unterschiede zwischen den Gruppen ausmachen. Nachfolgend sind repräsentative Bilder jeder Gruppe aufgeführt.

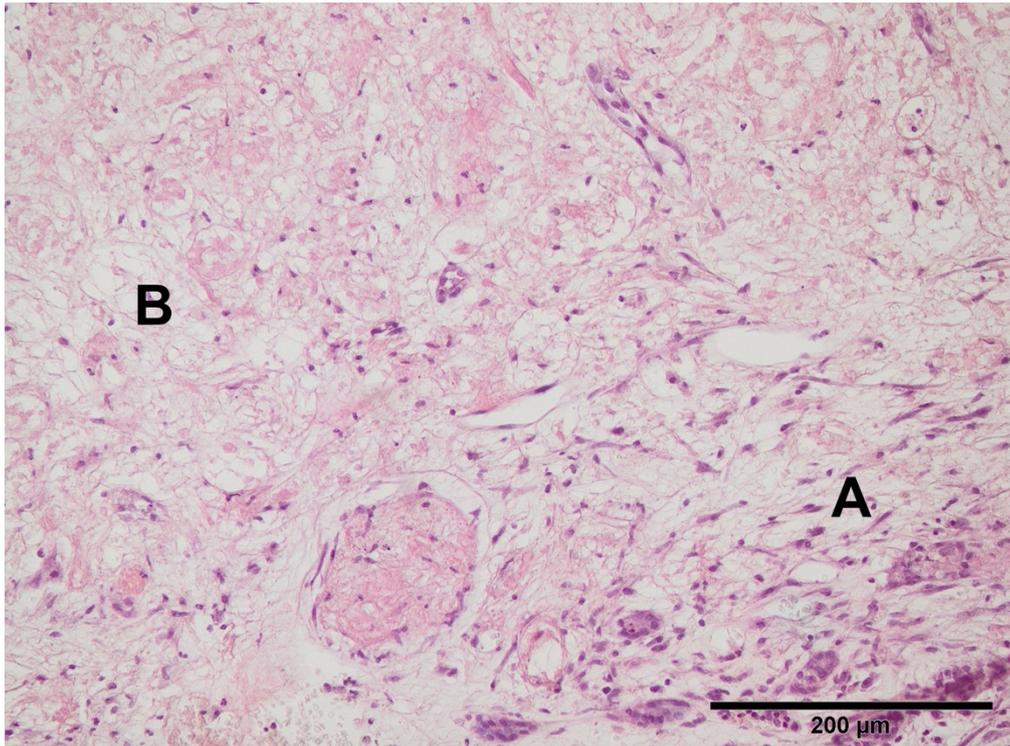


Abb. 39: PAS-Reaktion eines Nierentransplantats aus der Gruppe ‚allo NTx d14 + NaCl‘ zwei Wochen post NTx: Fibrotischer Umbau und Sklerödem.

Abgebildet ist ein Ausschnitt, der fibrotischen Umbau (A) und ein Sklerödem (B) zeigt. 200x-fache Vergrößerung. Versuchstier: LEW 313 ‚allo NTx d14 + NaCl‘. Abk.: NTx = Nierentransplantation, LEW = LEWIS, allo = allogene, d = Tag.

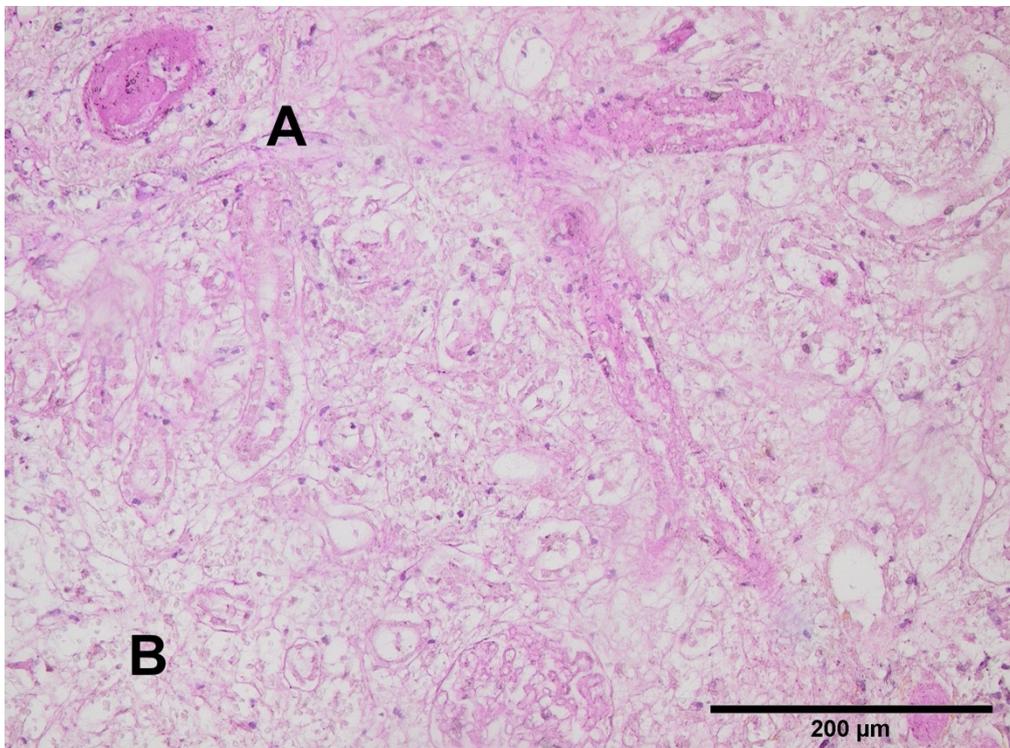


Abb. 40: PAS-Reaktion eines Nierentransplantats aus der Gruppe ‚allo NTx d14 + Anti-CD20‘ zwei Wochen post NTx: Fibrotischer Umbau und Sklerödem.

Abgebildet ist ein Ausschnitt, der fibrotischen Umbau (A) und ein Sklerödem (B) zeigt. 200x-fache Vergrößerung. Versuchstier: LEW 328 ‚allo NTx d14 + Anti-CD20‘. Abk.: NTx = Nierentransplantation, LEW = LEWIS, allo = allogene, d = Tag.

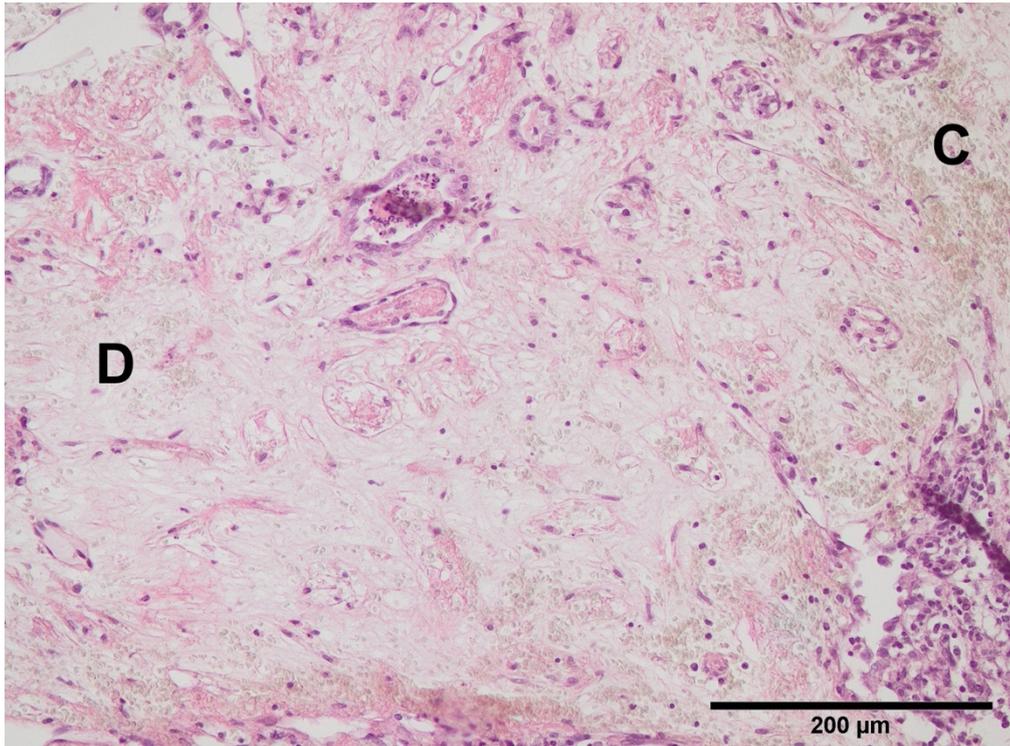


Abb. 41: PAS-Reaktion eines Nierentransplantats aus der Gruppe ‚allo NTx d14 + NaCl‘ zwei Wochen post NTx: Einblutungen und reduzierte Zellkernzahlen.

Abgebildet ist ein Ausschnitt, der Einblutungen in das Nierenparenchym (C) und eine stark verminderte Anzahl an Zellkernen (D) zeigt. 200x-fache Vergrößerung. Versuchstier: LEW 315 ‚allo NTx d14 + NaCl‘. Abk.: NTx = Nierentransplantation, LEW = LEWIS, allo = allogene, d = Tag.

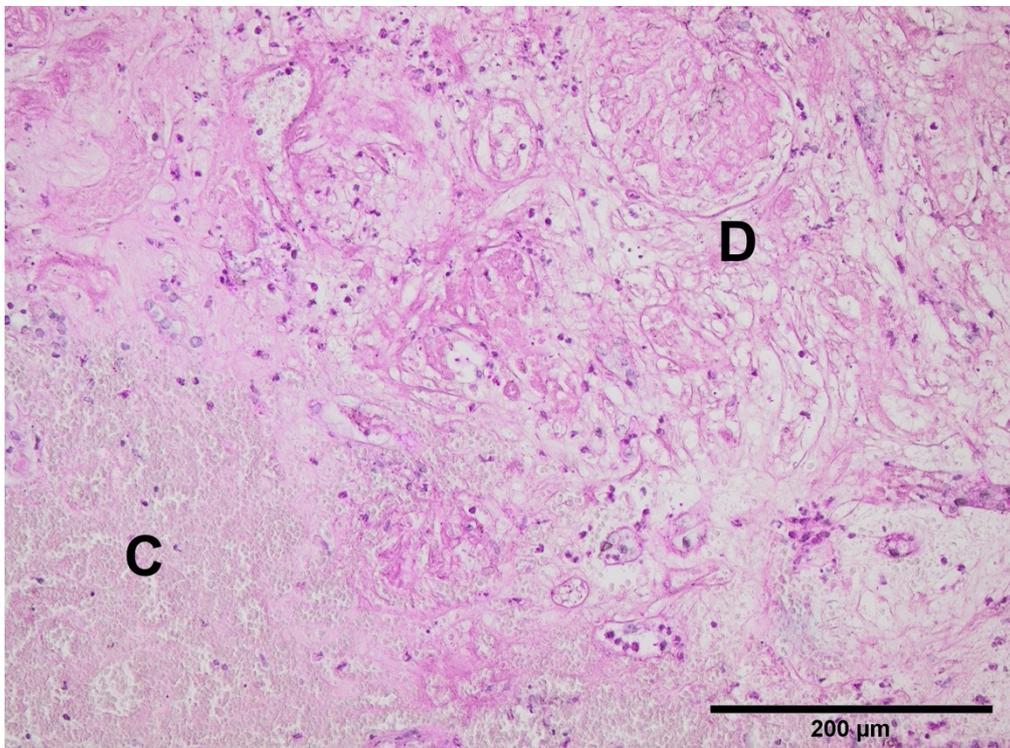


Abb. 42: PAS-Reaktion eines Nierentransplantats aus der Gruppe ‚allo NTx d14 + Anti-CD20‘ zwei Wochen post NTx: Einblutungen und reduzierte Zellkernzahlen.

Abgebildet ist ein Ausschnitt, der Einblutungen in das Nierenparenchym (C) und eine stark verminderte Anzahl an Zellkernen (D) zeigt. 200x-fache Vergrößerung. Versuchstier: LEW 328 ‚allo NTx d14 + Anti-CD20‘. Abk.: NTx = Nierentransplantation, LEW = LEWIS, allo = allogene, d = Tag.

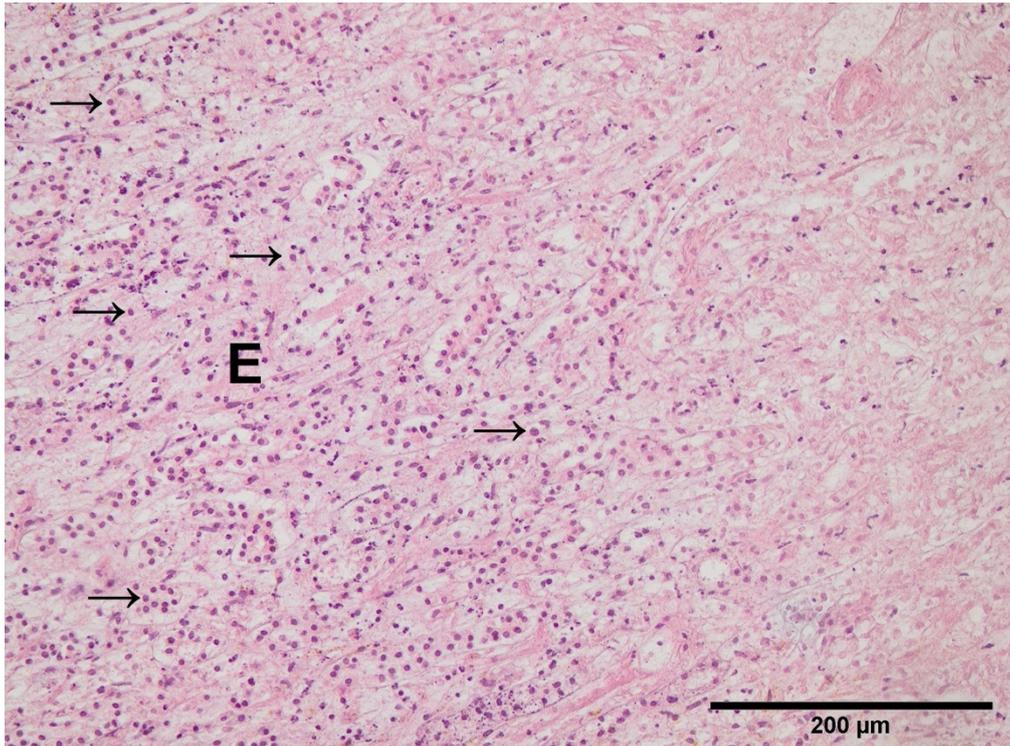


Abb. 43: PAS-Reaktion eines Nierentransplantats aus der Gruppe ‚allo NTx d14 + NaCl‘ zwei Wochen post NTx: mononukleäres Zellinfiltrat.

Abgebildet ist ein Ausschnitt, der eingewanderte mononukleäre Zellen (E, Pfeile zeigen beispielhaft auf mononukleäre Zellen) zeigt. 200x-fache Vergrößerung. Versuchstier: LEW 313 ‚allo NTx d14 + NaCl‘. Abk.: NTx = Nierentransplantation, LEW = LEWIS, allo = allogene, d = Tag.

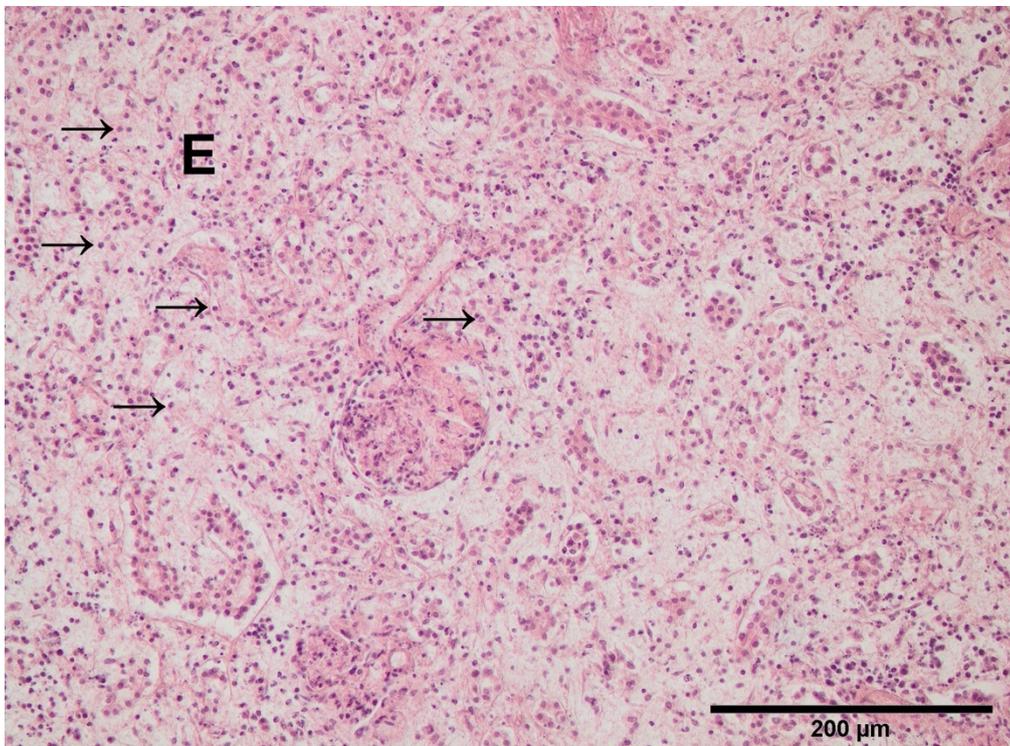


Abb. 44: PAS-Reaktion eines Nierentransplantats aus der Gruppe ‚allo NTx d14 + Anti-CD20‘ zwei Wochen post NTx: mononukleäres Zellinfiltrat.

Abgebildet ist ein Ausschnitt, der eingewanderte mononukleäre Zellen (E, Pfeile zeigen beispielhaft auf mononukleäre Zellen) zeigt. 200x-fache Vergrößerung. Versuchstier: LEW 318 ‚allo NTx d14 + Anti-CD20‘. Abk.: NTx = Nierentransplantation, LEW = LEWIS, allo = allogene, d = Tag.

3.10 Immunhistologie

3.10.1 Immunhistologische Färbung von B-Zellen

Die B-Zellen wurden in den Gewebeschnitten der NTx-Nieren zwei Wochen post OP mit dem AK-Klon Ki-B1R gefärbt. Die unten aufgeführten Bilder stehen repräsentativ für die Versuchsgruppen (Abb. 48, Abb. 49).

Bei allen Gewebeschnitten ist das Auszählen von je zehn Gesichtsfeldern aufgrund der stark fortgeschrittenen Destruktion des Nierengewebes nicht möglich. Dennoch konnten in allen Geweben vereinzelte B-Zellen nachgewiesen werden. KiB1-positive Zellen sind auch in der Versuchsgruppe, welcher der B-Zell depletierende AK injiziert wurde, aufzufinden. Somit konnte kein signifikanter Unterschied in Bezug auf das Vorhandensein von B-Zellen in den Geweben zwischen den beiden Versuchsgruppen aufgezeigt werden.

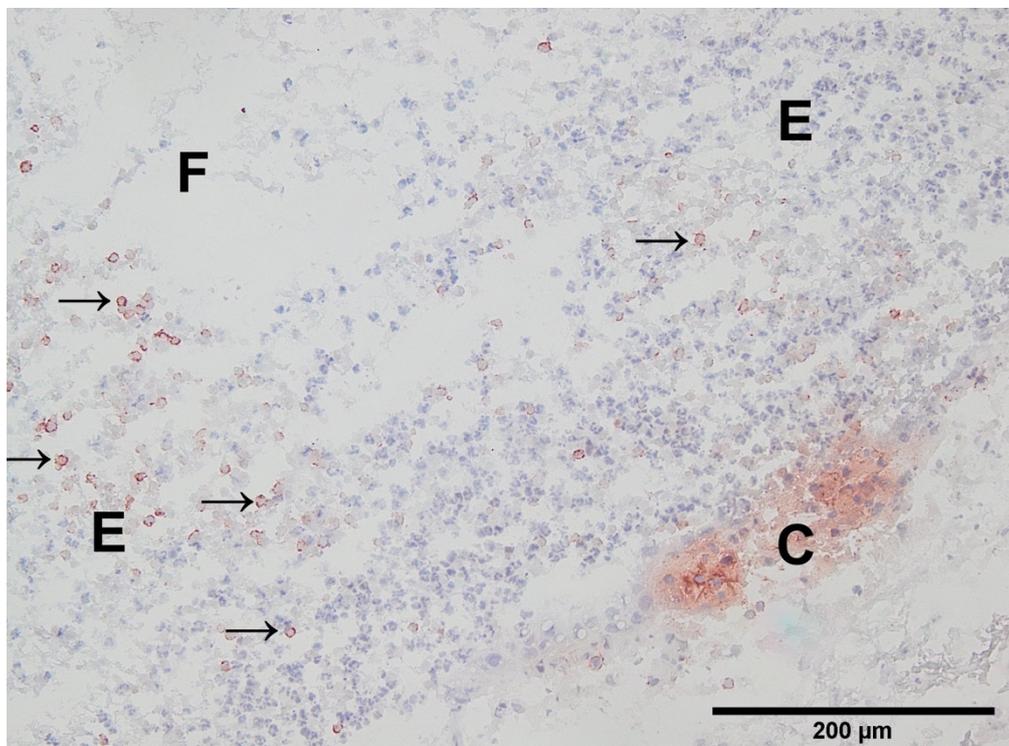


Abb. 45: Immunhistologische B-Zell-Färbung eines Nierentransplantats aus der Gruppe ‚allo NTx d14 + NaCl‘ zwei Wochen post NTx.

Es ist ein Zellinfiltrat mit vereinzelten immunhistologisch angefärbten B-Zellen (E, Pfeile zeigen beispielhaft auf angefärbte B-Zellen), nekrotischen Arealen (F) und eine Einblutung (C) abgebildet. 200x-fache Vergrößerung. Versuchstier: LEW 315 ‚allo NTx d14 + NaCl‘. Abk.: NTx = Nierentransplantation, LEW = LEWIS, allo = allogene, d = Tag.

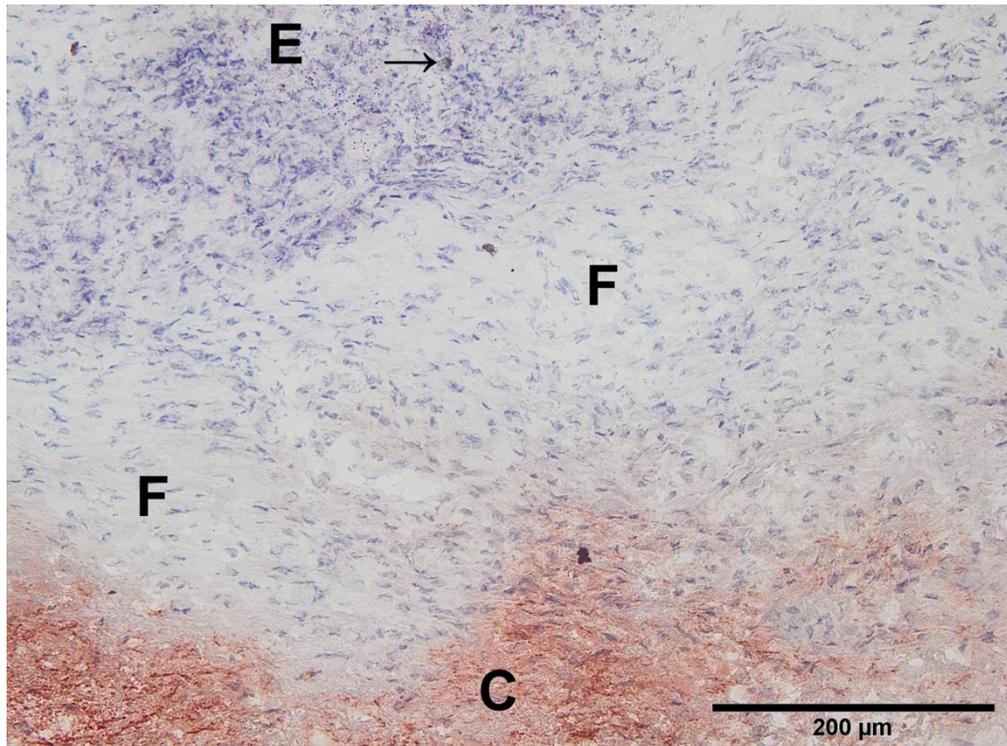


Abb. 46: Immunhistologische B-Zell-Färbung eines Nierentransplantats aus der Gruppe ,allo NTx d14 + Anti-CD20' zwei Wochen post NTx.

Es ist ein Gewebeabschnitt mit Einblutung (C), nekrotischen Arealen (F) und infiltrierenden Zellen (E), unter denen eine vereinzelte B-Zelle zu erkennen ist (Pfeil zeigt auf die angefärbte B-Zelle), abgebildet. 200x-fache Vergrößerung. Versuchstier: LEW 327 ,allo NTx d14 + Anti-CD20'. Abk.: NTx = Nierentransplantation, LEW = LEWIS, allo = allogene, d = Tag.

3.10.2 Immunhistologische Färbung von T-Zellen

Die NTx-Nierengewebe wurden mit Hilfe des TCR-AK auf das Vorhandensein von infiltrierenden T-Zellen untersucht. Die repräsentativ für beide Versuchsgruppen aufgeführten Bilder zeigen die histologische Struktur der NTx-Nierengewebe (Abb. 50, Abb. 51).

Die Gewebeschnitte konnten durch den weit fortgeschrittenen nekrotischen Umbau nicht nach allgemeingültigen Kriterien ausgewertet werden. Infiltrierende Zellen sind vereinzelt aufzufinden. Diese zeigen in den Gewebeproben beider Versuchsgruppen keine TCR-positiven Zellen. Die Zellinfiltrate unterscheiden sich in der Anzahl an T-Zellen zwischen den beiden Gruppen also nicht signifikant voneinander.

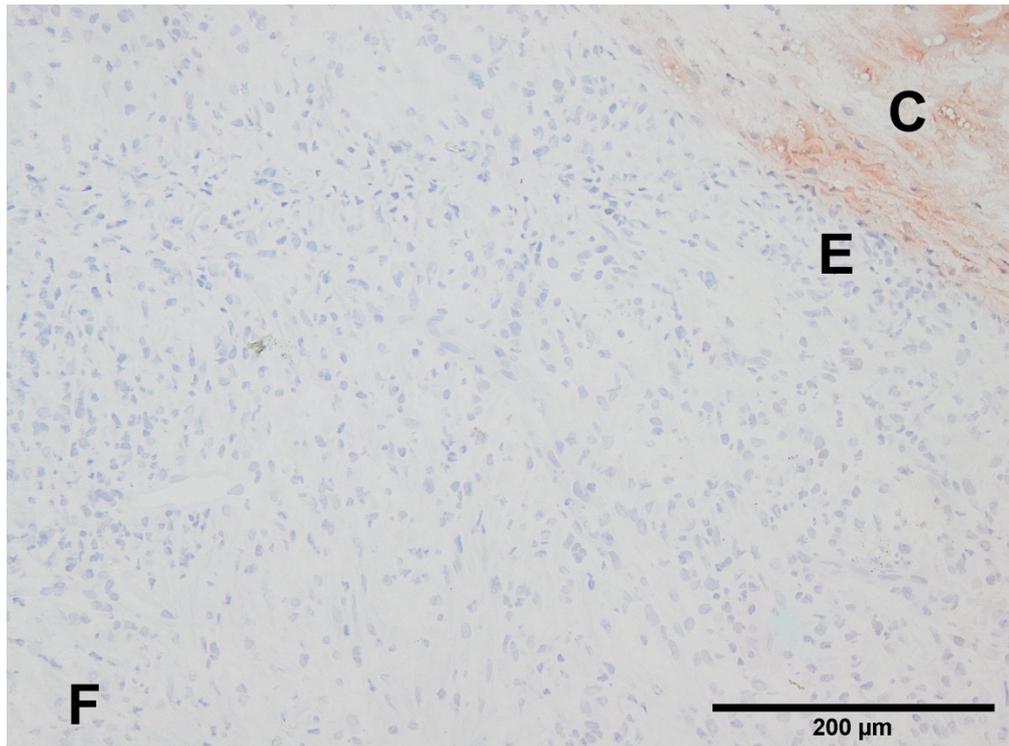


Abb. 47: Immunhistologische T-Zell-Färbung eines Nierentransplantats aus der Gruppe ‚allo NTx d14 + NaCl‘ zwei Wochen post NTx.

Es sind eine Einblutung (C), nekrotische Anteile (F) und infiltrierende Zellen (E) abgebildet. Es können keine T-Zellen detektiert werden. 200x-fache Vergrößerung. Versuchstier: LEW 317 ‚allo NTx d14 + NaCl‘. Abk.: NTx = Nierentransplantation, LEW = LEWIS, allo = allogene, d = Tag.

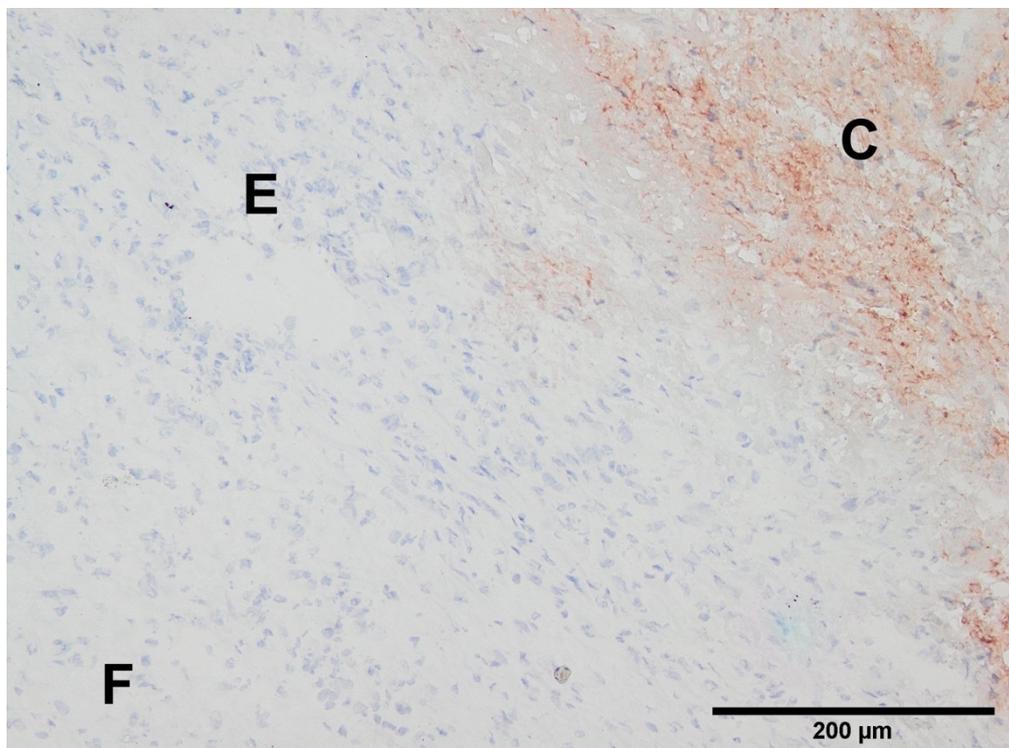


Abb. 48: Immunhistologische T-Zell-Färbung eines Nierentransplantats aus der Gruppe ‚allo NTx d14 + Anti-CD20‘ zwei Wochen post NTx.

Es sind eine Einblutung (C), nekrotische Anteile (F) und infiltrierende Zellen (E) abgebildet. T-Zellen sind nicht zu erkennen. 200x-fache Vergrößerung. Versuchstier: LEW 327 ‚allo NTx d14 + Anti-CD20‘. Abk.: NTx = Nierentransplantation, LEW = LEWIS, allo = allogene, d = Tag.

3.10.3 Immunhistologische Färbung von Makrophagen

Für die immunhistologische Färbung der Makrophagen in den NTx-Nieren wurde der AK ED1 verwendet. Repräsentative Bilder der Gewebe jeder Gruppe sind nachfolgend aufgeführt (Abb. 52, Abb. 53).

Die weit fortgeschrittene Destruktion der Nieren hindert auch in dieser Färbung daran, eine adäquate Auswertung der Gewebe durchzuführen. In der mikroskopischen Beurteilung der Proben konnten in beiden Gruppen keine ED1-positiven Zellen detektiert werden. Daher ist kein signifikanter Unterschied in der Anzahl von gewebebestandigen Makrophagen zwischen den beiden Versuchsgruppen zu verzeichnen.

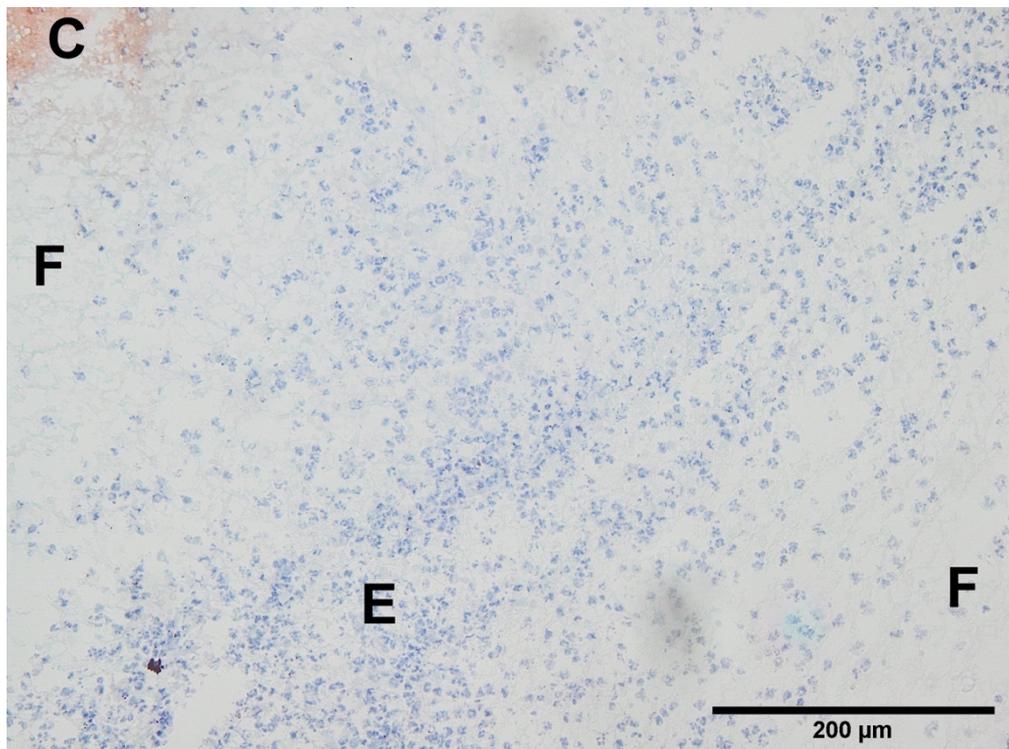


Abb. 49: Immunhistologische Makrophagen-Färbung eines Nierentransplantats aus der Gruppe ‚allo NTx d14 + NaCl‘ zwei Wochen post NTx.

Es sind nekrotische Gewebeanteile (F), ein Teil einer Einblutung (C) und infiltrierende Zellen (E) abgebildet. Unter Letzteren sind keine Makrophagen erkennbar. 200x-fache Vergrößerung. Versuchstier: LEW 315 ‚allo NTx d14 + NaCl‘. Abk.: NTx = Nierentransplantation, LEW = LEWIS, allo = allogene, d = Tag.

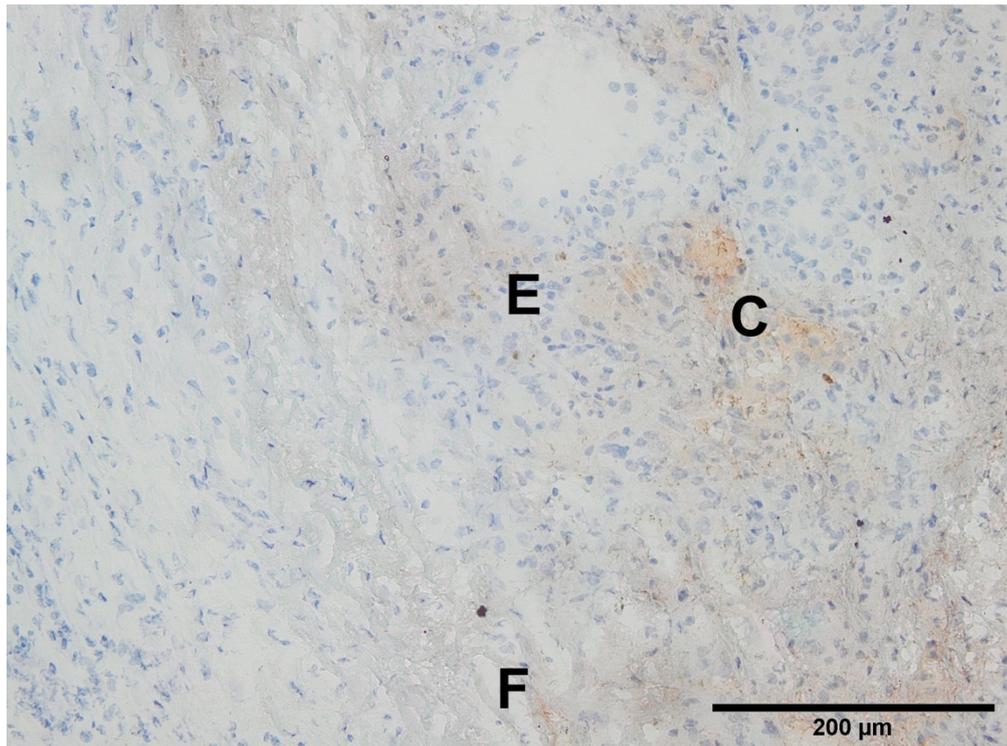


Abb. 50: Immunhistologische Makrophagen-Färbung eines Nierentransplantats aus der Gruppe ,allo NTx d14 + Anti-CD20' zwei Wochen post NTx.

Es sind der nekrotische Umbau des Gewebes (F), sowie leichte Einblutungen (C) und infiltrierende Zellen (E) abgebildet. Diese Zellen sind nicht als Makrophagen identifizierbar. 200x-fache Vergrößerung. Versuchstier: LEW 327 ,allo NTx d14 + Anti-CD20'. Abk.: NTx = Nierentransplantation, LEW = LEWIS, allo = allogene, d = Tag.

Aufgrund der weit fortgeschrittenen Destruktion der NTx-Nieren und der damit einhergehenden Schwierigkeiten bei der Auswertung der immunhistologischen Färbungen muss die Beurteilbarkeit kritisch hinterfragt werden. An dieser Stelle sollte erwähnt werden, dass der zeitliche Rahmen des Projektes keine weiteren Möglichkeiten für die Etablierung adäquater histologischer Färbungsmethoden für die Problematik zuließ.

4 Diskussion

In den letzten Jahrzehnten konnte durch Optimierungen der immunsuppressiven Therapien eine Reduktion der Inzidenz von akuten Abstoßungsereignissen nach einer NTx erzielt werden (Segoloni und Quaglia, 2006). Trotzdem bleibt diese Abstoßungsreaktion ein nicht zu unterschätzender Risikofaktor für ein nachfolgendes Transplantatversagen (Matas, 1994, Chapman et al., 2005). Dies führte zur Entwicklung und experimentellen Verwendung neuer Medikamente (Segoloni und Quaglia, 2006). Im Zuge der Erkenntnis, dass auch B-Zellen eine wichtige Rolle im Abstoßungsgeschehen spielen, eröffnete sich ein neues therapeutisches Feld (Weimer et al., 1989). So wurde auch der in der Behandlung von Lymphomen und Autoimmunerkrankungen mit starker B-Zell-Komponente erfolgreiche Anti-CD20 AK RTX in der Therapie der akuten Abstoßungsreaktion eingesetzt (Salama und Pusey, 2006). Die Off-Label-Verwendung dieses AK in der Behandlung der akuten Transplantatabstoßung von Nieren ist mittlerweile verbreitet, aber nicht bedenkenlos. Die Datenlage über den Nutzen und die Risiken, die die Verwendung dieses Medikamentes birgt, ist sehr heterogen. Mehrere Arbeitsgruppen zeigen, dass die Addition von RTX zu Standard-Immunsuppressions-Schemata erfolgreich einer akuten Abstoßungsreaktion von Nierentransplantaten entgegenwirkt (Alausa et al., 2005, Becker et al., 2004, Kaposztas et al., 2009, Lefaucheur et al., 2009, Makkeyah et al., 2017, Kranz et al., 2011). Demgegenüber stehen jedoch auch einige Studien, die zeigen, dass die Behandlung mit RTX keine Verminderung des Risikos bzw. der Inzidenz einer akuten Abstoßungsreaktion erzielen kann (van den Hoogen et al., 2015, Joosten et al., 2014, Oblak et al., 2017, Waiser et al., 2012, Sautenet et al., 2016). Zwei Studien beobachten sogar schwere negative Entwicklungen im Laufe einer Therapie mit RTX: Tydén et al. zeigen in einer Follow-Up-Studie über drei Jahre eine signifikant erhöhte Mortalität in der Gruppe von NTx-Patient*innen, die mit RTX behandelt wurde (Tyden et al., 2012). Die Arbeit von Clatworthy et al. legt weiterhin ein erhöhtes Risiko für eine akute Abstoßungsreaktion unter Addition von RTX zur Induktionstherapie nahe: Die Studie wurde vorzeitig beendet, da die Patient*innen, die RTX als Teil der Induktions-Immuntherapie erhielten, eine höhere Rate an akuten Abstoßungsreaktionen zeigten im Vergleich sowohl zu der Gruppe, der ein AK verabreicht wurde, der gegen T-Zellen gerichtet war als auch zu der Gruppe, die die Standard-Induktionstherapie alleine erhielt (Clatworthy et al., 2009). Bei der Interpretation der Ergebnisse verschiedener Arbeitsgruppen muss bedacht werden, dass die Schemata nach denen RTX eingesetzt wird, sich voneinander unterscheiden und somit die Vergleichbarkeit zwischen den Studien beschränkt ist. Daher ist es um so wichtiger, die genauen Mechanismen, mit denen ein Anti-CD20 AK wie RTX die allo-Immunreaktion moduliert, nachvollziehen zu können. Das Ziel der vorliegenden Arbeit war daher zum einen die Effekte der Depletion auf die verschiedenen B-Zell-Subpopulationen inklusive ihrer humoralen allo-Immunreaktion zu untersuchen. Zum anderen sollte der Einfluss der B-

Zell-Reduktion auf T-Zellen, NK-Zellen und ihre IFN γ -Aktivität in Kombination mit lokalen immunologischen Vorgängen, sowie den histologischen Veränderungen im Transplantat analysiert werden. Dazu wurde das MHC-kongene Ratten-NTx-Modell von Pöhnert et al. verwendet, in dem keine weitere Immunsuppression eingesetzt wird (Poehnert et al., 2010). Lemke et al. konnten in dem gleichen Modell zeigen, dass die Tiere eine akute humorale Abstoßungsreaktion mit zusätzlicher zellulärer Komponente entwickeln. DSA konnten bereits sieben Tage nach der NTx nachgewiesen werden, genauso wie zelluläre Infiltrate im Transplantat selber. (Lemke et al., 2015) In Vorversuchen wurde der Einfluss einer B-Zell-Depletion zu diesem Zeitpunkt (sieben Tage post NTx) auf die akute Transplantatabstoßung untersucht. Vier Wochen nach der NTx zeigte sich histologisch in beiden Versuchsgruppen das Bild einer fortgeschrittenen Abstoßungsreaktion mit bereits starken Gewebeschäden. Ein Unterschied zwischen den Gruppen konnte nicht mehr ausgemacht werden. (Spieker, 2015) Daher wurde in der vorliegenden Arbeit der frühere Endzeitpunkt gewählt, mit dem Ziel, das Abstoßungsgeschehen in einem jüngeren Stadium und zum Zeitpunkt des maximalen Depletionseffekt zu untersuchen.

Um möglichst kliniknahe Versuchsbedingungen zu ermöglichen, wurde zur Untersuchung der IFN γ -Aktivität ein EliSpot-Assay in diesem Modell etabliert. Es konnte gezeigt werden, dass diese Methode verlässliche Daten liefert und somit gut geeignet ist, um auch weitere Fragestellungen damit zu bearbeiten.

Wir konnten keinen Vorteil durch die Behandlung mit dem Anti-CD20 AK in Bezug auf den Verlauf der akuten Abstoßungsreaktion beobachten. Im Folgenden werden die eingangs gestellten Fragen einzeln diskutiert, danach abschließend ein Fazit gezogen und ein Ausblick gegeben.

Wie verändert sich die Zusammensetzung der B-Zell-Subpopulationen durch die Anti-CD20 Therapie?

Um beurteilen zu können, wie sich die B-Zell-Depletion auf unterschiedliche Aspekte der Abstoßungsreaktion auswirkt, muss zuerst der Depletionserfolg des Anti-CD20 AK evaluiert werden.

Es kommt eine Woche nach der NTx in beiden Gruppen gleichermaßen zu einem Anstieg der Lymphozytenzahlen im peripheren Blut. Dieser Anstieg ist durch eine akute Immunreaktion auf das allo Gewebe zu erklären, an der T-, NK- und B-Zellen beteiligt sind (Kahan und Ponticelli, 2000, Wood und Goto, 2012, Pratschke et al., 2009). Zum Zeitpunkt der Injektion des Anti-CD20 AK bzw. von NaCl besteht bezüglich der Zellzahlen kein signifikanter Unterschied zwischen den Versuchsgruppen. Alle Veränderungen nach der Verabreichung des AK können also auf diese Behandlung zurückgeführt werden. Sie führt zur

nahezu vollständigen Depletion von CD45RA⁺IgG⁺ B-Zellen im peripheren Blut der Versuchsgruppe (vergleiche Abb. 13) und verlief damit erfolgreich.

Spieker vermutet eine Abhängigkeit des Depletionserfolges von der Menge an exprimierten IgM auf der B-Zelloberfläche (Spieker, 2015). Die Zusammenschau der hier ermittelten Ergebnisse widerspricht dieser These: Die am stärksten depletierten B-Zellen sind in der vorliegenden Arbeit naive reife B-Zellen, die intermediäre Level an IgM auf ihrer Oberfläche exprimieren. T1 B-Zellen, die ebenfalls intermediäre Mengen an Oberflächen-IgM aufweisen, nehmen in ihrer Anzahl zu. Vermutlich ist dies allerdings auf bereits neu gebildete B-Zellen zurückzuführen und der Effekt der Depletion kann eine Woche nach der Verabreichung des AK in diesem Modell auf diese Subpopulation nicht mehr nachvollzogen werden. T2 B-Zellen, die am meisten IgM exprimieren (IgM^{high}) werden verglichen mit naiven reifen B-Zellen (IgM^{medium}) weniger depletiert. Vor diesem Hintergrund muss der Zusammenhang zwischen IgM-Expression und Depletionserfolg kritisch gesehen werden und sollte durch explizite Studien untersucht werden.

In dem hier angewandten Modell liegt der maximale Effekt der Depletion vermutlich in der ersten Woche (bis sechs Tage nach der AK-Verabreichung), da sieben Tage nach der Verabreichung bereits erste neu gebildete unreife B-Zellen zu detektieren sind. In vorigen Versuchen mit dem gleichen Modell wurde der Zeitpunkt der maximalen Depletion auf sieben Tage nach der Verabreichung des AK festgelegt (Spieker, 2015). Ein möglicher Unterschied von wenigen Tagen wird vermutlich durch das interindividuell verschiedene Ansprechen auf den AK verursacht (Reff et al., 1994, Leandro, 2013, Alwayn et al., 2001).

Die Literaturrecherche macht deutlich, dass das Ausmaß der Depletion und die Dauer bis zur Rekonstitution von mehreren Faktoren abhängig sind und moduliert werden: Die eingesetzte Dosis des AK, Therapiewiederholungen und -kombinationen, die Spezies, der Stamm und Umgebungsfaktoren spielen dabei eine wichtige Rolle (Gong et al., 2005, Genberg et al., 2006, Kamburova et al., 2013). Letztere modulieren die Sensibilität der Zelle gegenüber dem Anti-CD20 AK und insbesondere BAFF trägt maßgeblich zum Überleben von B-Zellen während und nach der Depletion und zur Dauer bis zur Rekonstitution bei (Gong et al., 2005, Ramwadhoebe et al., 2019, Varin et al., 2010, Thauinat et al., 2008). So konnte in humanen Modellen nachgewiesen werden, dass die Rekonstitution der peripheren B-Zell-Population im Mittel acht Monate nach der Anti-CD20 Therapie erfolgt und eine Verlängerung der Depletionsphase durch eine zusätzliche Kombination mit weiteren Immunsuppressiva erreicht werden kann (Leandro et al., 2006, Genberg et al., 2006). Reff et al. zeigt hingegen, dass die Regeneration der B-Zell-Population im peripheren Blut von Affen bereits zwei Wochen nach der AK-Verabreichung stattfindet (Reff et al., 1994). Somit muss für jedes Modell einzeln ermittelt werden, wie groß der maximale Depletionseffekt ist

und wann dieser auftritt. Der direkte Vergleich von Ergebnissen aus verschiedenen Modellen muss daher immer differenziert betrachtet werden.

In dem hier verwendeten Versuchsmodell wurde mit einer anderen Spezies als bei Leandro et al., Genberg et al. und Reff et al. gearbeitet und im Vergleich mit dem Großteil der Literatur geringere Dosen des AK eingesetzt, ohne eine Kombination mit weiteren Immunsuppressiva. Daher ist es gut möglich, dass die Rekonstitution der B-Zell-Population hier bereits früher beginnt: Eine erhöhte T1 B-Zellzahl kann als erstes Merkmal der reaktiv gesteigerten B-Zellsynthese bereits eine Woche nach der Depletion beobachtet werden. Übereinstimmend damit konnte auch im humanen Modell nachgewiesen werden, dass die Rekonstitutionsphase durch eine gesteigerte Anzahl an T B-Zellen im peripheren Blut gekennzeichnet ist (Kamburova et al., 2014, Joosten et al., 2014).

Es lässt sich also sagen, dass die B-Zell-Depletion in dem hier verwendeten Modell erfolgreich verlief, ihren maximalen Effekt in der ersten Woche zeigt und gleich darauf die Rekonstitution der depletierten B-Zell-Population beginnt.

Zur Beantwortung der Frage, ob sich die Zusammensetzung der B-Zell-Subpopulationen im peripheren Blut durch die Anti-CD20 Depletion verändert, wurden vier davon genauer untersucht. In der ersten Woche nach der OP unterscheiden sich die Gruppen hinsichtlich der Anzahl der gesamten B-Zellen und ihrer Subpopulationen nicht: In beiden Gruppen nimmt der relative Anteil naiver reifer B-Zellen an der gesamten B-Zellpopulation zu, was durch die beginnende Immunantwort auf die allo-Ag des Transplantates erklärt werden kann (Murphy et al., 2009, Loder et al., 1999).

In der zweiten Woche post NTx, also eine Woche nach der Depletion, ist diese in der Versuchsgruppe deutlich zu erkennen: Die CD45RA⁺IgG⁺ B-Zellen sind nahezu vollständig ausgelöscht. Diese starke Abnahme ist vornehmlich auf die Reduktion der naiven reifen B-Zellen (IgD^{medium}IgM^{medium}) zurückzuführen, die im Vergleich mit den anderen B-Zell-Subpopulationen am gravierendsten von der Depletion betroffen sind. Diese Beobachtung ist mit den Ergebnissen weiterer in vitro Versuche übereinstimmend und wurde auch in humanen Modellen nachgewiesen (Leandro et al., 2006, Spieker, 2015, Kamburova et al., 2012).

Zwei Wochen nach der NTx zeigt die Versuchsgruppe hingegen einen signifikant größeren Anteil an T1 B-Zellen (IgD^{low}IgM^{medium}) als die Kontrollgruppe. Dies ist durch eine gesteigerte B-Zell-Synthese zu erklären. Die B-Zell-Depletion stellt einen Ontogenesereiz dar, der die Bildung neuer B-Zellen im Knochenmark zur Rekonstitution der ausgelöschten Population induziert. In der B-Zell-Entwicklung sind T B-Zellen die ersten Zellen, die das Knochenmark verlassen, dann in der Milz weiter reifen und im peripheren Blut zirkulieren. (Agrawal et al., 2013, Palanichamy et al., 2009) Es muss bedacht werden, dass auch T1 B-Zellen CD20 auf ihrer Oberfläche exprimieren und somit auch von der Depletion betroffen sind (Leandro, 2013). Vermutlich ist der Depletionseffekt auf diese Zellpopulation allerdings eine Woche

nach der Verabreichung des AK schon nicht mehr zu detektieren, da die Population bereits durch neu gebildete T1 B-Zellen ersetzt wurde.

Der Anteil an T2 B-Zellen (IgD^{high}IgM^{high}) ist eine Woche nach der Anti-CD20 Behandlung hingegen stark verringert, die Gruppen unterscheiden sich allerdings nicht signifikant voneinander. Brennecke et al. zeigt, dass es nach Induktion der B-Zell-Synthese circa sechs Tage dauert, bis im Knochenmark von Mäusen die ersten T1 B-Zellen nachgewiesen werden können (Brennecke et al., 2018). Diese entwickeln sich dann innerhalb von 48 Stunden zu T2 B-Zellen, wobei die verschiedenen Entwicklungsschritte eher ein Kontinuum darstellen. Bei entsprechender Aktivierung erfolgt die weitere Differenzierung zu reifen B-Zellen in der Milz innerhalb von ein bis zwei Tagen. (Loder et al., 1999, Palanichamy et al., 2009) Somit ist es gut möglich, dass die hier vorliegenden Ergebnisse, die am siebten Tag nach der Verabreichung des Anti-CD20 AK generiert wurden, genau den Moment in der B-Zell-Rekonstitution abbilden, zu dem T1 B-Zellen bereits gebildet wurden, die weitere Entwicklung zu T2 B-Zellen allerdings noch nicht erfolgt ist. In der Interpretation der Ergebnisse zu dieser Subpopulation muss beachtet werden, dass zu allen Zeitpunkten eine große Standardabweichung in den T2 B-Zellzahlen zu verzeichnen ist, was durch die sehr kleine Populationsgröße bedingt sein kann.

Als vierte Subpopulation wurden die Switched B-Zellen genauer untersucht: Eine Woche nach der Depletion zeigt die Versuchsgruppe eine signifikant größere Population an Switched B-Zellen verglichen mit der Kontrollgruppe. Vergleichbares konnte auch in humanen Modellen gezeigt werden (Rouziere et al., 2005). Mehrere Überlegungen müssen im Zuge dieser Beobachtung angestellt werden:

1. In beiden Versuchsgruppen bewirkt das allo Gewebe in der ersten Woche nach der NTx die Entwicklung naiver reifer B-Zellen zu AK-sezernierenden Plasmazellen. Parallel wird mit Hilfe von T-Zellen der Ig-Klassenwechsel initiiert, wodurch Switched B-Zellen entstehen, die AK mit einer höheren Ag-Affinität sezernieren. Pape et al. haben gezeigt, dass innerhalb von zwei Tagen nach einer Immunisierung bereits die ersten Switched B-Zellen in der Milz gebildet werden (Pape et al., 2003). Weiterhin können B-Zellen auch in tertiären lymphatischen Organen – und somit im Transplantat selber – reifen und eine humorale Immunantwort so zusätzlich lokal initiieren (Thaunat et al., 2008, Thaunat et al., 2005). Schon in der ersten Woche nach der NTx wird die humorale Immunantwort also stimuliert, was in einer gesteigerten AK-Bildung – in der Milz aber auch lokal – resultiert und damit vermutlich eine AK vermittelte Abstoßungsreaktion einleitet, noch bevor die Depletion der B-Zellen erfolgt.
2. Eine Erklärung für den signifikanten Unterschied zwischen den Gruppen in der zweiten Woche post OP ist das Vorhandensein eines regulierenden Faktors: Dieser potentielle Faktor muss Teil der naiven reifen B-Zell-Population sein. Durch den Anti-CD20 AK kommt es zur Depletion dieser Population und damit auch zum Fehlen des regulierenden Faktors,

was zu einer gesteigerten Bildung und / oder Freisetzung von Switched B-Zellen ins Blut führt. Auch Bath. et al. vermuten, dass es durch die Depletion von B-Zellen zu einem Verlust von regulatorischen Mechanismen kommt (Bath et al., 2019). Dies würde in der Versuchsgruppe eine signifikant größere Subpopulation an Switched B-Zellen bedingen. Dadurch würde die Entwicklung einer AK vermittelten Abstoßungsreaktion begünstigt. Die Überlegung einer gesteigerten Mobilisation dieser Zellen ins Blut führen auch Spieker und Rouzière et al. in ihren Arbeiten an (Rouzière et al., 2005, Spieker, 2015). Spieker stellt die Hypothese auf, dass Switched B-Zellen möglicherweise eine Interims-Funktion für die depletierte Population der naiven reifen B-Zellen übernehmen und daher vermehrt ins Blut mobilisiert werden (Spieker, 2015). Rouzière et al. vermuten, dass Switched B-Zellen so lange nach der Depletion im PB zirkulieren, bis die vollständige Repopulation der peripheren B-Zell-Population durch neu produzierte B-Zellen erfolgt (Rouzière et al., 2005).

3. Eine weitere Erklärung für die signifikant größere Population an Switched B-Zellen in der Versuchsgruppe ist die gesteigerte Bildung dieser Zellen aus T1 B-Zellen und Plasmazellen. Letztere sind CD20⁻, sodass sie nicht von der Depletion betroffen sind und sich zu Switched B-Zellen entwickeln können (Slifka et al., 1998). Passend dazu konnte Adlowitz et al. nachweisen, dass die residuale B-Zell-Population nach einer Depletion gesteigerte Mengen des Proliferationsmarkers Ki-67 exprimiert (Adlowitz et al., 2015). Außerdem konnte gezeigt werden, dass auch unreife B-Zellen bereits einen Isotypen-Klassenwechsel vollziehen können und sich dann zu AK-produzierenden B-Zellen weiter entwickeln (Han et al., 2007, Ueda et al., 2007). In diesem Fall würde die, durch die Depletion initiierte B-Zell-Rekonstitution, die mit einer gesteigerten Bildung an unreifen B-Zell-Stadien einhergeht, einen negativen, kontraproduktiven Effekt der Anti-CD20-Behandlung auf das Überleben des Transplantates darstellen.

Es kann also gesagt werden, dass die Anti-CD20-Therapie in unserem Modell eine Veränderung in der Zusammensetzung der B-Zell-Subpopulationen bedingt, die weitreichende Folgen haben kann: Vermutlich kommt es durch die Depletion zum Verlust regulierender Mechanismen, der zu einer gesteigerten Menge an Switched-B-Zellen führt. Durch ihre Funktion, AK mit einer hohen Affinität zu produzieren, begünstigt dies die Entwicklung einer gezielten humoralen Reaktion gegen das Transplantat.

Zur Beurteilung der Auswirkung des Anti-CD20 AK auf die B-Zell-Subpopulationen in den sekundär lymphatischen Organen wurden die B-Zellen in der Milz und den Lymphknoten untersucht. Auch dort ist die Depletion zwei Wochen post OP deutlich erkennbar: Die gesamte B-Zellpopulation in der Milz der Versuchsgruppe beträgt nur noch weniger als die Hälfte der Population der Kontrollgruppe. Der Unterschied ist allerdings nicht signifikant. Dabei muss die große Standardabweichung in der Versuchsgruppe beachtet werden. In den Lymphknoten ist die Reduktion der gesamten B-Zellpopulation durch die Depletion

deutlicher zu beobachten und der Unterschied zwischen den Gruppen ist signifikant. Es ist bekannt, dass der Depletionserfolg in sekundär lymphatischen Organen geringer ausfällt als im PB, dass zur B-Zell-Depletion in diesen Organen höhere Serumlevel des AK benötigt werden und dass der maximale Depletionseffekt später als im PB auftritt. Weiterhin wird in verschiedenen Studien beobachtet, dass der Erfolg der Depletion eine hohe Interindividuum-Variabilität aufzeigt, was die große Standardabweichung der Ergebnisse in der Milz erklärt. (Reff et al., 1994, Alwayn et al., 2001, Schroder et al., 2003, Kamburova et al., 2013, Leandro, 2013) Vermutlich wird diese interindividuell unterschiedliche Sensibilität gegenüber dem Anti-CD20 AK durch den Einfluss von Umgebungsfaktoren bedingt (Gong et al., 2005).

Wie im PB ist die Abnahme auch in Milz und Lymphknoten vor allem auf die Depletion der naiven reifen B-Zellen zurückzuführen, was durch mehrere Studien so bestätigt wird (Leandro, 2013, Ramos et al., 2007, Kamburova et al., 2013). Die Zunahme der T1 B-Zellen ist in diesen Organen gleichermaßen wie im PB zu erkennen und für die Milz mit einer gesteigerten B-Zell-Synthese und der Einwanderung der T B-Zellen zur weiteren Reifung zu erklären. T2 B-Zellen werden durch die Depletion in ihrer Anzahl in der Milz ebenfalls vermindert und sind wie oben beschrieben vermutlich noch nicht nachgebildet worden. Dies ist auch in den Lymphknoten zu beobachten, wenn auch mit einem nicht signifikanten Unterschied. Obwohl T B-Zellen aufgrund ihrer Zellausstattung fähig sind in Lymphknoten zu migrieren, findet dies physiologisch im Menschen nicht statt: Es wird durch autokrine Regulationsmechanismen der unreifen B-Zellen verhindert und ihre Migration in die Milz gefördert (Flaishon et al., 2000, Loder et al., 1999). Kamburova et al. haben dementsprechend gezeigt, dass auch nach der einmaligen Verabreichung von RTX eine komplette Abwesenheit von T B-Zellen in humanen Lymphknoten herrscht (Kamburova et al., 2013). Spieker hingegen beschreibt nach der B-Zell-Depletion in der Ratte ebenfalls das Vorhandensein von T B-Zellen in den Lymphknoten der Tiere (Spieker, 2015). Möglicherweise liegt diese Differenz in einem unterschiedlichen Migrationsverhalten der T B-Zellen der beiden Spezies begründet. Eine Erklärung dafür kann ein unterschiedliches Mikromilieu sein, welches die Regulationsmechanismen der Zellmigration verändert, sodass die Migration in die Lymphknoten in der Ratte nicht unterdrückt wird. Außerdem muss bedacht werden, dass Kamburova et al. eine Kombinationsimmunsuppression mit einer höheren RTX-Dosis verwendeten, die Untersuchung der Lymphozyten drei Wochen später und ohne vorherigen allo-Ag-Kontakt erfolgte (Kamburova et al., 2013). Dies kann zu einem veränderten Migrationsverhalten der nachgebildeten B-Zellen führen.

Bei der Interpretation der Ergebnisse unserer Versuche muss beachtet werden, dass die Populationsgrößen der T B-Zellen in den Lymphknoten sehr klein sind und eine große Standardabweichung in den Ergebnissen der T B-Zellen vorliegt.

Übereinstimmend mit den Ergebnissen anderer Arbeitsgruppen wurde beobachtet, dass in beiden Organen der Versuchsgruppe post Depletion signifikant größere Anteile an Switched B-Zellen vorhanden sind als in der Kontrollgruppe (Kamburova et al., 2013, Ramwadhoebe et al., 2019). Nach ihrer Freisetzung in das PB würden sie zum weiteren Anstieg der Switched-B-Zell-Populationsgröße beitragen. Im humanen Modell konnten Kamburova et al. schon nachweisen, dass die, nach einer RTX-Therapie in den Lymphknoten noch vorhandenen B-Zellen, einen Trend zur gesteigerten Produktion von AID-mRNA (activation-induced cytidine deaminase = AID) zeigen. AID initiiert in B-Zellen den Isotypen-Klassenwechsel (Xu et al., 2012). Dies weist also ebenfalls auf die gesteigerte Bildung der Switched-B-Zellen aus residualen Plasmazellen und bereits neu gebildeten T1 B-Zellen hin. Zum Nachweis, ob die B-Zell-Depletion auch in der Ratte, in Plasmazellen und neu gebildeten T1 B-Zellen den Ig-Klassenwechsel anregt, muss in zukünftigen Studien untersucht werden, ob AID auch im Rattenmodell von diesen Zellen in gesteigertem Maße gebildet wird. Die vorliegenden Ergebnisse legen allerdings nahe, dass diese Entwicklung im Menschen und der Ratte ähnlich sind.

Unsere Ergebnisse zeigen also, dass die Anti-CD20 Behandlung in sekundär lymphatischen Organen auch im Rattenmodell einen geringeren Effekt hat. Möglicherweise trägt die hier größere residuale B-Zell-Population zu einer gesteigerten Bildung von Switched-B-Zellen bei, die dann ins PB freigesetzt werden. Der Effekt der B-Zell-Depletion im PB wird dadurch abgeschwächt. Dieser Entwicklung könnte man mit höheren Dosen des AK oder einer wiederholten Gabe begegnen, da so vermutlich auch eine vollständigere und längere Depletion in den sekundär lymphatischen Organen der Ratte erzielt werden könnte.

Welche Auswirkung hat die Depletion auf die AK-Produktion der B-Zellen?

Um die Auswirkung der B-Zell-Depletion auf die AK-Produktion zu untersuchen, wurde die Menge an produzierten DSA untersucht.

Nachdem prä NTx in beiden Gruppen keine dieser AK detektiert werden können, sind in der zweiten Woche nach der OP neu gebildete DSA zu beobachten, was eine erfolgte B-Zell-Immunantwort der Empfänger auf die Spender-Ag anzeigt (Murphy et al., 2009). Dies stimmt mit den Ergebnissen von Lemke et al. überein, die bereits am siebten Tag nach der NTx neu gebildete zirkulierende allo-AK beobachten (Lemke et al., 2015). Unsere Ergebnisse zeigen zusätzlich, dass eine Woche nach der B-Zell-Depletion in der Versuchsgruppe signifikant weniger DSA gebildet werden als in der Kontrollgruppe. Auch in Versuchen zu Autoimmunerkrankungen konnte nachgewiesen werden, dass eine Anti-CD20 Therapie zur Abnahme der Auto-AK-Level führt, diese aber nicht komplett eliminiert (Cambridge et al., 2003, Cambridge et al., 2008). Allerdings ist bekannt, dass AK-produzierende Plasmazellen jenseits des Blastenstadiums aufgrund ihrer CD20-Negativität nicht von der B-Zell-

Depletion betroffen sind (Leandro, 2013, Huang et al., 2010). Dies widerspricht unseren und den Ergebnissen der Studien zu Autoimmunerkrankungen zunächst. Zwei Arbeitsgruppen führen die Abnahme der AK-Produktion auf den Verlust kurzlebiger Plasmazellen zurück. Die nach der Depletion weiterhin produzierten AK sollen durch langlebige Plasmazellen gebildet werden. (Cambridge et al., 2003, Cambridge et al., 2008) Vor diesem Hintergrund kann die Vermutung angestellt werden, dass die Menge an DSA in der Versuchsgruppe geringer ist, da hier durch die Depletion von B-Vorläuferzellen der Nachschub neuer Plasmazellen zur AK-Produktion verzögert ist: Kurzlebige Plasmazellen sind noch nicht ersetzt und können nicht zur Bildung von AK beitragen. Dieser Effekt wird wahrscheinlich noch dadurch verstärkt, dass auch Plasmablasten von der Depletion betroffen sind (Huang et al., 2010). Nicht depletierte langlebige Plasmazellen bilden weiterhin DSA, sodass diese weiterhin in der Versuchsgruppe zu detektieren sind, die Menge aber geringer ausfällt als in der Kontrollgruppe.

Außerdem ist die Entwicklung von AK-sezernierenden B-Zellen aus, zum Untersuchungszeitpunkt noch nicht depletierten B-GZ wahrscheinlich (Han et al., 2009, Ramos et al., 2007, Rehnberg et al., 2009). Dieser Mechanismus würde zusätzlich dazu beitragen, dass weiterhin geringe Mengen DSA produziert werden.

Weiterhin ist auffallend, dass zu dem Zeitpunkt, wo in der Versuchsgruppe signifikant geringere Mengen an DSA detektiert werden, gleichzeitig signifikant mehr Switched B-Zellen vorhanden sind. Ähnliches konnte auch Rouzière et al. in Patient*innen mit Rheumatoider Arthritis beobachten: Kurz nach der B-Zell-Depletion durch RTX kommt es zu einer spezifischen Abnahme des AK Rheumafaktor während gleichzeitig eine Expansion von Switched B-Zellen beobachtet wird. Diese Expansion ist in den Patient*innen allerdings nur als ein vorübergehendes Phänomen zu verzeichnen. (Rouzière et al., 2005) Unsere und die Ergebnisse von Rouzière et al. implizieren, dass die vermehrten Switched B-Zellen nicht an der Produktion der DSA beteiligt sind. Möglicherweise üben sie nicht ihre physiologischen Funktionen aus, da sie lediglich für den Übergang bis zur Rekonstitution der naiven reifen B-Zellen in das PB verlagert werden. Dies unterstützt Spiekers Hypothese, dass die vermehrten Switched-B-Zellen eine Interims-Funktion einnehmen (Spieker, 2015).

Vier Wochen nach der NTx, sind zunehmende Level DSA in beiden Gruppen nachzuweisen. Der Unterschied zwischen den Gruppen ist weiterhin zu beobachten, jedoch ohne Signifikanz: Es scheint, als würde sich die Menge der neu gebildeten DSA zwischen den Gruppen langsam angleichen und der Effekt der B-Zell-Depletion in der Versuchsgruppe verblassen. Auffallend ist dabei die große Standardabweichung in der Versuchsgruppe. Diese kann als Konsequenz der interindividuell variablen Sensibilität auf den Anti-CD20 AK gewertet werden, die mit einer unterschiedlich schnell einsetzenden Rekonstitution der B-Zell-Population einhergeht (Reff et al., 1994, Leandro, 2013). Cambridge et al. haben

nachgewiesen, dass der Wiederanstieg von Auto-AK-Leveln in Autoimmunerkrankungen eng mit der Rekonstitution der B-Zellen korreliert (Cambridge et al., 2003). Dies stützt die obige Vermutung, dass der Abfall der DSA-Level auf den fehlenden Nachschub kurzlebiger Plasmazellen zurückgeführt werden kann.

Die Menge an DSA, die nach einer B-Zell-Depletion vorhanden ist, spielt eine prognostische Rolle: stabile Patient*innen zeigen geringere Mengen an DSA und Patient*innen, die einen Transplantatverlust durch eine akute humorale Abstoßung erfahren, zeigen signifikant höhere DSA-Level (Surendra et al., 2016, Lefaucheur et al., 2009). Wu et al. konnten zeigen, dass die Wahrscheinlichkeit, eine akute AK-vermittelte Abstoßung zu entwickeln um mehr als 25% steigt, wenn die Menge vorhandener DSA einen Cut-Off Wert von 500 MFI überschreitet (Wu et al., 2013). Da dies für alle unsere getesteten Tiere zutrifft, ist es wahrscheinlich, dass eine humorale Abstoßungsreaktion vorliegt.

Die Zeit bis zum Beginn der B-Zell-Repopulation ist also von großer Bedeutung: Es kommt zum Ersatz kurzlebiger Plasmazellen und damit zur Zunahme der Produktion von DSA.

Eine Anti-CD20 Therapie kann also in der Ratte die Produktion von DSA zum Teil supprimieren. Dabei sind Dosis und Therapiewiederholungen von großer Bedeutung, da diese die Dauer der Depletion bestimmen. Je länger die Depletion anhält, desto später können hohe Level an DSA generiert werden und zur humoralen Abstoßung des Transplantates führen. Dabei darf nicht vergessen werden, dass die Zeit bis zur Rekonstitution von Individuum zu Individuum variiert und somit ein individuelles Monitoring unerlässlich ist, um früh- und rechtzeitig neue Maßnahmen zur Prävention einer akuten humoralen Abstoßungsreaktion einleiten zu können.

Im Menschen konnte die Effizienz von RTX, die Produktion von DSA zu supprimieren, klar nachgewiesen werden (Ishida et al., 2014).

Sind T-, NK- und NKT-Zellen von Transplantat-Empfänger*innen nach der B-Zell-Depletion reaktiver?

Zuerst haben wir geschaut, ob die Zellzahlen im peripheren Blut und in den sekundär lymphatischen Organen durch die B-Zell-Depletion verändert werden. Die genaue Untersuchung der gesamten T-Zellen ($CD3^+$) zeigt deutlich, dass die Zellzahl in beiden Versuchsgruppen eine Woche nach der NTx ansteigt. Die Zunahme der T_H -Zellen ($CD3^+CD4^+$) und der zytotoxischen T-Zellen ($CD3^+CD8^+$) ist dabei maßgeblich für den Anstieg der T-Zellen verantwortlich. Die Literatur bestätigt, dass es durch die Induktion der Immunreaktion durch das allo Gewebe in der ersten Woche post Tx vor allem zur Aktivierung dieser beider Subtypen kommt (Kreisel et al., 2002, Wood und Goto, 2012, Cornell et al., 2008). Eine Woche nach der Verabreichung des Anti-CD20 AK entsprechen die T-Zellzahlen wieder dem Ausgangsniveau. Lediglich die Anzahl der NKT-Zellen sinkt nur auf circa das Doppelte der

Ausgangswerte ab. NKT-Zellen sind durch ihre immunregulatorische Aktivität essentiell für das Langzeitüberleben eines Transplantates. Dafür ist unter anderem membrangebundenes TGF β maßgeblich, welches seine regulatorische Wirkung in Zell-Zell-Kontakten vermittelt. Somit ist für den regulatorischen Effekt dieser Subpopulation von Bedeutung, dass sich die Zellen unter anderem im Transplantat befinden. (Yang et al., 2007) Eine Erklärung für die noch erhöhte Zellzahl der NKT-Zellen wäre also, dass diese Zellen langsamer in das Organ migrieren und somit über längere Zeit erhöhte Zellzahlen im PB aufweisen. Alternativ besteht die Möglichkeit, dass diese Zellen über längere Zeit verstärkt synthetisiert werden, um die Immunantwort zu regulieren und somit erhöhte Zellzahlen im PB aufweisen. Dies erfolgt zum Beispiel über die Inhibierung der Aktivierung von zytotoxischen T-Zellen, vermittelt durch eine verminderte Kapazität der APC, die durch NKT-Zellen induziert wird (Matarollo et al., 2011). Dieser Aspekt würde die Beobachtung erklären, dass zytotoxische T-Zellen in ihrer Anzahl abnehmen, während NKT-Zellen weiterhin auf erhöhtem Niveau nachzuweisen sind. Bei diesen Überlegungen muss beachtet werden, dass NKT-Zellen große interindividuelle Variabilität bezüglich ihrer Populationsgröße aufzeigen (Pratschke et al., 2009).

Bezüglich der T- und NKT-Zellzahlen konnten keine Unterschiede zwischen den beiden Versuchsgruppen beobachtet werden. Folglich scheint die Depletion der B-Zellen keinen direkten Einfluss auf die absoluten Zellzahlen der T-Zellen in der Immunantwort auf das allo Transplantat zu haben. Im Gegensatz dazu, konnte in mehreren Studien nachgewiesen werden, dass B-Zellen, die in vitro unter dem Einfluss eines Anti-CD20 AK stehen, eine gesteigerte Potenz haben T-Zellen zur Proliferation zu aktivieren (Kamburova et al., 2012, Joosten et al., 2014, Kamburova et al., 2013). Eine Erklärung für diesen Widerspruch zu unseren Ergebnissen ist die nach einer Anti-CD20 Behandlung stark verringerte Anzahl an residualen B-Zellen: Diese mögen nach den erwähnten Studien die T-Zellen zwar stärker zur Proliferation anregen, da sie aber in ihrer Anzahl stark verringert sind, führt dies netto trotzdem zu keinem Anstieg der totalen T-Zellzahlen. Weiterhin beobachten die Arbeitsgruppen eine Verschiebung der proliferierenden T-Zell-Populationen hin zu einem vorwiegend T_H2 -Zellen ähnlichen Phänotyp (Joosten et al., 2014, Kamburova et al., 2012, Kamburova et al., 2013). Über IL4 und IL5 induzieren T_H2 -Zellen dann wiederum eine gesteigerte Aktivierung von B-Zellen und ihren Ig-Klassenwechsel (Zhu und Paul, 2010, Mosmann und Coffman, 1989). Letztlich führt dies zu einer vermehrten Entwicklung der nach der Depletion noch verbliebenen B-Zellen zu Switched B-Zellen, was sich in unseren Ergebnissen widerspiegelt. Somit können wir die Hypothese von Kamburova et al. bestätigen, dass der Effekt des Anti-CD20 AK nicht nur vom Ausmaß der Depletion, sondern auch von den funktionellen Eigenschaften der residualen B-Zellen abhängig ist. (Kamburova et al., 2013)

Auch die Beteiligung der NK-Zellen an der Immunantwort spiegelt sich in der Erhöhung der absoluten Zellzahl eine Woche nach der NTx wider. Bis zur zweiten Woche post OP sinkt die Menge an peripheren NK-Zellen wieder deutlich ab, erreicht den Ausgangswert aber nicht. Diese Dynamik ist auf Basis der Literatur erklärbar: Als Teil der angeborenen Immunantwort werden NK-Zellen früh im Abstoßungsgeschehen aktiviert, die Zellzahl steigt an. Dann infiltrieren sie schnell das betroffene Gewebe, wodurch ihre Anzahl im peripheren Blut wieder sinkt. (Pratschke et al., 2009, Hsieh et al., 2002) Da zwischen den beiden Versuchsgruppen keine Unterschiede bezüglich der Zellzahl oder Dynamik zu beobachten sind, lässt sich vermuten, dass die B-Zell-Depletion keinen Einfluss auf die NK-Zellen in der Abstoßungsreaktion hat. Bhat und Watzl zeigen allerdings, dass eine Behandlung mit RTX die zytotoxischen Effektorfunktionen von NK-Zellen in vitro steigert (Bhat und Watzl, 2007). Dies hätte eine negative Auswirkung auf das Überleben eines Transplantates. Im weiteren Verlauf des Textes wird explizit auf das Effektormolekül IFN γ eingegangen, welches unter anderem von NK-Zellen produziert wird. In diesem Zuge wird die Autorin auf die mögliche Interaktion zwischen Anti-CD20 Behandlung und NK-Zell-Funktion genauer eingehen. In den sekundär lymphatischen Organen zeigt die gesamte T-Zellpopulation der Versuchsgruppe signifikant höhere Zellzahlen als in der Kontrollgruppe. Das gleiche gilt für die NK-Zellpopulation in der Milz – in den Lymphknoten ist der Unterschied ebenfalls zu beobachten, allerdings nicht signifikant. Diese Unterschiede sind auf die relativen Angaben in Kombination mit der durchgeführten B-Zell-Depletion zurück zu führen.

Nachdem wir beobachten konnten, dass die B-Zell-Depletion keinen Einfluss auf die Anzahl von T-, NKT- und NK-Zellen hat, interessierte uns weiterhin, ob auch die Funktion dieser Zellen von der Depletion unbeeinflusst bleibt oder ob die Behandlung mit dem Anti-CD20 AK die Reaktivität der T-, NKT- und NK-Zellen gegenüber dem allo Gewebe verändert.

Um in der Klinik die Alloreaktivität von T-Zellen und somit das Risiko für die Entwicklung einer subklinischen zellulären Abstoßung einschätzen zu können, wird die Überwachung der IFN γ -Aktivität der T-Zellen mit Hilfe eines EliSpot-Assays empfohlen (Crespo et al., 2017, Crespo et al., 2015). Es ist ebenfalls eine effektive Methode, die Potenz eines immunsuppressiven Wirkstoffes auf die Ag-spezifische Zytokinproduktion von T_H1 Zellen zu evaluieren (van der Meide et al., 1991). Daher erschien uns die Verwendung dieser Methode auch im Rattenmodell als sinnvoll und kliniknah. Mit Hilfe des EliSpot-Assay wird hier über das Effektormolekül IFN γ die Reaktivität der T-, NKT- und NK-Zellen auf die spezifischen Ag der spendenden Person analysiert. Dies ermöglichte uns zu beurteilen, inwiefern sich die B-Zell-Depletion auf die IFN γ -Produktion auswirkt und der EliSpot im Rattenmodell geeignet ist, um klinische Fragestellungen zu bearbeiten. Nach aktuellem Kenntnisstand untersuchen wir hier zum ersten Mal den Effekt der Depletion auf die Zytokinproduktion mit Hilfe eines EliSpot-Assay in einem Rattenmodell. In den Vorversuchen mit dem immer

gleichen Versuchstier konnte gezeigt werden, dass die Methode gut reproduzierbare Ergebnisse liefert. Die Ergebnisse können also als aussagekräftig gewertet werden und die Etablierung verlief demnach erfolgreich.

Vor der NTx konnte in beiden Gruppen keine IFN γ -Produktion durch Empfängerzellen nachgewiesen werden. Dies beweist, dass vorher keine Spender*innen-spezifischen GZ durch eine eventuell bereits erfolgte Immunisierung gebildet wurden (Gebauer et al., 2002). Eine und drei Wochen nach der B-Zell-Depletion kann in beiden Versuchsgruppen eine deutliche IFN γ -Produktion nachgewiesen werden, deren Höhe sich zwischen den Gruppen nicht signifikant unterscheidet. Dies zeigt eine eindeutige T-Zell-vermittelte Immunantwort auf die allo-Ag. Die Behandlung mit dem Anti-CD20 AK hat in diesem Rattenmodell demnach also keinen Einfluss auf die Produktion von IFN γ und somit nicht auf die Alloreaktivität der T-, NKT- und NK-Zellen. Damit wird das Ergebnis von Kamburova et al. und Smeekens et al., dass die Behandlung mit RTX im humanen Modell keinen Einfluss auf die IFN γ -Level nach einer NTx hat, auch im Rattenmodell bestätigt (Kamburova et al., 2015, Smeekens et al., 2013). Dies zeigt auch, dass der etablierte EliSpot gut geeignet ist, um weitere klinische Fragestellungen mit einer Methodik zu bearbeiten und in der translationalen Forschung zu nutzen, die im Klinikalltag immer größere Verwendung findet.

Die Hypothese von Bath und Watzl, dass eine Anti-CD20-Behandlung die zytotoxischen Effektorfunktionen von NK-Zellen steigert, kann also in Bezug auf die Produktion von IFN γ nicht bestätigt werden. Dies bestärkt die Vermutung, dass die gesteigerte Zytotoxizität der NK-Zellen in ihrer Studie auf andere Effektormoleküle, wie zum Beispiel Perforin und Granzym B, zurückzuführen ist. (Bhat und Watzl, 2007) Dabei muss aber auch beachtet werden, dass die NK-Zellen in der Studie der Kolleginnen und Kollegen durch IL2 aktiviert wurden und nicht wie in unserem Versuch durch Spender*innen-Ag. Dies kann über verschiedene Signaltransduktionswege zu einer unterschiedlich starken Aktivierung der Zelle führen und mit veränderten Effektorfunktionen einhergehen. Mit den hier durchgeführten Versuchen kann nicht weiter spezifiziert werden, ob und wie die Funktionen der NK-Zellen unter der Anti-CD20 Behandlung beeinflusst werden.

Unter anderem durch ihre IFN γ -Produktion tragen T-Zellen zur Entwicklung einer zellulären Abstoßungsreaktionen bei (Nazari et al., 2013, Cornell et al., 2008). In Kombination mit der Bildung von DSA kann die Vermutung aufgestellt werden, dass in unserem Modell eine akute gemischt humoral-zelluläre Abstoßungsreaktion vorliegt. Wie in der Literatur beschrieben, steigt die Wahrscheinlichkeit für die Induktion einer akuten AK vermittelten Abstoßung mit einem positivem IFN γ -EliSpot Ergebnis an: Spender*innen-spezifische T-Zellen sind potente Induktoren der Neubildung von DSA. Es wird vermutet, dass eine gleichzeitig oder nachfolgend zu einer humoralen Abstoßung ablaufende zelluläre Komponente

der wichtigste pathogene Faktor für die Entstehung einer Transplantatschädigung ist. (Crespo et al., 2017, Gorbacheva et al., 2016, Bellisola et al., 2006, Gaughan et al., 2014) Die Verringerung der DSA-Menge durch die B-Zell-Depletion wird in unserem Model letztlich vermutlich durch eine fehlende Unterdrückung der proinflammatorischen T-Zell-Effektorfunktion ausgebremst. Dies hebt die Relevanz der Kombination einer B-Zell-Depletion mit Medikamenten, welche die T-Zell-Funktionen inhibieren, hervor. Als alleinige Medikation scheint die Anti-CD20 Behandlung aufgrund der fortbestehenden T-Zell-Funktion nicht ausreichend zu sein. Im Menschen konnte passenderweise gezeigt werden, dass eine Kombination von Medikamenten, die auch die T-Zell-Funktion supprimieren, eine akute Abstoßungsreaktion mit Komponenten beider Entitäten effektiv begrenzen kann (Sun et al., 2007, Sun et al., 2006). Eine Erklärung dafür können möglicherweise die Ergebnisse von Xiang et al. liefern: Es konnte beobachtet werden, dass T-Zellen für den Zeitraum der B-Zell-Depletion eine gesteigerte Pathogenität zeigen, was sich anhand einer gesteigerten proinflammatorischen Zytokinproduktion äußert (Xiang et al., 2012). Da wir darstellen konnten, dass die Depletion mit dem Anti-CD20 AK keinen Einfluss auf die IFN γ -Produktion der T-Zellen hat, muss diese gesteigerte Pathogenität in der vermehrten Sekretion eines oder mehrerer anderer proinflammatorischer Zytokine liegen. Es sollte Gegenstand zukünftiger Versuche sein, die genauen Mechanismen, die zu der gesteigerten Pathogenität der T-Zellen unter einer B-Zell-Depletion führen, zu verstehen, um dann die bestmöglichen Medikamente für eine Kombinationstherapie mit Anti-CD20 AK ausfindig machen zu können.

Beeinflusst die Anti-CD20 AK Therapie die Population Toleranz-induzierender Zellen, wie regulatorische B- und T-Zellen?

Ob die B-Zell-Depletion auch eine Auswirkung auf regulatorische B- und T-Zellen hat, ist in Anbetracht ihrer essentiellen Funktion in der Toleranzentwicklung gegenüber dem Transplantat, wichtig zu evaluieren.

Die erst kürzlich veröffentlichten Ergebnisse von Bath et al. zeigen, dass eine B-Zell-Depletion, wie bereits erwähnt, vermutlich auch zum Verlust regulatorischer Mechanismen von B-Zellen führt (Bath et al., 2019). Bregs stellen eine sehr heterogene Gruppe an Zellen dar: Sie werden in verschiedenen B-Zell-Subpopulationen beobachtet und zeigen diverse Phänotypen. Unter anderem können sie auch aus naiven B-Zellen generiert werden. (Mauri und Menon, 2015, Rafei et al., 2009) Daher kann angenommen werden, dass auch in unserem Modell Bregs durch die B-Zell-Depletion mit dem hier verwendeten Anti-CD20 AK vermindert oder sogar eliminiert werden. Dies stützt die oben aufgestellte Hypothese, dass die gesteigerte Menge an Switched B-Zellen in der Versuchsgruppe Folge der Depletion von naiven B-Zellen ist, da diese zur Abwesenheit eines regulatorischen Faktors führt. Allerdings konnte bei einzelnen spezifischen Breg-Subpopulationen eine Resistenz gegenüber

einer Anti-CD20 Therapie gezeigt werden, die unter anderem durch Umgebungsfaktoren gesteuert wird (Khan et al., 2015, Horikawa et al., 2011). Um den Einfluss der Depletion auf die verschiedenen Breg-Populationen genauer evaluieren zu können, muss spezifischer untersucht werden, welche Breg-Subpopulationen von einer Depletion mit einem Anti-CD20 AK betroffen sind und welche regulatorischen Effekte diese auf die B-Zell-Entwicklung, insbesondere die von Switched B-Zellen, und die Alloreaktivität von T- und B-Zellen haben. Bezüglich der Tregs konnten zu keinem Zeitpunkt im Versuchsverlauf Unterschiede zwischen den Gruppen beobachtet werden. Es kann also geschlossen werden, dass die B-Zell-Depletion in dem hier verwendeten Modell keinen direkten Einfluss auf die absoluten Zellzahlen und den Verlauf der Immunantwort der Tregs auf das allo Transplantat hat. Übereinstimmende Ergebnisse konnten von Kamburova et al. und Wallin et al. in humanen Modellen beobachtet werden (Kamburova et al., 2014, Wallin et al., 2014). Somit hat die Anti-CD20 Therapie vermutlich einen Effekt auf zumindest einige Subgruppen von Bregs, aber keinen auf Tregs. Wie sich die Depletion genau auf die verschiedenen regulatorischen Mechanismen, die von B-Zellen ausgehen, auswirkt, muss im Einzelnen in zukünftigen Studien untersucht werden.

Wie ist das Nierengewebe zwei Wochen nach der NTx organisiert?

Wie sich die B-Zell-Depletion auf histologischer Ebene auf die Gewebeorganisation der Transplantate auswirkt, wurde mit Hilfe einer PAS-Reaktion beurteilt. Die makroskopisch deutlich vergrößerten Nieren zeigen in beiden Gruppen bereits in der zweiten Woche post NTx eine starke Gewebedestruktion: Bereiche mit fibrotischem Umbau, Ödemen, Einblutungen, Nekrosen, verminderter Zelldichte und mononukleären Zellinfiltraten wurden identifiziert. Ein Kriterium einer humoralen Abstoßungsreaktion sind arterielle fibrinoide Nekrosen, die sekundär zu großen Gewebeeinblutungen führen können, wie es in den vorliegenden Geweben der Fall ist (Mauiyyedi et al., 2002). Auch Cornell et al. definieren Nekrosen arterieller Gefäßwände, Mikrothromben, Einblutungen und Infarzierungen als Merkmale einer akuten humoralen Abstoßungsreaktion. Keines davon ist allerdings spezifisch für diese Entität. (Cornell et al., 2008) In Kombination mit dem Vorliegen von DSA in beiden Gruppen erhärtet sich der Verdacht, dass die in unserem Versuch untersuchten Nierentransplantate eine sehr weit fortgeschrittene akute humorale Transplantatabstoßung zeigen: Zirkulierende DSA sind ein wichtiges Kriterium in der Diagnostik einer akuten humoralen Abstoßungsreaktion (Mauiyyedi et al., 2002). Zusätzlich passt das histologische Bild der hier untersuchten Nierentransplantate zu den oben beschriebenen Charakteristika einer solchen Abstoßungsentität. Da jedoch verschiedene Pathologien ein Transplantatversagen verursachen können und die vorliegenden histologischen Kennzeichen als gemeinsame Endstrecke aufzeigen können, kann zu diesem Zeitpunkt nicht mehr nachvollzogen werden,

welche Ursache genau zu diesem Gewebezustand geführt hat. Daher müssen neben einer immunologisch bedingten Abstoßungsreaktion – sowohl einer akuten zellulär vermittelten, einer akuten humoral vermittelten als auch einer gemischten Abstoßungsreaktion – auch andere mögliche Pathologien, wie zum Beispiel ein segmentaler Niereninfarkt oder Gefäßthrombosen, die als Komplikation einer NTx auftreten können, in Betracht gezogen werden (Halloran und Hunsicker, 2001, Ardalan et al., 2008). Um hier eine präzisere Differenzierung vornehmen zu können, sollte in zukünftigen Versuchen ein noch früherer Zeitpunkt zur histologischen Untersuchung der Transplantate gewählt werden, um ein früheres Stadium der Abstoßung abzubilden. Zusätzlich sollte dann auch die histologische Färbung der Transplantatgewebe für das Komplementfragment C4d erfolgen, da C4d-Positivität in Kombination mit DSA als verlässlicher Marker für eine humorale Abstoßungsreaktion gilt und heute als Standardmarker in der Analyse von Transplantatbiopsien verwendet wird (Mauiyyedi et al., 2002, Roufosse et al., 2018).

Trotz der im Versuchsverlauf früher durchgeführten histologischen Untersuchung der Nieren, kann aufgrund der weit fortgeschrittenen Gewebedestruktion keine Aussage über die genaue zu Grunde liegende Pathologie getroffen werden. Da sich die Versuchsgruppen allerdings nicht voneinander unterscheiden, kann auf histologischer Ebene kein Einfluss der Behandlung mit dem Anti-CD20 AK auf die akute Abstoßungsreaktion beobachtet werden. Mehrere Arbeitsgruppen weisen nach, dass renale Transplantate bereits fünf bis sieben Tage nach einer NTx durch immunologische Abstoßungsreaktionen zerstört sind (Grau et al., 1998, Majoor und Van Breda Vriesman, 1983, Otsuka et al., 2005). Auch Zhang et al. zeigen, dass bereits fünf Tage nach einer NTx Merkmale erheblicher Gewebeerstörung in den Transplantaten zu beobachten sind, die denen der hier untersuchten Gewebe ähneln (Zhang et al., 2000). Daher ist der Zeitpunkt der Applikation des Anti-CD20 AK sieben Tage post NTx vermutlich zu spät, um dessen Auswirkungen auf die Zellinfiltrate im Transplantat und somit auf die akute Abstoßungsreaktion zu untersuchen.

Welche Zellen sind im Zellinfiltrat in den Transplantaten nachweisbar und wie ist der Einfluss des Anti-CD20 AK auf die Zusammensetzung dieser Infiltrate?

Zur Beurteilung der Zellinfiltrate in den Transplantaten wurden immunhistologische Untersuchungen von B-, T-Zellen und Makrophagen durchgeführt:

Aufgrund der starken Destruktion der Gewebe konnte keine Auswertung der immunhistologischen Färbung der B-Zellen nach allgemeingültigen Kriterien erfolgen. Trotzdem konnten vereinzelte B-Zellen in den Geweben beider Versuchsgruppen nachgewiesen werden. Die Verabreichung des Anti-CD20 AK scheint also nicht zu einer absoluten Depletion von B-Zellen im Transplantat zu führen. Die Migration der B-Zellen in das Nierentransplantat erfolgt nach Lemke et al. schon in der ersten Woche nach der NTx und somit vor der B-Zell-

Depletion sieben Tage nach der Tx (Lemke et al., 2015). Zum einen können die hier detektierten Zellen also CD20⁻ B-Zellen, wie zum Beispiel Plasmazellen, darstellen, auf die die AK-Therapie keinen Einfluss hat. Zum anderen besteht die Möglichkeit, dass die Depletion in den Transplantaten anders verläuft als im peripheren Blut. Die Literaturrecherche macht deutlich, dass keine Klarheit darüber herrscht, ob eine Anti-CD20 Therapie zu einer unvollständigen oder einer kompletten Depletion von B-Zellen im Nierentransplantat führt (Steinmetz et al., 2007, Thauinat et al., 2008). Der Aspekt, dass die B-Zell-Depletion im peripheren Blut hingegen erfolgreich verlaufen ist und dennoch B-Zellen in den Nierentransplantaten nachzuweisen sind, impliziert, dass der Depletionseffekt in den Transplantaten von weiteren Faktoren abhängt. Dies stützt die These von Thauinat et al. und Gong et al., dass das Mikromilieu die Effektivität einer Anti-CD20 Therapie mitbestimmt (Thauinat et al., 2008, Gong et al., 2005). Die nicht depletierten B-Zellen im Transplantat können dann zur akuten Abstoßungsreaktion beitragen (Cornell et al., 2008). Dies zeigen die Ergebnisse von Xu et al. deutlich: Transplantate, die ein Plasmazell-positives Infiltrat aufweisen, versagen im Verlauf häufiger als welche, die nicht von Plasmazellen infiltriert werden (Xu et al., 2008). Aus diesen Punkten können zwei folgenschwere Aspekte im Umgang mit einer Anti-CD20 Behandlung abgeleitet werden: Erstens scheinen die Einflussfaktoren auf die Wirkung von Anti-CD20 AK noch nicht vollständig verstanden zu sein. Zweitens zeigt diese Behandlung eine, vor diesem Hintergrund als Wirkungslücke zu bezeichnende Eigenschaft, die bereits 2004 von Becker et al. als einer der limitierenden Faktoren von RTX in der Transplantationsmedizin postuliert wurde (Becker et al., 2004).

Makrophagen konnten in keiner der Versuchsgruppen detektiert werden.

T-Zellen wurden vereinzelt in sehr geringer Anzahl in den Geweben nachgewiesen, eine allgemeingültige Auswertung war aber auch hier nicht möglich. Schon lange ist bekannt, dass Makrophagen und T-Zellen einen wesentlichen Teil des zellulären Infiltrates in abgestoßenen Nierentransplantaten ausmachen und insbesondere die Komposition des Infiltrates bedeutend ist für die Intensität der Abstoßungsreaktion (Girlanda et al., 2008, Grimm et al., 1999, Grau et al., 1998). Daher muss die Aussagekraft der Ergebnisse dieser Färbung kritisch hinterfragt werden: Es ist möglich, dass die immunhistologische Färbung in dem stark destruierten Gewebe nicht ohne größere Veränderungen am Protokoll durchzuführen ist. Durch die ausgedehnten Einblutungen ist eine große Anzahl möglicher Proteinbindungsstellen für AK vorhanden. Möglicherweise werden diese mit der durchgeführten Blockungsmethode nicht ausreichend gesättigt, sodass mehr unspezifische Bindungen entstehen können. Passend dazu wurden unspezifische Hintergrundfärbungen in allen Ansätzen, insbesondere in den Bereichen der Einblutungen, beobachtet. Ein potenteres Blockmedium – wie zum Beispiel der Zusatz von entfettetem Magermilchpulver zum Verdünnungsmedium – oder die Verlängerung der Waschzeiten könnten hier in zukünftigen Versuchen zur

Reduktion unspezifischer Hintergrundfärbungen beitragen (Noll und Schaub-Kuhnen, 2000). In der T-Zell-Färbung wird dieser Aspekt durch die Spezifität des AK (TCR, Klon R73), dessen Ziel-Ag auch auf Erythrozyten vorhanden ist, verstärkt. Bei derartigen Gewebeeinblutungen sollte also auf einen alternativen AK zur Färbung von T-Zellen zurückgegriffen werden.

Der Aspekt der unspezifischen Hintergrundfärbung muss auch bei der Verwendung der Ergebnisse der B-Zell-Färbung Beachtung finden.

Weiterhin dürfen die Inter-Ansatz Variationen in der Immunhistochemie nicht unterschätzt werden (Grube, 2004). Um diese möglichst gering zu halten, wurden die drei Färbungen alle von der gleichen Person durchgeführt, die allerdings Anfängerin in der Methodik war. Zur Validierung wurden die Färbungen erneut von einer erfahrenen Biologisch-technischen Assistentin des Labors durchgeführt, wodurch die unspezifischen Hintergrundfärbungen reduziert, aber nicht eliminiert und weiterhin keine Makrophagen und T-Zellen identifiziert werden konnten. Sprich konnte in ihrer Arbeit zur Optimierung von Immunhistochemie-Protokollen herausfinden, dass einer der wichtigsten Parameter dafür die Vorbehandlung der Schnitte ist (Sprich, 2006). Vor dem Hintergrund der starken Einblutungen in den Präparaten, die zu Schwierigkeiten an mehreren Stellen des Aufbereitungsprozesses führten, könnte dies ein entscheidender Punkt sein, der in zukünftigen Experimenten mit vergleichbaren Geweben unbedingt Beachtung finden sollte. Die Optimierung der verwendeten Protokolle ließ der zeitliche Rahmen dieser Arbeit leider nicht zu.

Mit den durchgeführten histologischen Untersuchungen kann nicht abschließend geklärt werden, ob eine akute zellulär vermittelte, eine humoral vermittelte oder eine gemischte akute Abstoßungsreaktion zur Zerstörung der Transplantate geführt hat. Für die Differenzierung ist die Komposition des Zellinfiltrates in den Nieren entscheidend und die zusätzliche Färbung der Gewebe für den Komplementfaktor C4d von großer Bedeutung (Fahim et al., 2007, Bohmig et al., 2002, Mauiyyedi et al., 2002). Ein Hinweis für das Vorliegen einer akuten humoralen Abstoßungsreaktion ist das Vorhandensein von DSA (Amore, 2015).

4.1 Limitationen

An unserem Versuchsaufbau ist zu kritisieren, dass keine Nephrektomie der zweiten Eigenniere der Tiere durchgeführt wurde. So ist die Überwachung der Transplantatfunktion anhand der Kreatininwerte nicht möglich. Aus dem Grund, dass unser Interesse einerseits den immunologischen Vorgängen und weniger der Funktionalität des Transplantates galt und andererseits das Überleben der Versuchstiere bis zum Endpunkt gewährleistet werden sollte, haben wir darauf verzichtet.

In Bezug auf die Auswirkung der Depletion auf die Lymphozytensubpopulationen wäre es interessant gewesen, Bregs und Plasmazellen zusätzlich zu färben. Eine im Vorjahr von Spieker etablierte Methode zur Messung von IL10-produzierenden Bregs wurde auch hier

durchgeführt (Ergebnisse nicht dargestellt), die Autorin ist allerdings zu dem Schluss gekommen, dass die mit dieser Methode erzielten Ergebnisse nicht verlässlich sind. Die zusätzliche Färbung von Plasmazell-Subpopulationen würde die genaue Untersuchung des Wirkmechanismus des Anti-CD20 AK in der Verringerung der DSA-Produktion zulassen. Ein limitierender Faktor der durchgeführten histologischen Untersuchungen ist die fehlende Färbung des Komplementfragments C4d. Damit wäre die eindeutigere Klassifizierung der Abstoßungsreaktion nach BANFF, wie sie auch in der Klinik verwendet wird, möglich.

Als weitere Limitation ist das Fehlen von validen immunhistologischen Ergebnissen zur Zusammensetzung der Zellinfiltrate in den Transplantaten zu nennen. Da mit den etablierten Protokollen und auch den bereits durchgeführten Anpassungen in diesem Versuch keine verlässlichen Färbungen erzielt werden konnten, wäre die weitere Optimierung der immunhistologischen Protokolle notwendig gewesen. Außerdem hätten weitere frühere Zeitpunkte im Abstoßungsgeschehen histologisch untersucht werden müssen, um den optimalen Zeitpunkt zur Analyse der Infiltrate in den Transplantaten zu identifizieren. Dafür blieb im Rahmen dieses Projektes leider keine Zeit.

Weiterhin muss bedacht werden, dass die Verabreichung des Anti-CD20 AK eine Woche nach der NTx vermutlich zu spät ist, um die Auswirkungen des AK auf histologischer Ebene zu untersuchen. Zhang et al. weisen nach, dass bereits fünf Tage nach einer NTx das maximale Ausmaß des T-Zell- und Makrophagen-Infiltrates in den Transplantaten zu beobachten ist und die Gewebe bereits stark zerstört sind (Zhang et al., 2000). Um die Auswirkung des Anti-CD20 AK auf die immunologischen Prozesse im Transplantat analysieren zu können, ist es notwendig, dass die Abstoßungsreaktion dort schon vor der Verabreichung des AK initiiert ist. Allerdings darf diese noch nicht zu einer so weit fortgeschrittenen Zerstörung des Gewebes geführt haben, dass eine klare Auswertung nicht mehr möglich ist. Somit sollte in weiteren Versuchen der Applikationszeitpunkt des AK auf einen früheren Zeitpunkt nach der NTx verlegt werden. Ebenso wäre es möglich, den Untersuchungszeitpunkt der Gewebe früher nach der Verabreichung des AK zu wählen.

In Bezug auf die Wirkung des Anti-CD20 AK muss beachtet werden, dass verschiedene Subpopulationen zu verschiedenen Zeitpunkten depletiert werden: Zum Beispiel werden unreife B-Zell-Stadien früher depletiert als B-GZ (Rehnberg et al., 2009). Dies zeigt, dass der Anti-CD20 AK zu verschiedenen Zeitpunkten nach der Verabreichung unterschiedliche Effekte auf die Abstoßungsreaktion hat. So können kurzfristige negative Effekte evtl. durch langfristige positive Effekte in der Klinik in Kauf genommen werden. Unsere Ergebnisse bilden also nur eine Momentaufnahme der Auswirkungen des AK ab, die in den Kontext der langfristigen Effekte gesetzt werden muss. So wird aus der Literatur deutlich, dass der Anti-CD20 AK eine unterschiedliche Wirksamkeit auf eine akute und eine chronische humorale Abstoßung hat (Xiang et al., 2012, Surendra et al., 2016).

Weiterhin muss beachtet werden, dass es mehrere Limitationen und Schwierigkeiten in der Interpretation und Übertragung der vorhandenen Literatur gibt: In humanen Studien werden meistens Therapieschemata mit einer Kombination von RTX mit weiteren Immunsuppressiva angewandt, sodass der lokalisierte RTX-Effekt nicht bzw. nur schwer zu beurteilen ist. Genauso sind die Schemata der RTX-Anwendung von Klinik zu Klinik unterschiedlich und differieren in Dosis, Wiederholungen und Verabreichungszeitpunkt im Erkrankungsgeschehen. Außerdem wird RTX bei verschiedenen Grunderkrankungen angewendet, wie zum Beispiel Rheumatoider Arthritis, Lupus Erythematodes, Lymphomen etc., wodurch verschiedene Mikroumgebungen vorhanden sind, die die RTX-Wirkung beeinflussen. Schlussfolgerungen auf andere Erkrankungen müssen daher kritisch hinterfragt werden.

4.2 Fazit und Ausblick

Abschließend lässt sich auf Grundlage der hier erarbeiteten Ergebnisse sagen, dass es für die Verwendung eines Anti-CD20 AK in der Behandlung von akuten Abstoßungsreaktionen eines Nierentransplantates mehrere Aspekte gibt, die bei der Therapieentscheidung unbedingt Beachtung finden müssen.

Die B-Zell-Depletion resultiert in einem starken Entwicklungsreiz für neue B-Zellen und weiterhin führt sie vermutlich auch zur Abwesenheit von Zellen mit immunregulatorischen Eigenschaften. Somit hat die Depletion einen starken Einfluss auf die Immunhomöostase. Dies führt in dem hier untersuchten Modell vor allem zu einer Steigerung der Populationsgröße von Switched-B-Zellen. Die Ergebnisse legen allerdings nahe, dass diese gesteigerte Population nicht zu einer stärkeren humoralen Abstoßungsreaktion beiträgt. Da Switched-B-Zellen jedoch maßgeblich an der Alloreaktivität gegenüber einem Transplantat beteiligt sind, sollte es Inhalt zukünftiger Studien sein, die genauen Effekte der veränderten Populationsgröße auf die Immunantwort zu evaluieren. Genauso ist es von großer Bedeutung zu untersuchen, auf welche Breg-Subpopulationen sich die Depletion genau und mit welchen Folgen auswirkt.

Unabhängig von den Switched-B-Zellen führt die B-Zell-Depletion zu einem Abfall der DSA-Produktion. Dabei hängt das Ausmaß und die Dauer der Reduktion vermutlich von mehreren Faktoren ab, welche die Dauer der Depletionsphase mitbestimmen. Dazu gehören insbesondere die Dosis des verabreichten AK, Therapiewiederholungen und Therapiekombinationen.

Die nicht vollständige Unterdrückung der DSA-Produktion ist auf die fehlende Depletion von Plasmazellen zurückzuführen, die auf ihrer CD20-Negativität beruht. Vor dem Hintergrund der Bedeutung von DSA in der humoralen Abstoßungsreaktion kann dies durchaus als Wirkungslücke von Anti-CD20 AK bezeichnet werden.

Weiterhin konnten wir erfolgreich einen EliSpot Assay in dem verwendeten Rattenmodell etablieren und damit zeigen, dass die B-Zell-Depletion keinen Einfluss auf die Alloreaktivität

von T-, NKT- und NK-Zellen hat. Dies beschränkt sich allerdings auf das Effektormolekül IFN γ . In weiteren Studien muss untersucht werden, inwiefern sich die Depletion der B-Zellen auf andere Effektormoleküle dieser Zellen auswirkt. Es ist zu vermuten, dass die fehlende Suppression der proinflammatorischen T-Zell-Effektorfunktion die möglichen maximalen Effekte einer Anti-CD20 Therapie ausbremst. Somit ist die Kombination einer B-Zell-Depletion mit T-Zell-Inhibitoren eine naheliegende Möglichkeit, die Potenz des Anti-CD20 AK zu steigern. Weitere Forschung in diesem Bereich ist nötig, um einen optimalen Synergismus erzielen zu können.

Um die obigen Überlegungen auch auf histologischer Ebene analysieren zu können, ist es von Nöten, die histologischen Protokolle für stark zerstörte Gewebe zu optimieren.

Es darf außerdem nicht vergessen werden, dass die Depletion in sekundär lymphatischen Organen geringer ausgeprägt ist und die Dynamik der Mechanismen, die nach einer Depletion ablaufen, auch von den übrigen Zellen in den sekundär lymphatischen Organen abhängig ist. Vor allem dort, aber auch im Allgemeinen dürfen der Einfluss von Umgebungsfaktoren und interindividuelle Wirkunterschiede im Einsatz von Anti-CD20 AK nicht vergessen werden und insbesondere nicht unterschätzt werden.

Die alleinige Verwendung von einem Anti-CD20 AK scheint in der akuten Abstoßungsreaktion keinen Vorteil im Transplantatüberleben zu bewirken. Der Nutzen und die Risiken, die mit der AK-Behandlung einhergehen, müssen im klinischen Alltag immer individuell für jeden*jede Patient*in neu bewertet werden. Insbesondere eine Kombination mit Medikamenten, welche die T-Zell-Funktion supprimieren, scheint essentiell zu sein und die Effektivität der Behandlung zu steigern. Weitere Bemühungen zur Aufschlüsselung der genauen Mechanismen, mit denen ein Anti-CD20 AK in die Immunreaktion auf allo-Ag eingreifen, sind weiterhin dringend notwendig.

5 Zusammenfassung

Die Rolle von Lymphozyten in der Pathophysiologie von Transplantatabstoßungen ist schon seit langem Forschungsinhalt in der Transplantationsmedizin. Neben der eingehenden Untersuchung der Rolle von T-Lymphozyten, rückte die Bedeutung von B-Lymphozyten in den letzten Jahren in den Fokus der Wissenschaftler*innen. Der Erfolg von B-Zell-modulierenden Medikamenten in der Behandlung von Lymphomen und Autoimmunerkrankungen mit starker B-Zell-Komponente, versprach neue Erfolge in der Therapie von Abstoßungsreaktionen. Rituximab, ein chimärer Anti-CD20 Antikörper, der CD20 positive B-Zellen depletiert, wird seit einiger Zeit in der Behandlung der humoralen Nierenabstoßung verwendet. Das Präparat ist für diese Indikation nicht zugelassen und der Nutzen ist in der Literatur nicht eindeutig geklärt. Ziel dieser Arbeit war es daher, die Effekte eines Anti-CD20 Antikörpers auf die Funktionsweise von B-Zellen und deren Interaktion mit IFN γ -bildenden Zellen näher zu untersuchen.

Dazu wurde in einem MHC-kongenem Nierentransplantationsmodell in der Ratte eine akute Abstoßungsreaktion simuliert und ein B-Zell depletierender Anti-CD20 Antikörper verabreicht. Dessen Einfluss auf verschiedene B-, T- und NK-Zellen wurde mit Hilfe von FACS-Analysen des peripheren Blutes, der Milz und der Lymphknoten, der Bestimmung Donorspezifischer Antikörper, sowie histologischer und immunhistologischer Untersuchungen beurteilt. Um den Einfluss von B-Zellen auf IFN γ -produzierende Zellen zu untersuchen, wurde ein Enzyme Linked Immuno Spot-Assay in dem hier verwendeten Rattenmodell erstmalig etabliert.

Die Behandlung mit dem verwandten Antikörper führte zu signifikanten Veränderungen in der Zusammensetzung der B-Zell-Populationen. Auch die Produktion Donorspezifischer Antikörper verminderte sich signifikant. Die Bildung von IFN γ durch T-, NK- und NKT-Zellen beeinflusste der Antikörper allerdings nicht. Die immunhistologische Darstellung war aufgrund der bereits weit fortgeschrittenen Destruktion der Transplantate nur bedingt aussagekräftig.

Der Anti-CD20 Antikörper beeinflusst die Immunhomöostase, insbesondere die der B-Zell-Subpopulationen, stark. Die Produktion Donorspezifischer Antikörper wird jedoch nicht vollständig durch die Depletion unterdrückt. Eine Auswirkung auf die Interaktion zwischen B-Zellen und T-, NK- und NKT-Zellen, bezogen auf deren IFN γ -Reaktivität konnte nicht nachgewiesen werden. Zusammenfassend kann dieser Studie nach zu urteilen, die Verwendung eines Anti-CD20 Antikörpers als Immunmodulator nicht als vorteilhaft in der Behandlung einer akuten Abstoßungsreaktion eines Nierentransplantates gewertet werden.

6 Abstract

The role of lymphocytes in the pathophysiology of transplantation rejection is subject of intensive research for a long time. Apart from studies on the role of T-lymphocytes, the relevance of B-lymphocytes has received greater attention in the field of transplantation medicine recently. Success of B-cell-modulating drugs in the treatment of lymphoma and autoimmune diseases with a significant B-cell-component have risen hope for new therapeutic strategies for transplant rejection. Rituximab, a chimeric anti-CD20 antibody, which depletes CD20 positive B-lymphocytes is used in the therapy of humoral acute rejection of renal transplants. This drug is not approved for use in transplantation rejection and validation of this therapy is scarce and subject of a controversial debate. Therefore, the aim of this thesis is to further examine the effects of an anti-CD20 antibody on the functional mechanisms of B-lymphocytes and their interaction with IFN γ -producing cells.

An MHC-congene rat renal transplantation model was used to simulate an acute rejection of the renal transplant. After seven days, a B-cell-depleting anti-CD20 antibody was injected. Its impact on different B-, T- and NK-cells was measured by FACS-analyses of peripheral blood, spleen and lymph nodes, quantification of donor-specific antibodies and with histological and immunohistochemical studies. To investigate the effect of a B-cell-depletion on IFN γ -producing cells, an Enzyme Linked Immuno Spot-Assay was established in the applied rat model for the first time.

The treatment with an anti-CD20 antibody resulted in a significantly altered composition of B-cell-populations in peripheral blood, spleen and lymph nodes. Likewise, there was a significant decrease in the production of donor-specific antibodies due to the B-cell-depletion. In contrast an influence on the produced amount of IFN γ by T-, NK- and NKT-cells could not be detected. The histological examination presented extensively destroyed renal transplants. The immunohistochemical staining of possible immunological infiltrates is therefore of only limited usefulness.

The anti-CD20 antibody has a strong influence on the immunological homeostasis, particularly on B-cell-subpopulations. Nevertheless, the formation of donor-specific antibodies was not inhibited completely. There was no significant interaction found between B-cells and T-, NK- and NKT-cells concerning their production of IFN γ post transplantation. In conclusion, in this study the use of an anti-CD20 antibody as an immune modulator could not be proven to be beneficial in the care of acute rejection episodes of renal transplants.

7 Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
Abk.	Abkürzung
AEC	3-Amino-9-Ethylcarbazol
Ag	Antigen
AK	Antikörper
Allo	allogen
AP	Alkalische Phosphatase
APC	Antigen presenting cell
APC	Allophycocyanin
B-Zellen	B-Lymphozyten
BAFF	B cell Activating Factor of the TNF α -Family
BCR	B-Zell-Rezeptor
Bzw.	beziehungsweise
Bidest.	bidestilliertes
Bregs	regulatorische B-Zellen
BSA	bovine serum albumin
CD	cluster of differentiation

Cy7	Cyanin 7
d	Tag
Dest.	destilliert
DMSO	Dimethylsulfoxid
DPBS	Dulbecco's phosphate-buffered saline
DSA	Donor-spezifische Antikörper
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EliSpot	Enzyme Linked Immuno Spot Assay
FACS	Fluorescence activated cell sorter
FBS	Fetal bovine serum
FITC	Fluorescein-Isothyocyanat
Fix/Perm	Fixation & Permeabilization Kit
FoxP3	Forkhead Box Protein P3
FSC	Forward Scatter
g	Gramm
GtaRt	Goat anti Rat
GZ	Gedächtniszelle
HLA	Human leucocyte antigen

IFN	Interferon
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
kg	Kilogramm
KG	Körpergewicht
l	Liter
LEW	LEWIS
LPS	Lipopolysaccharid
MFI	Mean Fluorescent Intensity
MHC	major histocompatibility complex
Min	Minute
mind.	mindestens
MMF	Mycophenolat-Mofetil
μ	mikro
n	Anzahl
NaCl	Natriumchlorid
NK-Zelle	natürliche Killerzelle
NKT-Zelle	natürliche Killer T-Zelle

NRS	normales Rattenserum
NTx	Nierentransplantation
PAS	periodic Acid-Schiff
PAMP	pathogen-associated molecular pattern
PBS	phosphate buffered saline
PE	Phycoerythrin
PMA	Phorbol 12-Myristate 13-Acetate
PRR	pattern recognition receptor
RAM	rabbit anti mouse
rpm	rounds per minute
RT	Raumtemperatur
SSC	side scatter
Strep	Streptavidin
T B-Zelle	Transitional B-Zelle
T1 B-Zelle	Transitional 1 B-Zelle
T2 B-Zelle	Transitional 2 B-Zelle
T-Zelle	T-Lymphozyt
Tab.	Tabelle

TCR	T cell receptor
TGF	Transforming Growth Factor
T _H	T-Helfer-
TNF	Tumor Nekrose Faktor
Tregs	regulatorische T-Zellen
Tx	Transplantation
\bar{x}	Mittelwert

8 Literaturverzeichnis

- JoVE Science Education Database. Immunologie (2020). *ELISPOT-Test: Nachweis von IFN--Splenozyten* [Online im Internet]. Cambridge, Massachusetts, USA. URL: <https://www.jove.com/science-education/10497/elispot-test-nachweis-von-ifn-splenozyten?language=German> [Stand: 03.04.2020, 09:13 Uhr].
- Abbas, A. K., Murphy, K. M. & Sher, A. (1996). Functional diversity of helper T lymphocytes. *Nature*, 383, 787-93.
- Abcam. *graphic ELISPOT protocol description* [Online im Internet]. URL: https://docs.abcam.com/pdf/general/ELISPOT_protocol_overview.pdf [Stand: 11.04.2020, 12:34 Uhr].
- Adlowitz, D. G., Barnard, J., Biear, J. N., Cistrone, C., Owen, T., Wang, W., Palanichamy, A., Ezealah, E., Campbell, D., Wei, C., Looney, R. J., Sanz, I. & Anolik, J. H. (2015). Expansion of Activated Peripheral Blood Memory B Cells in Rheumatoid Arthritis, Impact of B Cell Depletion Therapy, and Biomarkers of Response. *PLoS One*, 10, e0128269.
- Agrawal, S., Smith, S. A., Tangye, S. G. & Sewell, W. A. (2013). Transitional B cell subsets in human bone marrow. *Clin Exp Immunol*, 174, 53-9.
- Akbar, S. A., Jafri, S. Z., Amendola, M. A., Madrazo, B. L., Salem, R. & Bis, K. G. (2005). Complications of renal transplantation. *Radiographics*, 25, 1335-56.
- Alausa, M., Almagro, U., Siddiqi, N., Zuiderweg, R., Medipalli, R. & Hariharan, S. (2005). Refractory acute kidney transplant rejection with CD20 graft infiltrates and successful therapy with rituximab. *Clin Transplant*, 19, 137-40.
- Allison, A. C. (2005). Mechanisms of action of mycophenolate mofetil. *Lupus*, 14 Suppl 1, s2-8.
- Allman, D., Lindsley, R. C., Demuth, W., Rudd, K., Shinton, S. A. & Hardy, R. R. (2001). Resolution of three nonproliferative immature splenic B cell subsets reveals multiple selection points during peripheral B cell maturation. *J Immunol*, 167, 6834-40.
- Alwaysn, I. P., Xu, Y., Basker, M., Wu, C., Buhler, L., Lambrigts, D., Treter, S., Harper, D., Kitamura, H., Vitetta, E. S., Abraham, S., Awwad, M., White-Scharf, M. E., Sachs, D. H., Thall, A. & Cooper, D. K. (2001). Effects of specific anti-B and/or anti-plasma cell immunotherapy on antibody production in baboons: depletion of CD20- and CD22-positive B cells does not result in significantly decreased production of anti-alphaGal antibody. *Xenotransplantation*, 8, 157-71.
- Amore, A. (2015). Antibody-mediated rejection. *Curr Opin Organ Transplant*, 20, 536-42.
- Ardalan, M. R., Nasri, H., Ghabili, K. & Mohajel Shoja, M. (2008). Acute tubular necrosis after renal allograft segmental infarction: the nephrotoxicity of necrotic material. *Exp Clin Transplant*, 6, 312-4.
- Bamoulid, J., Staeck, O., Halleck, F., Durr, M., Paliege, A., Lachmann, N., Brakemeier, S., Liefeldt, L. & Budde, K. (2015). Advances in pharmacotherapy to treat kidney transplant rejection. *Expert Opin Pharmacother*, 16, 1627-48.
- Banchereau, J., Briere, F., Caux, C., Davoust, J., Lebecque, S., Liu, Y. J., Pulendran, B. & Palucka, K. (2000). Immunobiology of dendritic cells. *Annu Rev Immunol*, 18, 767-811.
- Bath, N. M., Ding, X., Wilson, N. A., Verhoven, B. M., Boldt, B. A., Sukhwai, A., Reese, S. R., Panzer, S. E., Djamali, A. & Redfield, R. R., 3rd (2019). Desensitization and treatment with APRIL/BLYS blockade in rodent kidney transplant model. *PLoS One*, 14, e0211865.
- Becker, Y. T., Becker, B. N., Pirsch, J. D. & Sollinger, H. W. (2004). Rituximab as treatment for refractory kidney transplant rejection. *Am J Transplant*, 4, 996-1001.

- Beimler, J., Dikow, R., Morath, C., Schwenger, V. & Zeier, M. (2008). KAPITEL 3 - Dialyse. In: Facharzt Nephrologie. Risler, T. & Kühn, K. (eds.) 1 ed. Urban & Fischer, Munich, 217-277l.
- Bellisola, G., Tridente, G., Nacchia, F., Fior, F. & Boschiero, L. (2006). Monitoring of cellular immunity by interferon-gamma enzyme-linked immunosorbent spot assay in kidney allograft recipients: preliminary results of a longitudinal study. *Transplant Proc*, 38, 1014-7.
- Bestard, O., Crespo, E., Stein, M., Lucia, M., Roelen, D. L., De Vaal, Y. J., Hernandez-Fuentes, M. P., Chatenoud, L., Wood, K. J., Claas, F. H., Cruzado, J. M., Grinyo, J. M., Volk, H. D. & Reinke, P. (2013). Cross-validation of IFN-gamma Elispot assay for measuring alloreactive memory/effector T cell responses in renal transplant recipients. *Am J Transplant*, 13, 1880-90.
- Bestard, O., Cruzado, J. M., Lucia, M., Crespo, E., Casis, L., Sawitzki, B., Vogt, K., Cantarell, C., Torras, J., Melilli, E., Mast, R., Martinez-Castelao, A., Goma, M., Reinke, P., Volk, H. D. & Grinyo, J. M. (2013). Prospective assessment of antidonor cellular alloreactivity is a tool for guidance of immunosuppression in kidney transplantation. *Kidney Int*, 84, 1226-36.
- Bhat, R. & Watzl, C. (2007). Serial killing of tumor cells by human natural killer cells--enhancement by therapeutic antibodies. *PLoS One*, 2, e326.
- Biron, C. A., Nguyen, K. B., Pien, G. C., Cousens, L. P. & Salazar-Mather, T. P. (1999). Natural killer cells in antiviral defense: function and regulation by innate cytokines. *Annu Rev Immunol*, 17, 189-220.
- Bohmig, G. A., Exner, M., Watschinger, B. & Regele, H. (2002). Acute humoral renal allograft rejection. *Curr Opin Urol*, 12, 95-9.
- Brennecke, A. M., Duber, S., Roy, B., Thomsen, I., Garbe, A. I., Klawonn, F., Pabst, O., Kretschmer, K. & Weiss, S. (2018). Induced B Cell Development in Adult Mice. *Front Immunol*, 9, 2483.
- Bruck, K., Stel, V. S., Gambaro, G., Hallan, S., Volzke, H., Arnlov, J., Kastarinen, M., Guessous, I., Vinhas, J., Stengel, B., Brenner, H., Chudek, J., Romundstad, S., Tomson, C., Gonzalez, A. O., Bello, A. K., Ferrieres, J., Palmieri, L., Browne, G., Capuano, V., Van Biesen, W., Zoccali, C., Gansevoort, R., Navis, G., Rothenbacher, D., Ferraro, P. M., Nitsch, D., Wanner, C., Jager, K. J. & European, C. K. D. B. C. (2016). CKD Prevalence Varies across the European General Population. *J Am Soc Nephrol*, 27, 2135-47.
- Bubien, J. K., Zhou, L. J., Bell, P. D., Frizzell, R. A. & Tedder, T. F. (1993). Transfection of the CD20 cell surface molecule into ectopic cell types generates a Ca²⁺ conductance found constitutively in B lymphocytes. *J Cell Biol*, 121, 1121-32.
- Burton, S. A., Amir, N., Asbury, A., Lange, A. & Hardinger, K. L. (2015). Treatment of antibody-mediated rejection in renal transplant patients: a clinical practice survey. *Clin Transplant*, 29, 118-23.
- Cambridge, G., Isenberg, D. A., Edwards, J. C., Leandro, M. J., Migone, T. S., Teodorescu, M. & Stohl, W. (2008). B cell depletion therapy in systemic lupus erythematosus: relationships among serum B lymphocyte stimulator levels, autoantibody profile and clinical response. *Ann Rheum Dis*, 67, 1011-6.
- Cambridge, G., Leandro, M. J., Edwards, J. C., Ehrenstein, M. R., Salden, M., Bodman-Smith, M. & Webster, A. D. (2003). Serologic changes following B lymphocyte depletion therapy for rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum*, 48, 2146-54.
- Caraher, E. M., Parenteau, M., Gruber, H. & Scott, F. W. (2000). Flow cytometric analysis of intracellular IFN-gamma, IL-4 and IL-10 in CD3+4+ T-cells from rat spleen. *Journal of Immunological Methods*, 244, 12.

- Cerutti, A., Puga, I. & Cols, M. (2012). New helping friends for B cells. *Eur J Immunol*, 42, 1956-68.
- Chapman, J. R., O'connell, P. J. & Nankivell, B. J. (2005). Chronic renal allograft dysfunction. *J Am Soc Nephrol*, 16, 3015-26.
- Clatworthy, M. R., Watson, C. J., Plotnek, G., Bardsley, V., Chaudhry, A. N., Bradley, J. A. & Smith, K. G. (2009). B-cell-depleting induction therapy and acute cellular rejection. *N Engl J Med*, 360, 2683-5.
- GBD Chronic Kidney Disease Collaboration (2020). Global, regional, and national burden of chronic kidney disease, 1990-2017: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2017. *Lancet*, 395, 709-733.
- GBD 2015 Disease and Injury Incidence and Prevalence Collaborators (2016). Global, regional, and national incidence, prevalence, and years lived with disability for 310 diseases and injuries, 1990-2015: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2015. *Lancet*, 388, 1545-1602.
- Cooper, M. D., Peterson, R. D. & Good, R. A. (1965). Delineation of the Thymic and Bursal Lymphoid Systems in the Chicken. *Nature*, 205, 143-6.
- Cornell, L. D., Smith, R. N. & Colvin, R. B. (2008). Kidney transplantation: mechanisms of rejection and acceptance. *Annu Rev Pathol*, 3, 189-220.
- Cragg, M. S., Walshe, C. A., Ivanov, A. O. & Glennie, M. J. (2005). The biology of CD20 and its potential as a target for mAb therapy. *Curr Dir Autoimmun*, 8, 140-74.
- Crespo, E., Cravedi, P., Martorell, J., Luque, S., Melilli, E., Cruzado, J. M., Jarque, M., Meneghini, M., Manonelles, A., Donadei, C., Lloberas, N., Goma, M., Grinyo, J. M., Heeger, P. & Bestard, O. (2017). Posttransplant peripheral blood donor-specific interferon-gamma enzyme-linked immune spot assay differentiates risk of subclinical rejection and de novo donor-specific alloantibodies in kidney transplant recipients. *Kidney Int*, 92, 201-213.
- Crespo, E., Lucia, M., Cruzado, J. M., Luque, S., Melilli, E., Manonelles, A., Lloberas, N., Torras, J., Grinyo, J. M. & Bestard, O. (2015). Pre-transplant donor-specific T-cell alloreactivity is strongly associated with early acute cellular rejection in kidney transplant recipients not receiving T-cell depleting induction therapy. *PLoS One*, 10, e0117618.
- Curotto De Lafaille, M. A. & Lafaille, J. J. (2009). Natural and adaptive foxp3+ regulatory T cells: more of the same or a division of labor? *Immunity*, 30, 626-35.
- Czerkinsky, C. C., Nilsson, L. A., Nygren, H., Ouchterlony, O. & Tarkowski, A. (1983). A solid-phase enzyme-linked immunospot (ELISPOT) assay for enumeration of specific antibody-secreting cells. *J Immunol Methods*, 65, 109-21.
- Davis, C. L. & Delmonico, F. L. (2005). Living-donor kidney transplantation: a review of the current practices for the live donor. *J Am Soc Nephrol*, 16, 2098-110.
- Denton, M. D., Magee, C. C. & Sayegh, M. H. (1999). Immunosuppressive strategies in transplantation. *Lancet*, 353, 1083-91.
- Dittrich, W. M. & Goehde, W. H. 1973. *Flow-through chamber for photometers to measure and count particles in a dispersion medium*. 211,798.
- Douay, L., Gorin, N. C., David, R., Stachowiak, J., Salmon, C., Najman, A. & Duhamel, G. (1982). Study of granulocyte-macrophage progenitor (CFUc) preservation after slow freezing of bone marrow in the gas phase of liquid nitrogen. *Exp Hematol*, 10, 360-6.
- Dressel, R., Walter, L. & Gunther, E. (2001). Genomic and functional aspects of the rat MHC, the RT1 complex. *Immunol Rev*, 184, 82-95.
- Durand, J., Huchet, V., Merieau, E., Usal, C., Chesneau, M., Remy, S., Heslan, M., Anegon, I., Cuturi, M. C., Brouard, S. & Chiffolleau, E. (2015). Regulatory B Cells with a Partial Defect

- in CD40 Signaling and Overexpressing Granzyme B Transfer Allograft Tolerance in Rodents. *J Immunol*, 195, 5035-44.
- Edry, E. & Melamed, D. (2004). Receptor editing in positive and negative selection of B lymphopoiesis. *J Immunol*, 173, 4265-71.
- Ekberg, H., Tedesco-Silva, H., Demirbas, A., Vitko, S., Nashan, B., Gurkan, A., Margreiter, R., Hugo, C., Grinyo, J. M., Frei, U., Vanrenterghem, Y., Daloz, P., Halloran, P. F. & Study, E. L.-S. (2007). Reduced exposure to calcineurin inhibitors in renal transplantation. *N Engl J Med*, 357, 2562-75.
- El-Zoghby, Z. M., Stegall, M. D., Lager, D. J., Kremers, W. K., Amer, H., Gloor, J. M. & Cosio, F. G. (2009). Identifying specific causes of kidney allograft loss. *Am J Transplant*, 9, 527-35.
- Enderby, C. & Keller, C. A. (2015). An overview of immunosuppression in solid organ transplantation. *Am J Manag Care*, 21, s12-23.
- Fahim, T., Bohmig, G. A., Exner, M., Huttary, N., Kerschner, H., Kandutsch, S., Kerjaschki, D., Brambock, A., Nagy-Bojarszky, K. & Regele, H. (2007). The cellular lesion of humoral rejection: predominant recruitment of monocytes to peritubular and glomerular capillaries. *Am J Transplant*, 7, 385-93.
- Farrugia, D., Cheshire, J., Begaj, I., Khosla, S., Ray, D. & Sharif, A. (2014). Death within the first year after kidney transplantation--an observational cohort study. *Transpl Int*, 27, 262-70.
- Flaishon, L., Hershkoviz, R., Lantner, F., Lider, O., Alon, R., Levo, Y., Flavell, R. A. & Shachar, I. (2000). Autocrine secretion of interferon gamma negatively regulates homing of immature B cells. *J Exp Med*, 192, 1381-8.
- Flechner, S. M., Feng, J., Mastroianni, B., Savas, K., Arnovitz, J., Moneim, H., Modlin, C. S., Goldfarb, D., Cook, D. J. & Novick, A. C. (2005). The effect of 2-gram versus 1-gram concentration controlled mycophenolate mofetil on renal transplant outcomes using sirolimus-based calcineurin inhibitor drug-free immunosuppression. *Transplantation*, 79, 926-34.
- Freissmuth, M., Offermanns, S. & Böhm, S. (2016). *Pharmakologie und Toxikologie*, 2, Springer, Berlin Heidelberg,
- Freshney, R. I. (2016). *Culture of animal cells: a manual of basic technique and specialized applications*, 7, Wiley Blackwell, 728l.
- Gallant, C. & Kenny, P. (1986). Oral glucocorticoids and their complications. A review. *J Am Acad Dermatol*, 14, 161-77.
- Galle, J. & Lopau, K. (2008). KAPITEL 10 - Chronische Niereninsuffizienz. In: Facharzt Nephrologie. Risler, T. & Kühn, K. (eds.) 1 ed. Urban & Fischer, Munich, 563-630l.
- Gaughan, A., Wang, J., Pelletier, R. P., Nadasdy, T., Brodsky, S., Roy, S., Lodder, M., Bobek, D., Mofatt-Bruce, S., Fairchild, R. L., Henry, M. L. & Hadley, G. A. (2014). Key role for CD4 T cells during mixed antibody-mediated rejection of renal allografts. *Am J Transplant*, 14, 284-94.
- Gebauer, B. S., Hricik, D. E., Atallah, A., Bryan, K., Riley, J., Tary-Lehmann, M., Greenspan, N. S., DeJelo, C., Boehm, B. O., Hering, B. J. & Heeger, P. S. (2002). Evolution of the enzyme-linked immunosorbent spot assay for post-transplant alloreactivity as a potentially useful immune monitoring tool. *Am J Transplant*, 2, 857-66.
- Genberg, H., Hansson, A., Wernerson, A., Wennberg, L. & Tyden, G. (2006). Pharmacodynamics of rituximab in kidney allotransplantation. *Am J Transplant*, 6, 2418-28.
- Gershon, R. K. & Kondo, K. (1971). Infectious immunological tolerance. *Immunology*, 21, 903-14.

- Gilfillan, S., Dierich, A., Lemeur, M., Benoist, C. & Mathis, D. (1993). Mice lacking TdT: mature animals with an immature lymphocyte repertoire. *Science*, 261, 1175-8.
- Girlanda, R., Kleiner, D. E., Duan, Z., Ford, E. A., Wright, E. C., Mannon, R. B. & Kirk, A. D. (2008). Monocyte infiltration and kidney allograft dysfunction during acute rejection. *Am J Transplant*, 8, 600-7.
- Gong, Q., Ou, Q., Ye, S., Lee, W. P., Cornelius, J., Diehl, L., Lin, W. Y., Hu, Z., Lu, Y., Chen, Y., Wu, Y., Meng, Y. G., Gribling, P., Lin, Z., Nguyen, K., Tran, T., Zhang, Y., Rosen, H., Martin, F. & Chan, A. C. (2005). Importance of cellular microenvironment and circulatory dynamics in B cell immunotherapy. *J Immunol*, 174, 817-26.
- Goodnow, C. C., Vinuesa, C. G., Randall, K. L., Mackay, F. & Brink, R. (2010). Control systems and decision making for antibody production. *Nat Immunol*, 11, 681-8.
- Gorbacheva, V., Fan, R., Fairchild, R. L., Baldwin, W. M., 3rd & Valujskikh, A. (2016). Memory CD4 T Cells Induce Antibody-Mediated Rejection of Renal Allografts. *J Am Soc Nephrol*, 27, 3299-3307.
- Goto, R., You, S., Zaitzu, M., Chatenoud, L. & Wood, K. J. (2013). Delayed anti-CD3 therapy results in depletion of alloreactive T cells and the dominance of Foxp3+ CD4+ graft infiltrating cells. *Am J Transplant*, 13, 1655-64.
- Grau, V., Herbst, B. & Steiniger, B. (1998). Dynamics of monocytes/macrophages and T lymphocytes in acutely rejecting rat renal allografts. *Cell Tissue Res*, 291, 117-26.
- Grillo-Lopez, A. J., White, C. A., Dallaire, B. K., Varns, C. L., Shen, C. D., Wei, A., Leonard, J. E., McClure, A., Weaver, R., Cairelli, S. & Rosenberg, J. (2000). Rituximab: the first monoclonal antibody approved for the treatment of lymphoma. *Curr Pharm Biotechnol*, 1, 1-9.
- Grillo-Lopez, A. J., White, C. A., Varns, C., Shen, D., Wei, A., McClure, A. & Dallaire, B. K. (1999). Overview of the clinical development of rituximab: first monoclonal antibody approved for the treatment of lymphoma. *Semin Oncol*, 26, 66-73.
- Grimm, P. C., McKenna, R., Nickerson, P., Russell, M. E., Gough, J., Gospodarek, E., Liu, B., Jeffery, J. & Rush, D. N. (1999). Clinical rejection is distinguished from subclinical rejection by increased infiltration by a population of activated macrophages. *J Am Soc Nephrol*, 10, 1582-9.
- Grossman, W. J., Verbsky, J. W., Barchet, W., Colonna, M., Atkinson, J. P. & Ley, T. J. (2004). Human T regulatory cells can use the perforin pathway to cause autologous target cell death. *Immunity*, 21, 589-601.
- Grube, D. (2004). Constants and variables in immunohistochemistry. *Arch Histol Cytol*, 67, 115-34.
- Gupta, N., Raina, P. & Kumar, A. (2005). Laparoscopic donor nephrectomy. *J Minim Access Surg*, 1, 155-64.
- Hahn, D., Hodson, E. M., Hamiwka, L. A., Lee, V. W., Chapman, J. R., Craig, J. C. & Webster, A. C. (2019). Target of rapamycin inhibitors (TOR-I; sirolimus and everolimus) for primary immunosuppression in kidney transplant recipients. *Cochrane Database Syst Rev*, 12, CD004290.
- Halloran, P. F. & Hunsicker, L. G. (2001). Delayed graft function: state of the art, November 10-11, 2000. Summit meeting, Scottsdale, Arizona, USA. *Am J Transplant*, 1, 115-20.
- Hamel, K. M., Liarski, V. M. & Clark, M. R. (2012). Germinal center B-cells. *Autoimmunity*, 45, 333-47.
- Han, J. H., Akira, S., Calame, K., Beutler, B., Selsing, E. & Imanishi-Kari, T. (2007). Class switch recombination and somatic hypermutation in early mouse B cells are mediated by B cell and Toll-like receptors. *Immunity*, 27, 64-75.

- Han, M., Rogers, J. A., Lavingia, B. & Stastny, P. (2009). Peripheral blood B cells producing donor-specific HLA antibodies in vitro. *Hum Immunol*, 70, 29-34.
- Hardinger, K. L., Brennan, D. C. & Klein, C. L. (2013). Selection of induction therapy in kidney transplantation. *Transpl Int*, 26, 662-72.
- Hardy, R. R., Hayakawa, K., Haaijman, J. & Herzenberg, L. A. (1982). B-cell subpopulations identified by two-colour fluorescence analysis. *Nature*, 297, 589-91.
- Hart, A., Smith, J. M., Skeans, M. A., Gustafson, S. K., Stewart, D. E., Cherikh, W. S., Wainright, J. L., Boyle, G., Snyder, J. J., Kasiske, B. L. & Israni, A. K. (2016). OPTN/SRTR 2014 Annual Data Report Kidney. *Am J Transplant*, 16 Suppl 2, 11-46.
- Harty, J. T., Tvinnereim, A. R. & White, D. W. (2000). CD8+ T cell effector mechanisms in resistance to infection. *Annu Rev Immunol*, 18, 275-308.
- Hernandez-Fuentes, M. P., Baker, R. J. & Lechler, R. I. (1999). The alloresponse. *Rev Immunogenet*, 1, 282-96.
- Hill, P., Cross, N. B., Barnett, A. N., Palmer, S. C. & Webster, A. C. (2017). Polyclonal and monoclonal antibodies for induction therapy in kidney transplant recipients. *Cochrane Database Syst Rev*, 1, CD004759.
- Horikawa, M., Minard-Colin, V., Matsushita, T. & Tedder, T. F. (2011). Regulatory B cell production of IL-10 inhibits lymphoma depletion during CD20 immunotherapy in mice. *J Clin Invest*, 121, 4268-80.
- Hotchkiss, R. D. (1948). A microchemical reaction resulting in the staining of polysaccharide structures in fixed tissue preparations. *Arch Biochem*, 16, 131-41.
- Hsieh, C. L., Obara, H., Ogura, Y., Martinez, O. M. & Krams, S. M. (2002). NK cells and transplantation. *Transpl Immunol*, 9, 111-4.
- Huang, H., Benoist, C. & Mathis, D. (2010). Rituximab specifically depletes short-lived autoreactive plasma cells in a mouse model of inflammatory arthritis. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 107, 4658-63.
- Humar, A. & Matas, A. J. (2005). Surgical complications after kidney transplantation. *Semin Dial*, 18, 505-10.
- Ishida, H., Furusawa, M., Shimizu, T., Nozaki, T. & Tanabe, K. (2014). Influence of preoperative anti-HLA antibodies on short- and long-term graft survival in recipients with or without rituximab treatment. *Transpl Int*, 27, 371-82.
- Joosten, I., Baas, M. C., Kamburova, E. G., Van Den Hoogen, M. W., Koenen, H. J. & Hilbrands, L. B. (2014). Anti-B cell therapy with rituximab as induction therapy in renal transplantation. *Transpl Immunol*, 31, 207-9.
- Jung, D., Giallourakis, C., Mostoslavsky, R. & Alt, F. W. (2006). Mechanism and control of V(D)J recombination at the immunoglobulin heavy chain locus. *Annu Rev Immunol*, 24, 541-70.
- Jung, K. C., Park, C. G., Jeon, Y. K., Park, H. J., Ban, Y. L., Min, H. S., Kim, E. J., Kim, J. H., Kang, B. H., Park, S. P., Bae, Y., Yoon, I. H., Kim, Y. H., Lee, J. I., Kim, J. S., Shin, J. S., Yang, J., Kim, S. J., Rostlund, E., Muller, W. A. & Park, S. H. (2016). Correction: In situ induction of dendritic cell-based T cell tolerance in humanized mice and nonhuman primates. *J Exp Med*, 213, 643.
- Kahan, B. D. & Ponticelli, C. (2000). *Principles and Practice of Renal Transplantation*, 1, Martin Dunitz Ltd, London, 846l.
- Kamburova, E. G., Koenen, H. J., Boon, L., Hilbrands, L. B. & Joosten, I. (2012). In vitro effects of rituximab on the proliferation, activation and differentiation of human B cells. *Am J Transplant*, 12, 341-50.

- Kamburova, E. G., Koenen, H. J., Borgman, K. J., Ten Berge, I. J., Joosten, I. & Hilbrands, L. B. (2013). A single dose of rituximab does not deplete B cells in secondary lymphoid organs but alters phenotype and function. *Am J Transplant*, 13, 1503-11.
- Kamburova, E. G., Koenen, H. J., Van Den Hoogen, M. W., Baas, M. C., Joosten, I. & Hilbrands, L. B. (2014). Longitudinal analysis of T and B cell phenotype and function in renal transplant recipients with or without rituximab induction therapy. *PLoS One*, 9, e112658.
- Kamburova, E. G., Van Den Hoogen, M. W., Koenen, H. J., Baas, M. C., Hilbrands, L. B. & Joosten, I. (2015). Cytokine Release After Treatment With Rituximab in Renal Transplant Recipients. *Transplantation*, 99, 1907-11.
- Kaposztas, Z., Podder, H., Mauyyedi, S., Illoh, O., Kerman, R., Reyes, M., Pollard, V. & Kahan, B. D. (2009). Impact of rituximab therapy for treatment of acute humoral rejection. *Clin Transplant*, 23, 63-73.
- Kawai, T. & Akira, S. (2010). The role of pattern-recognition receptors in innate immunity: update on Toll-like receptors. *Nat Immunol*, 11, 373-84.
- Khan, A. R., Hams, E., Floudas, A., Sparwasser, T., Weaver, C. T. & Fallon, P. G. (2015). PD-L1hi B cells are critical regulators of humoral immunity. *Nat Commun*, 6, 5997.
- Kidney Disease: Improving Global Outcomes Transplant Work, G. (2009). KDIGO clinical practice guideline for the care of kidney transplant recipients. *Am J Transplant*, 9 Suppl 3, S1-155.
- Klinge, M. & Brodmann, D. (2017). *Einführung in die Nephrologie und Nierenersatzverfahren Für Pflegende, Medizinstudenten und Assistenzärzte, 1, Springer, Berlin, Heidelberg*.
- Koch, M., Joosten, S. A., Mengel, M., Van Kooten, C., Paul, L. C. & Nashan, B. (2005). Adoptive transfer of primed CD4+ T-lymphocytes induces pattern of chronic allograft nephropathy in a nude rat model. *Transplantation*, 79, 753-61.
- Kranz, B., Kelsch, R., Kuwertz-Broking, E., Brocker, V., Wolters, H. H. & Konrad, M. (2011). Acute antibody-mediated rejection in paediatric renal transplant recipients. *Pediatr Nephrol*, 26, 1149-56.
- Kreisel, D., Krupnick, A. S., Gelman, A. E., Engels, F. H., Popma, S. H., Krasinskas, A. M., Balsara, K. R., Szeto, W. Y., Turka, L. A. & Rosengard, B. R. (2002). Non-hematopoietic allograft cells directly activate CD8+ T cells and trigger acute rejection: an alternative mechanism of allorecognition. *Nat Med*, 8, 233-9.
- Kronbichler, A., Windpessl, M., Pieringer, H. & Jayne, D. R. W. (2017). Rituximab for immunologic renal disease: What the nephrologist needs to know. *Autoimmun Rev*, 16, 633-643.
- Kunes, J., Kohoutova, M. & Zicha, J. (1996). Major histocompatibility complex in the rat and blood pressure regulation. *Am J Hypertens*, 9, 675-80.
- Kurts, C., Panzer, U., Anders, H. J. & Rees, A. J. (2013). The immune system and kidney disease: basic concepts and clinical implications. *Nat Rev Immunol*, 13, 738-53.
- Kwan, D. K. & Norman, A. (1974). Letter: Identification of two populations of human lymphocytes. *Acta Cytol*, 18, 189-91.
- Leandro, M. J. (2013). B-cell subpopulations in humans and their differential susceptibility to depletion with anti-CD20 monoclonal antibodies. *Arthritis Res Ther*, 15 Suppl 1, S3.
- Leandro, M. J., Cambridge, G., Ehrenstein, M. R. & Edwards, J. C. (2006). Reconstitution of peripheral blood B cells after depletion with rituximab in patients with rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum*, 54, 613-20.
- Lefaucheur, C., Nochy, D., Andrade, J., Verine, J., Gautreau, C., Charron, D., Hill, G. S., Glotz, D. & Suberbielle-Boissel, C. (2009). Comparison of combination

Plasmapheresis/IVIg/anti-CD20 versus high-dose IVIg in the treatment of antibody-mediated rejection. *Am J Transplant*, 9, 1099-107.

Lemke, A., Noriega, M., Roske, A. M., Kemper, M. J., Nashan, B., Falk, C. S. & Koch, M. (2015). Rat renal transplant model for mixed acute humoral and cellular rejection: Weak correlation of serum cytokines/chemokines with intragraft changes. *Transpl Immunol*, 33, 95-102.

Lenschow, D. J., Walunas, T. L. & Bluestone, J. A. (1996). CD28/B7 system of T cell costimulation. *Annu Rev Immunol*, 14, 233-58.

Li, M. O., Sanjabi, S. & Flavell, R. A. (2006). Transforming growth factor-beta controls development, homeostasis, and tolerance of T cells by regulatory T cell-dependent and -independent mechanisms. *Immunity*, 25, 455-71.

Liu, Y. J., Malisan, F., De Bouteiller, O., Guret, C., Lebecque, S., Banchereau, J., Mills, F. C., Max, E. E. & Martinez-Valdez, H. (1996). Within germinal centers, isotype switching of immunoglobulin genes occurs after the onset of somatic mutation. *Immunity*, 4, 241-50.

Loder, F., Mutschler, B., Ray, R. J., Paige, C. J., Sideras, P., Torres, R., Lamers, M. C. & Carsetti, R. (1999). B cell development in the spleen takes place in discrete steps and is determined by the quality of B cell receptor-derived signals. *J Exp Med*, 190, 75-89.

Lozano, R., Naghavi, M., Foreman, K., Lim, S., Shibuya, K., Aboyans, V., Abraham, J., Adair, T., Aggarwal, R., Ahn, S. Y., Alvarado, M., Anderson, H. R., Anderson, L. M., Andrews, K. G., Atkinson, C., Baddour, L. M., Barker-Collo, S., Bartels, D. H., Bell, M. L., Benjamin, E. J., et al. (2012). Global and regional mortality from 235 causes of death for 20 age groups in 1990 and 2010: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2010. *Lancet*, 380, 2095-128.

Macklin, P. S., Morris, P. J. & Knight, S. R. (2017). A systematic review of the use of rituximab for the treatment of antibody-mediated renal transplant rejection. *Transplant Rev (Orlando)*, 31, 87-95.

Maclennan, I. C., Gulbranson-Judge, A., Toellner, K. M., Casamayor-Palleja, M., Chan, E., Sze, D. M., Luther, S. A. & Orbea, H. A. (1997). The changing preference of T and B cells for partners as T-dependent antibody responses develop. *Immunol Rev*, 156, 53-66.

Maclennan, I. C., Toellner, K. M., Cunningham, A. F., Serre, K., Sze, D. M., Zuniga, E., Cook, M. C. & Vinuesa, C. G. (2003). Extrafollicular antibody responses. *Immunol Rev*, 194, 8-18.

Majoor, G. D. & Van Breda Vriesman, P. J. (1983). Role of antibody in rat renal allograft rejection. II. Failure to enhance renal allografts by sensitization to donor class I antigens presented by donor strain erythrocytes. *Transplantation*, 35, 121-6.

Makkeyah, Y. M., Al-Otaibi, T., Nampoory, N., Nair, P., Al-Mousawi, M., Samhan, M., Gawish, A., Said, T., Halim, M. A. & Gheith, O. (2017). Annual Data for Kidney Transplant Services in Kuwait (2015). *Exp Clin Transplant*, 15, 28-31.

Masson, P., Henderson, L., Chapman, J. R., Craig, J. C. & Webster, A. C. (2014). Belatacept for kidney transplant recipients. *Cochrane Database Syst Rev*, CD010699.

Matas, A. (1994). Chronic rejection in renal transplant recipients--risk factors and correlates. *Clin Transplant*, 8, 332-5.

Matsuda, S. & Koyasu, S. (2000). Mechanisms of action of cyclosporine. *Immunopharmacology*, 47, 119-25.

Mattarollo, S. R., Yong, M., Gosmann, C., Choyce, A., Chan, D., Leggatt, G. R. & Frazer, I. H. (2011). NKT cells inhibit antigen-specific effector CD8 T cell induction to skin viral proteins. *J Immunol*, 187, 1601-8.

- Mauyyedi, S., Crespo, M., Collins, A. B., Schneeberger, E. E., Pascual, M. A., Saidman, S. L., Tolckoff-Rubin, N. E., Williams, W. W., Delmonico, F. L., Cosimi, A. B. & Colvin, R. B. (2002). Acute humoral rejection in kidney transplantation: II. Morphology, immunopathology, and pathologic classification. *J Am Soc Nephrol*, 13, 779-87.
- Mauri, C. & Bosma, A. (2012). Immune regulatory function of B cells. *Annu Rev Immunol*, 30, 221-41.
- Mauri, C. & Menon, M. (2015). The expanding family of regulatory B cells. *Int Immunol*, 27, 479-86.
- Mayer, G. & Persijn, G. G. (2006). Eurotransplant kidney allocation system (ETKAS): rationale and implementation. *Nephrol Dial Transplant*, 21, 2-3.
- Medzhitov, R. & Janeway, C. A., Jr. (1997). Innate immunity: impact on the adaptive immune response. *Curr Opin Immunol*, 9, 4-9.
- Meguid El Nahas, A. & Bello, A. K. (2005). Chronic kidney disease: the global challenge. *Lancet*, 365, 331-40.
- Meier-Kriesche, H. U. & Schold, J. D. (2005). The impact of pretransplant dialysis on outcomes in renal transplantation. *Semin Dial*, 18, 499-504.
- Melchers, F., Ten Boekel, E., Seidl, T., Kong, X. C., Yamagami, T., Onishi, K., Shimizu, T., Rolink, A. G. & Andersson, J. (2000). Repertoire selection by pre-B-cell receptors and B-cell receptors, and genetic control of B-cell development from immature to mature B cells. *Immunol Rev*, 175, 33-46.
- Meyer-Bahlburg, A., Andrews, S. F., Yu, K. O., Porcelli, S. A. & Rawlings, D. J. (2008). Characterization of a late transitional B cell population highly sensitive to BAFF-mediated homeostatic proliferation. *J Exp Med*, 205, 155-68.
- Modigliani, Y., Bandeira, A. & Coutinho, A. (1996). A model for developmentally acquired thymus-dependent tolerance to central and peripheral antigens. *Immunol Rev*, 149, 155-20.
- Mosmann, T. R. & Coffman, R. L. (1989). TH1 and TH2 cells: different patterns of lymphokine secretion lead to different functional properties. *Annu Rev Immunol*, 7, 145-73.
- Mosmann, T. R., Li, L. & Sad, S. (1997). Functions of CD8 T-cell subsets secreting different cytokine patterns. *Semin Immunol*, 9, 87-92.
- Murphy, K., Travers, P. & Walport, M. (2009). *Janeway Immunologie*, 7, Springer Spektrum London, 1093l.
- Murray, J. E., Merrill, J. P. & Harrison, J. H. (2001). Renal homotransplantation in identical twins. 1955. *J Am Soc Nephrol*, 12, 201-4.
- Nagasawa, T. (2006). Microenvironmental niches in the bone marrow required for B-cell development. *Nat Rev Immunol*, 6, 107-16.
- Nankivell, B. J. & Kuypers, D. R. (2011). Diagnosis and prevention of chronic kidney allograft loss. *Lancet*, 378, 1428-37.
- Nazari, B., Amirzargar, A., Nikbin, B., Nafar, M., Ahmadpour, P., Einollahi, B., Lesan Pezeshki, M., Khatami, S. M., Ansari-pour, B., Nikuinejad, H., Mohamadi, F., Mahmoudi, M., Soltani, S. & Nicknam, M. H. (2013). Comparison of the Th1, IFN-gamma secreting cells and FoxP3 expression between patients with stable graft function and acute rejection post kidney transplantation. *Iran J Allergy Asthma Immunol*, 12, 262-8.
- Nemazee, D. (2000). Receptor selection in B and T lymphocytes. *Annu Rev Immunol*, 18, 19-51.
- Noll, S. & Schaub-Kuhnen, S. (2000). *Praxis der Immunhistochemie*, 1, Urban & Fischer Verlag München, Jena,

- O'Rourke, L., Tooze, R. & Fearon, D. T. (1997). Co-receptors of B lymphocytes. *Curr Opin Immunol*, 9, 324-9.
- Oblak, T., Lindic, J., Gubensek, J., Kveder, R., Ales Rigler, A., Skoberne, A., Veceric Haler, Z., Borstnar, S., Avgustin, N., Ponikvar, R., Mlinsek, G., Ferluga, D., Kojc, N., Godnov, U. & Kovac, D. (2017). Treatment of antibody-mediated rejection of kidney grafts with bortezomib and/or rituximab compared to standard regimen: experience of Slovene National Center. *Clin Nephrol*, 88, 91-96.
- Olschewski, P., Seehofer, D., Ollinger, R. & Pratschke, J. (2016). [Vascular reconstruction in visceral transplantation surgery]. *Chirurg*, 87, 114-8.
- Ortiz, A., Covic, A., Fliser, D., Fouque, D., Goldsmith, D., Kanbay, M., Mallamaci, F., Massy, Z. A., Rossignol, P., Vanholder, R., Wiecek, A., Zoccali, C., London, G. M. & Board of The, E.-M. W. G. O. E. R. a. E. (2014). Epidemiology, contributors to, and clinical trials of mortality risk in chronic kidney failure. *Lancet*, 383, 1831-43.
- Otsuka, M., Ambiru, S., Uryuhara, K., Herman, P., Talpe, S., Dehoux, J. P., Jamar, F. & Gianello, P. (2005). Early biological and immune response to semi-identical liver or kidney allograft in miniature swine. *Transpl Int*, 18, 78-88.
- Palanichamy, A., Barnard, J., Zheng, B., Owen, T., Quach, T., Wei, C., Looney, R. J., Sanz, I. & Anolik, J. H. (2009). Novel human transitional B cell populations revealed by B cell depletion therapy. *J Immunol*, 182, 5982-93.
- Pandiyani, P., Zheng, L., Ishihara, S., Reed, J. & Lenardo, M. J. (2007). CD4+CD25+Foxp3+ regulatory T cells induce cytokine deprivation-mediated apoptosis of effector CD4+ T cells. *Nat Immunol*, 8, 1353-62.
- Pape, K. A., Kouskoff, V., Nemazee, D., Tang, H. L., Cyster, J. G., Tze, L. E., Hippen, K. L., Behrens, T. W. & Jenkins, M. K. (2003). Visualization of the genesis and fate of isotype-switched B cells during a primary immune response. *J Exp Med*, 197, 1677-87.
- Pascual, M., Theruvath, T., Kawai, T., Tolkoff-Rubin, N. & Cosimi, A. B. (2002). Strategies to improve long-term outcomes after renal transplantation. *N Engl J Med*, 346, 580-90.
- Persijn, G. G. (2006). Allocation of organs, particularly kidneys, within Eurotransplant. *Hum Immunol*, 67, 419-23.
- Poehnert, D., Broecker, V., Mengel, M., Nashan, B. & Koch, M. (2010). Induction of chronic renal allograft dysfunction in a rat model with complete and exclusive MHC incompatibility. *Transpl Immunol*, 22, 137-43.
- Pratschke, J., Stauch, D. & Kotsch, K. (2009). Role of NK and NKT cells in solid organ transplantation. *Transpl Int*, 22, 859-68.
- Rafei, M., Hsieh, J., Zehntner, S., Li, M., Forner, K., Birman, E., Boivin, M. N., Young, Y. K., Perreault, C. & Galipeau, J. (2009). A granulocyte-macrophage colony-stimulating factor and interleukin-15 fusokine induces a regulatory B cell population with immune suppressive properties. *Nat Med*, 15, 1038-45.
- Ramos, E. J., Pollinger, H. S., Stegall, M. D., Gloor, J. M., Dogan, A. & Grande, J. P. (2007). The effect of desensitization protocols on human splenic B-cell populations in vivo. *Am J Transplant*, 7, 402-7.
- Ramwadhoebe, T. H., Van Baarsen, L. G. M., Boumans, M. J. H., Bruijnen, S. T. G., Safy, M., Berger, F. H., Semmelink, J. F., Van Der Laken, C. J., Gerlag, D. M., Thurlings, R. M. & Tak, P. P. (2019). Effect of rituximab treatment on T and B cell subsets in lymph node biopsies of patients with rheumatoid arthritis. *Rheumatology (Oxford)*, 58, 1075-1085.
- Reff, M. E., Carner, K., Chambers, K. S., Chinn, P. C., Leonard, J. E., Raab, R., Newman, R. A., Hanna, N. & Anderson, D. R. (1994). Depletion of B cells in vivo by a chimeric mouse human monoclonal antibody to CD20. *Blood*, 83, 435-45.

Rehnberg, M., Amu, S., Tarkowski, A., Bokarewa, M. I. & Brisslert, M. (2009). Short- and long-term effects of anti-CD20 treatment on B cell ontogeny in bone marrow of patients with rheumatoid arthritis. *Arthritis Res Ther*, 11, R123.

Roche. (2020). *MabThera® i.v. Fachinformation* [Online im Internet]. URL: <https://www.google.com/url?sa=t&rct=j&q=&esrc=s&source=web&cd=&cad=rja&uact=8&ved=2ahUKEwittsfKr9bpAhXnwqYKHV57AXIQFjABegQIBhAB&url=https%3A%2F%2Fwww.roche.de%2Fdok%2FMabThera-reg-100-mg500-mg-fachinfo-0-na-attach.pdf&usq=AOvVaw3g8myfSW48TmjyuLesXaNo> [Stand: 28.05.2020, 12:45 Uhr].

Roll, P. & Tony, H. P. (2009). [B-cell-targeted therapies in the treatment of autoimmune diseases]. *Zeitschrift für Rheumatologie*, 68, 255-59.

Rosenberg, N. & Kincade, P. W. (1994). B-lineage differentiation in normal and transformed cells and the microenvironment that supports it. *Curr Opin Immunol*, 6, 203-11.

Roufosse, C., Simmonds, N., Groningen, M. C., Haas, M., Henriksen, K. J., Horsfield, C., Loupy, A., Mengel, M., Perkowska-Ptasinska, A., Rabant, M., Racusen, L. C., Solez, K. & Becker, J. U. (2018). A 2018 Reference Guide to the Banff Classification of Renal Allograft Pathology. *Transplantation*, 102, 1795-1814.

Rouziere, A. S., Kneitz, C., Palanichamy, A., Dorner, T. & Tony, H. P. (2005). Regeneration of the immunoglobulin heavy-chain repertoire after transient B-cell depletion with an anti-CD20 antibody. *Arthritis Res Ther*, 7, R714-24.

Sack, U., Tárnok, A. & Rothe, G. 2007. *Zelluläre Diagnostik: Grundlagen, Methoden und klinische Anwendungen der Durchflusszytometrie*. 1 ed. Basel: S. Karger.

Sakaguchi, S. (2011). Regulatory T cells: history and perspective. *Methods Mol Biol*, 707, 3-17.

Sakaguchi, S., Sakaguchi, N., Asano, M., Itoh, M. & Toda, M. (1995). Immunologic self-tolerance maintained by activated T cells expressing IL-2 receptor alpha-chains (CD25). Breakdown of a single mechanism of self-tolerance causes various autoimmune diseases. *J Immunol*, 155, 1151-64.

Sakaguchi, S., Yamaguchi, T., Nomura, T. & Ono, M. (2008). Regulatory T cells and immune tolerance. *Cell*, 133, 775-87.

Salama, A. D. & Pusey, C. D. (2006). Drug insight: rituximab in renal disease and transplantation. *Nat Clin Pract Nephrol*, 2, 221-30.

Sanderson, R. D., Lallor, P. & Bernfield, M. (1989). B lymphocytes express and lose syndecan at specific stages of differentiation. *Cell Regul*, 1, 27-35.

Sautenet, B., Blancho, G., Buchler, M., Morelon, E., Toupance, O., Barrou, B., Ducloux, D., Chatelet, V., Moulin, B., Freguin, C., Hazzan, M., Lang, P., Legendre, C., Merville, P., Mourad, G., Mousson, C., Pouteil-Noble, C., Purgus, R., Rerolle, J. P., Sayegh, J., Westeel, P. F., Zaoui, P., Boivin, H., Le Gouge, A. & Lebranchu, Y. (2016). One-year Results of the Effects of Rituximab on Acute Antibody-Mediated Rejection in Renal Transplantation: RITUX ERAH, a Multicenter Double-blind Randomized Placebo-controlled Trial. *Transplantation*, 100, 391-9.

Schärer, L. (2016). Histologische Techniken. *In: Histopathologie der Haut*. Cerroni, L., Garbe, C., Metze, D., Kutzner, H. & Kerl, H. (eds.) 2 ed. Springer, Berlin Heidelberg, 3-131.

Schioppo, T. & Ingegnoli, F. (2017). Current perspective on rituximab in rheumatic diseases. *Drug Des Devel Ther*, 11, 2891-2904.

Schneuzer, C. & Kreft, B. (2019). Kapitel 9 - Niere. *In: Klinikleitfaden Innere Medizin Braun, J. & Dormann, A. J. (eds.) 14 ed. Urban & Fischer, Munich, 379-4131.*

- Schroder, C., Azimzadeh, A. M., Wu, G., Price, J. O., Atkinson, J. B. & Pierson, R. N. (2003). Anti-CD20 treatment depletes B-cells in blood and lymphatic tissue of cynomolgus monkeys. *Transpl Immunol*, 12, 19-28.
- Segoloni, G. P. & Quaglia, M. (2006). New immunosuppressive drugs for prevention and treatment of rejection in renal transplant. *J Nephrol*, 19, 578-86.
- Slifka, M. K., Antia, R., Whitmire, J. K. & Ahmed, R. (1998). Humoral immunity due to long-lived plasma cells. *Immunity*, 8, 363-72.
- Smeekens, S. P., Van Den Hoogen, M. W., Kamburova, E. G., Van De Veerdonk, F. L., Joosten, I., Koenen, H. J., Netea, M. G., Hilbrands, L. B. & Joosten, L. A. (2013). The effects of in vivo B-cell depleting therapy on ex-vivo cytokine production. *Transpl Immunol*, 28, 183-8.
- Spieker, J. (2015). *Relevanz von regulatorischen B-Lymphozyten in der akuten Transplantatabstoßung in einem MHC-inkompatiblen Rattentransplantationsmodell*. Masters degree, Hamburg University of Applied Sciences
- Sprich, C. (2006). *Optimierung von Immunhistochemie-Protokollen an Tissue Microarrays Erfahrungen mit 70 verschiedenen Antikörpern* Doctor of Medicine, Albert-Ludwigs-Universität.
- Steinmetz, O. M., Lange-Husken, F., Turner, J. E., Vernauer, A., Helmchen, U., Stahl, R. A., Thaiss, F. & Panzer, U. (2007). Rituximab removes intrarenal B cell clusters in patients with renal vascular allograft rejection. *Transplantation*, 84, 842-50.
- Stephens, R., Horton, R., Humphray, S., Rowen, L., Trowsdale, J. & Beck, S. (1999). Gene organisation, sequence variation and isochore structure at the centromeric boundary of the human MHC. *J Mol Biol*, 291, 789-99.
- Sun, Q., Liu, Z. H., Cheng, Z., Chen, J., Ji, S., Zeng, C. & Li, L. S. (2007). Treatment of early mixed cellular and humoral renal allograft rejection with tacrolimus and mycophenolate mofetil. *Kidney Int*, 71, 24-30.
- Sun, Q., Liu, Z. H., Yin, G., Chen, H., Chen, J., Ji, S. & Li, L. S. (2006). Tacrolimus combined with mycophenolate mofetil can effectively reverse C4d-positive steroid-resistant acute rejection in Chinese renal allograft recipients. *Nephrol Dial Transplant*, 21, 510-7.
- Surendra, M., Raju, S. B., Raju, N., Chandragiri, S., Mukku, K. K. & Uppin, M. S. (2016). Rituximab in the treatment of refractory late acute antibody-mediated rejection: Our initial experience. *Indian J Nephrol*, 26, 317-321.
- Suthanthiran, M. & Strom, T. B. (1994). Renal transplantation. *N Engl J Med*, 331, 365-76.
- Suzuki, Y., Orellana, M. A., Schreiber, R. D. & Remington, J. S. (1988). Interferon-gamma: the major mediator of resistance against *Toxoplasma gondii*. *Science*, 240, 516-8.
- Tedder, T. F., Forsgren, A., Boyd, A. W., Nadler, L. M. & Schlossman, S. F. (1986). Antibodies reactive with the B1 molecule inhibit cell cycle progression but not activation of human B lymphocytes. *Eur J Immunol*, 16, 881-7.
- Teh, H. S., Kisielow, P., Scott, B., Kishi, H., Uematsu, Y., Bluthmann, H. & Von Boehmer, H. (1988). Thymic major histocompatibility complex antigens and the alpha beta T-cell receptor determine the CD4/CD8 phenotype of T cells. *Nature*, 335, 229-33.
- Thaunat, O., Field, A. C., Dai, J., Louedec, L., Patey, N., Bloch, M. F., Mandet, C., Belair, M. F., Bruneval, P., Meilhac, O., Bellon, B., Joly, E., Michel, J. B. & Nicoletti, A. (2005). Lymphoid neogenesis in chronic rejection: evidence for a local humoral alloimmune response. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 102, 14723-8.
- Thaunat, O., Patey, N., Gautreau, C., Lechaton, S., Fremeaux-Bacchi, V., Dieu-Nosjean, M. C., Cassuto-Viguiet, E., Legendre, C., Delahousse, M., Lang, P., Michel, J. B. & Nicoletti,

- A. (2008). B cell survival in intragraft tertiary lymphoid organs after rituximab therapy. *Transplantation*, 85, 1648-53.
- Tyden, G., Ekberg, H., Tufveson, G. & Mjornstedt, L. (2012). A randomized, double-blind, placebo-controlled study of single dose rituximab as induction in renal transplantation: a 3-year follow-up. *Transplantation*, 94, e21-2.
- Ueda, Y., Liao, D., Yang, K., Patel, A. & Kelsoe, G. (2007). T-independent activation-induced cytidine deaminase expression, class-switch recombination, and antibody production by immature/transitional 1 B cells. *J Immunol*, 178, 3593-601.
- Van Den Hoogen, M. W., Kamburova, E. G., Baas, M. C., Steenbergen, E. J., Florquin, S., Hij, M. K., Joosten, I. & Hilbrands, L. B. (2015). Rituximab as induction therapy after renal transplantation: a randomized, double-blind, placebo-controlled study of efficacy and safety. *Am J Transplant*, 15, 407-16.
- Van Der Meide, P. H., Joosten, A. M., Hermans, P., Kloosterman, T. C., Olsson, T. & De Labie, M. C. (1991). Assessment of the inhibitory effect of immunosuppressive agents on rat T cell interferon-gamma production using an ELISPOT assay. *J Immunol Methods*, 144, 203-13.
- Varin, M. M., Le Pottier, L., Youinou, P., Saulep, D., Mackay, F. & Pers, J. O. (2010). B-cell tolerance breakdown in Sjogren's syndrome: focus on BAFF. *Autoimmun Rev*, 9, 604-8.
- Vignali, D. A., Collison, L. W. & Workman, C. J. (2008). How regulatory T cells work. *Nat Rev Immunol*, 8, 523-32.
- Vivier, E., Raulet, D. H., Moretta, A., Caligiuri, M. A., Zitvogel, L., Lanier, L. L., Yokoyama, W. M. & Ugolini, S. (2011). Innate or adaptive immunity? The example of natural killer cells. *Science*, 331, 44-9.
- Waiser, J., Budde, K., Schutz, M., Liefeldt, L., Rudolph, B., Schonemann, C., Neumayer, H. H. & Lachmann, N. (2012). Comparison between bortezomib and rituximab in the treatment of antibody-mediated renal allograft rejection. *Nephrol Dial Transplant*, 27, 1246-51.
- Wallgren, A. C., Alder, J., Andersson, B., Karlsson-Parra, A. & Bäcker, A. E. (2006). The Direct Pathway of Human T-Cell Allorecognition is not Tolerized by Stimulation with Allogeneic Peripheral Blood Mononuclear Cells Irradiated with High-Dose Ultraviolet B. *Scandinavian Journal of Immunology*, 63, 90-96.
- Wallin, E. F., Jolly, E. C., Suchanek, O., Bradley, J. A., Espeli, M., Jayne, D. R., Linterman, M. A. & Smith, K. G. (2014). Human T-follicular helper and T-follicular regulatory cell maintenance is independent of germinal centers. *Blood*, 124, 2666-74.
- Wang, J. H., Skeans, M. A. & Israni, A. K. (2016). Current Status of Kidney Transplant Outcomes: Dying to Survive. *Adv Chronic Kidney Dis*, 23, 281-286.
- Wang, N. S., Mcheyzer-Williams, L. J., Okitsu, S. L., Burris, T. P., Reiner, S. L. & Mcheyzer-Williams, M. G. (2012). Divergent transcriptional programming of class-specific B cell memory by T-bet and RORalpha. *Nat Immunol*, 13, 604-11.
- Weaver, C. T., Harrington, L. E., Mangan, P. R., Gavrieli, M. & Murphy, K. M. (2006). Th17: an effector CD4 T cell lineage with regulatory T cell ties. *Immunity*, 24, 677-88.
- Weimer, R., Daniel, V., Pomer, S. & Opelz, G. (1989). B lymphocyte response as an indicator of acute renal transplant rejection. II. Pretransplant and posttransplant B cell responses of m mitogen and donor cell-stimulated cultures. *Transplantation*, 48, 572-5.
- Wetmore, J. B. & Collins, A. J. (2016). Global challenges posed by the growth of end-stage renal disease. *Renal Replacement Therapy*.
- Wherry, E. J. & Ahmed, R. (2004). Memory CD8 T-cell differentiation during viral infection. *J Virol*, 78, 5535-45.

- Wolfe, R. A., Ashby, V. B., Milford, E. L., Ojo, A. O., Ettenger, R. E., Agodoa, L. Y., Held, P. J. & Port, F. K. (1999). Comparison of mortality in all patients on dialysis, patients on dialysis awaiting transplantation, and recipients of a first cadaveric transplant. *N Engl J Med*, 341, 1725-30.
- Wood, K. J. & Goto, R. (2012). Mechanisms of rejection: current perspectives. *Transplantation*, 93, 1-10.
- Wu, P., Jin, J., Everly, M. J., Lin, C., Terasaki, P. I. & Chen, J. (2013). Impact of alloantibody strength in crossmatch negative DSA positive kidney transplantation. *Clin Biochem*, 46, 1389-93.
- Wu, Y. C., Kipling, D., Leong, H. S., Martin, V., Ademokun, A. A. & Dunn-Walters, D. K. (2010). High-throughput immunoglobulin repertoire analysis distinguishes between human IgM memory and switched memory B-cell populations. *Blood*, 116, 1070-8.
- Xiang, Y., Peng, J., Tai, N., Hu, C., Zhou, Z., Wong, F. S. & Wen, L. (2012). The dual effects of B cell depletion on antigen-specific T cells in BDC2.5NOD mice. *J Immunol*, 188, 4747-58.
- Xu, D., Staedman, A. & Zhang, L. (2013). CD20 antibody primes B lymphocytes for type I interferon production. *PLoS One*, 8, e67900.
- Xu, X., Shi, B., Cai, M., Han, Y., Wang, Q., Xu, L., Xiao, L. & Zhou, W. (2008). A retrospective study of plasma cell infiltrates in explanted renal allografts. *Transplant Proc*, 40, 1366-70.
- Xu, Z., Zan, H., Pone, E. J., Mai, T. & Casali, P. (2012). Immunoglobulin class-switch DNA recombination: induction, targeting and beyond. *Nat Rev Immunol*, 12, 517-31.
- Yang, S. H., Jin, J. Z., Lee, S. H., Park, H., Kim, C. H., Lee, D. S., Kim, S., Chung, N. H. & Kim, Y. S. (2007). Role of NKT cells in allogeneic islet graft survival. *Clin Immunol*, 124, 258-66.
- Zhang, Y., Dodd, S. J., Hendrich, K. S., Williams, M. & Ho, C. (2000). Magnetic resonance imaging detection of rat renal transplant rejection by monitoring macrophage infiltration. *Kidney Int*, 58, 1300-10.
- Zhu, J. & Paul, W. E. (2010). Heterogeneity and plasticity of T helper cells. *Cell Res*, 20, 4-12.

9 Anhang

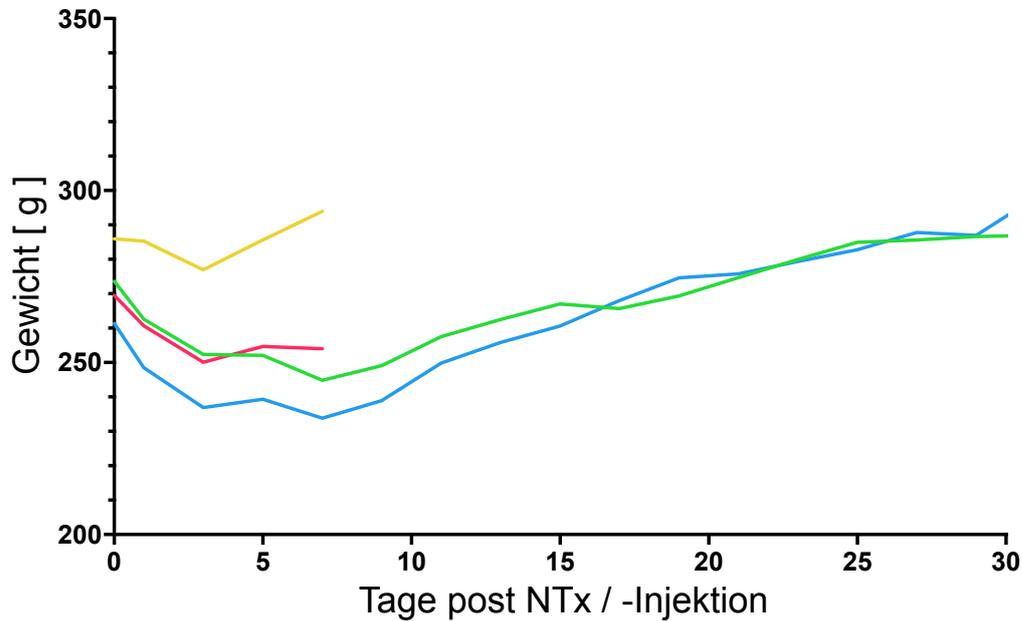
Anhang 1: Belastungskriterien / Abbruchkriterien

Beobachtung	Punktwertung ¹
I Körpergewicht bezogen auf Ausgangsgewicht [g] bezogen auf Kontrollgruppe [x] <ul style="list-style-type: none"> - unbeeinflusst oder Anstieg - Reduktion > 10 % - Reduktion > 20 % 	0 10 20
II Allgemeinzustand <ul style="list-style-type: none"> - Fell glatt, glänzend, anliegend; Körperöffnungen sauber - Fell stumpf, gestäubt; Augen trüb - verklebte oder feuchte Körperöffnungen; unnormale Haltung; hoher Muskeltonus; Dehydratation - Krämpfe; Lähmungen; Atemgeräusche; Tier fühlt sich kalt an 	0 5 10 20
III Spontanverhalten <ul style="list-style-type: none"> - normales Verhalten (Schlafen, Reaktion auf Anblasen und Berührung, Neugier, Sozialkontakte) - ungewöhnliches Verhalten, eingeschränkte Motorik oder Hyperkinetik - Isolation; Schmerzäußerungen; Apathie; ausgeprägte Hyperkinetik bzw. Stereotypien; Koordinationsstörungen - Automutilation 	0 5 10 20
IV Versuchsspezifische Kriterien <ul style="list-style-type: none"> - Kein Urin - Kein Kot >48h - Platzbauch - Schwellung des Auges (Hämatom) - Kreatinin 1x kontrolliert >5mg/dl 	20 20 20 10 20
Bewertung, Maßnahmen <ul style="list-style-type: none"> - keine Belastung - geringe Belastung: sorgfältig weiter beobachten (1x tägl), evtl unterstützende Maßnahmen (z.B. Wärmezufuhr, Spezialfutter) - mittelgradige Belastung: ggf. medizinische Versorgung einleiten (Analgesie, Antibiotikum), längerandauernd als 72 h gilt als hochgradige Belastung - hochgradige Belastung: Tierschutzbeauftragten konsultieren; tierärztliche Versorgung einleiten; ggf. Tier einschläfern 	Punktsumme 0 5-9 10-19 20 oder höher

¹ Punktzahl (0/5/10/20) wird pro Zeile 1x vergeben, sobald ein Kriterium erfüllt ist. Auch bei mehreren positiven Befunden pro Zeile kommt es zu keiner Addition der Punkte pro Zeile.

Anhang 2: Gewicht der Versuchstiere über den Versuchsverlauf von 4 Wochen.

Grün: ‚allo NTx + NaCl‘, blau: ‚allo NTx + Anti-CD20‘, gelb: ‚LEW-Normaltier + Anti-CD20‘, rot: ‚LEW-Normaltiere‘. Abk.: NTx = Nierentransplantation, allo = allogene.



Anhang 3: Durchschnittliche Kreatinin-Werte der Versuchsgruppen zu verschiedenen Zeitpunkten.

Abk.: allo = allogene, d = Tag.

Gruppe	Prä OP	d7 +/- 1	d14 +/- 1	d20 +/- 1	d30 +/- 1
Allo NTx d30 + NaCl	< 0,5	< 0,5	< 0,5	< 0,5	< 0,5
Allo NTx d14 + NaCl	< 0,5	< 0,5	0,56		
Allo NTx d30 + Anti-CD20	< 0,5	< 0,5	< 0,5	< 0,5	< 0,5
Allo NTx d14 + Anti-CD20	< 0,5	< 0,5	< 0,5		
LEW-Normaltier + Anti-CD20	< 0,5	< 0,5			

Anhang 4: Lymphozytenzahlen (CD45⁺) im peripheren Blut in % und Mrd / l.

Abk.: n = Anzahl, \bar{x} = Mittelwert, allo = allogene, NTx = Nierentransplantation.

Zeitpunkt	Einheit	Lymphozytenzahlen \bar{x}				p-Wert
		n	Allo NTx + NaCl	n	Allo NTx + Anti-CD20	
Prä NTx	[%]	8	89,25	11	90,73	0,1700
	[Mrd / l]	8	8,66	11	8,85	0,7803
Post NTx Woche 1	[%]	8	54,63	11	58,18	0,3725
	[Mrd / l]	8	14,85	11	15,52	0,6734
Post NTx Woche 2	[%]	8	53,13	11	49,73	0,3164
	[Mrd / l]	8	9,61	11	7,61	0,0571

Anhang 5: T-Zellen gesamt (CD3⁺) im peripheren Blut in % und Mrd / l.

Abk.: n = Anzahl, \bar{x} = Mittelwert, allo = allogene, NTx = Nierentransplantation.

Zeitpunkt	Einheit	T-Zellzahlen \bar{x}				p-Wert
		n	Allo NTx + NaCl	n	Allo NTx + Anti-CD20	
Prä NTx	[%]	8	65,43	11	66,34	0,5138
	[Mrd / l]	8	5,69	11	5,87	0,6967
post NTx Woche 1	[%]	8	55,46	11	56,82	0,6673
	[Mrd / l]	8	8,11	11	8,7	0,4337
post NTx Woche 2	[%]	8	60,34	11	75,36	<0,0001
	[Mrd / l]	8	5,78	11	5,79	0,9840

Anhang 6: T-Helfer-Zellen (CD3⁺ CD4⁺) im peripheren Blut in % und Mrd / l.

Abk.: n = Anzahl, \bar{x} = Mittelwert, allo = allogene, NTx = Nierentransplantation.

Zeitpunkt	Einheit	T-Helfer-Zellzahlen \bar{x}				p-Wert
		n	Allo NTx + NaCl	n	Allo NTx + Anti-CD20	
Prä NTx	[%]	8	49,31	11	50,55	0,3307
	[Mrd / l]	8	4,28	11	4,46	0,6174
post NTx Woche 1	[%]	7	35,49	11	38,15	0,4227
	[Mrd / l]	7	5,4	11	5,82	0,4574
post NTx Woche 2	[%]	8	44,78	10	55,01	<0,0001
	[Mrd / l]	8	4,31	10	4,1	0,723

Anhang 7: Zytotoxische T-Zellen (CD3⁺ CD8⁺) im peripheren Blut in % und Mrd / l.

Abk.: n = Anzahl, \bar{x} = Mittelwert, allo = allogene, NTx = Nierentransplantation.

Zeitpunkt	Einheit	Zytotoxische T-Zellzahlen \bar{x}				p-Wert
		n	Allo NTx + NaCl	n	Allo NTx + Anti-CD20	
Prä NTx	[%]	8	16,20	11	16,63	0,5557
	[Mrd / l]	8	1,41	11	1,5	0,6233
post NTx Woche 1	[%]	8	19,03	11	19,13	0,8775
	[Mrd / l]	8	2,83	11	2,93	0,7123
post NTx Woche 2	[%]	8	15,95	11	20,33	<0,0001
	[Mrd / l]	8	1,54	11	1,56	0,9023

Anhang 8: NKT-Zellen (CD3⁺ CD161⁺) im peripheren Blut in % und Mrd / l.

Abk.: n = Anzahl, \bar{x} = Mittelwert, allo = allogene, NTx = Nierentransplantation.

Zeitpunkt	Einheit	NKT-Zellzahlen \bar{x}				p-Wert
		n	Allo NTx + NaCl	n	Allo NTx + Anti-CD20	
Prä NTx	[%]	8	1,56	11	1,5	0,719
	[Mrd / l]	8	0,14	11	0,13	0,6998
post NTx Woche 1	[%]	8	6,6	11	6,3	0,5686
	[Mrd / l]	8	0,99	11	0,98	0,9728
post NTx Woche 2	[%]	8	3,19	11	3,8	0,074
	[Mrd / l]	8	0,3	11	0,28	0,5242

Anhang 9: Regulatorische T-Zellen (CD4⁺ CD25⁺) im peripheren Blut in % und Mrd / l.

Abk.: n = Anzahl, \bar{x} = Mittelwert, allo = allogene, NTx = Nierentransplantation.

Zeitpunkt	Einheit	Regulatorische T-Zellzahlen \bar{x}				p-Wert
		n	Allo NTx + NaCl	n	Allo NTx + Anti-CD20	
Prä NTx	[%]	8	2,801	8	2,798	0,9912
	[Mrd / l]	8	0,248	8	0,25	0,9564
post NTx Woche 1	[%]	8	2,676	11	3,133	0,2785
	[Mrd / l]	8	0,389	11	0,479	0,1469
post NTx Woche 2	[%]	8	3,301	11	4,042	0,2658
	[Mrd / l]	8	0,319	11	0,302	0,8083

Anhang 10: Regulatorische T-Zellen (CD4⁺ FoxP3⁺) im peripheren Blut in % und Mrd / l.

Abk.: n = Anzahl, \bar{x} = Mittelwert, allo = allogene, NTx = Nierentransplantation.

Zeitpunkt	Einheit	Regulatorische T-Zellzahlen \bar{x}				p-Wert
		n	Allo NTx + NaCl	n	Allo NTx + Anti-CD20	
Prä NTx	[%]	8	2,483	9	2,146	0,3064
	[Mrd / l]	8	0,221	9	0,191	0,4464
post NTx Woche 1	[%]	8	2,009	9	1,823	0,6084
	[Mrd / l]	8	0,293	9	0,274	0,742
post NTx Woche 2	[%]	8	2,485	9	3,082	0,4337
	[Mrd / l]	8	0,244	9	0,228	0,8367

Anhang 11: NK-Zellen (CD3⁻ CD161^{high}) im peripheren Blut in % und Mrd / l.

Abk.: n = Anzahl, \bar{x} = Mittelwert, allo = allogene, NTx = Nierentransplantation.

Zeitpunkt	Einheit	NK-Zellzahlen \bar{x}				p-Wert
		n	Allo NTx + NaCl	n	Allo NTx + Anti-CD20	
Prä NTx	[%]	8	3,14	11	3	0,88
	[Mrd / l]	8	0,27	11	0,26	0,8391
post NTx Woche 1	[%]	8	15,01	11	16,35	0,701
	[Mrd / l]	8	2,33	11	2,68	0,6431
post NTx Woche 2	[%]	8	7,39	11	11,85	0,0264
	[Mrd / l]	8	0,73	11	0,83	0,4836

Anhang 12: B-Zellen gesamt (CD45RA⁺ IgG⁺) im peripheren Blut in % und Mrd / l.

Abk.: n = Anzahl, \bar{x} = Mittelwert, allo = allogene, NTx = Nierentransplantation.

Zeitpunkt	Einheit	B-Zellzahlen \bar{x}				p-Wert
		n	Allo NTx + NaCl	n	Allo NTx + Anti-CD20	
Prä NTx	[%]	8	21,59	11	21,83	0,8763
	[Mrd / l]	8	1,87	11	1,93	0,7704
post NTx Woche 1	[%]	8	19,95	11	19,48	0,7836
	[Mrd / l]	8	2,94	11	3	0,8760
post NTx Woche 2	[%]	8	19,68	11	0,83	<0,0001
	[Mrd / l]	8	1,9	11	0,06	<0,0001

Anhang 13: Transitional 1 B-Zellen (IgD^{low} IgM^{medium}) im peripheren Blut in %.

Abk.: n = Anzahl, \bar{x} = Mittelwert, allo = allogene, NTx = Nierentransplantation.

Zeitpunkt	Einheit	Transitional 1 B-Zellzahlen \bar{x}				p-Wert
		n	Allo NTx + NaCl	n	Allo NTx + Anti-CD20	
Prä NTx	[%]	8	13,80	11	13	0,48
Post NTx Woche 1	[%]	8	10,1	11	9	0,4394
Post NTx Woche 2	[%]	8	9,59	11	35,81	<0,0001

Anhang 14: Transitional 2 B-Zellen (IgD^{high} IgM^{high}) im peripheren Blut %.

Abk.: n = Anzahl, \bar{x} = Mittelwert, allo = allogene, NTx = Nierentransplantation.

Zeitpunkt	Einheit	Transitional 2 B-Zellzahlen \bar{x}				p-Wert
		n	Allo NTx + NaCl	n	Allo NTx + Anti-CD20	
Prä NTx	[%]	8	1,1	11	1,709	0,4879
Post NTx Woche 1	[%]	8	1,363	11	1,609	0,7221
Post NTx Woche 2	[%]	8	1,913	11	0,573	0,2450

Anhang 15: Naive reife B-Zellen (IgD^{medium} IgM^{medium}) im peripheren Blut in %.

Abk.: n = Anzahl, \bar{x} = Mittelwert, allo = allogene, NTx = Nierentransplantation.

Zeitpunkt	Einheit	Naive Reife B-Zellzahlen \bar{x}				p-Wert
		n	Allo NTx + NaCl	n	Allo NTx + Anti-CD20	
Prä NTx	[%]	8	80,14	11	83,85	0,2797
Post NTx Woche 1	[%]	8	86,03	11	85,15	0,6314
Post NTx Woche 2	[%]	8	86,05	11	19,04	<0,0001

Anhang 16: Switched B-Zellen (IgD⁻ IgM⁻) im peripheren Blut in %.

Abk.: n = Anzahl, \bar{x} = Mittelwert, allo = allogene, NTx = Nierentransplantation.

Zeitpunkt	Einheit	Switched B-Zellzahlen \bar{x}				p-Wert
		n	Allo NTx + NaCl	n	Allo NTx + Anti-CD20	
Prä NTx	[%]	8	4,68	11	1,08	0,1588
Post NTx Woche 1	[%]	8	2,23	11	3,66	0,3293
Post NTx Woche 2	[%]	8	2,13	11	35,99	0,0032

Anhang 17: T-Zellen gesamt (CD3⁺) in der Milz in %.Abk.: n = Anzahl, \bar{x} = Mittelwert, allo = allogene, NTx = Nierentransplantation.

Zeitpunkt	T-Zellzahlen \bar{x}				p-Wert
	n	Allo NTx d14 + NaCl	n	Allo NTx d14 + Anti-CD20	
Post NTx Woche 2	5	47,94	5	74,22	0,0001

Anhang 18: T-Helfer-Zellen (CD3⁺ CD4⁺) in der Milz in %.Abk.: n = Anzahl, \bar{x} = Mittelwert, allo = allogene, NTx = Nierentransplantation.

Zeitpunkt	T-Helfer-Zellzahlen \bar{x}				p-Wert
	n	Allo NTx d14 + NaCl	n	Allo NTx d14 + Anti-CD20	
Post NTx Woche 2	5	32,14	5	47,8	0,0008

Anhang 19: Zytotoxische T-Zellen (CD3⁺ CD8⁺) in der Milz in %.Abk.: n = Anzahl, \bar{x} = Mittelwert, allo = allogene, NTx = Nierentransplantation.

Zeitpunkt	Zytotoxische T-Zellzahlen \bar{x}				p-Wert
	n	Allo NTx d14 + NaCl	n	Allo NTx d14 + Anti-CD20	
Post NTx Woche 2	5	15,26	5	25,6	<0,0001

Anhang 20: NKT-Zellen (CD3⁺ CD161⁺) in der Milz in %.Abk.: n = Anzahl, \bar{x} = Mittelwert, allo = allogene, NTx = Nierentransplantation.

Zeitpunkt	NKT-Zellzahlen \bar{x}				p-Wert
	n	Allo NTx d14 + NaCl	n	Allo NTx d14 + Anti-CD20	
Post NTx Woche 2	5	5,72	5	11,18	0,0002

Anhang 21: NK-Zellen (CD3⁻ CD161^{high}) in der Milz in %.Abk.: n = Anzahl, \bar{x} = Mittelwert, allo = allogene, NTx = Nierentransplantation.

Zeitpunkt	NK-Zellzahlen \bar{x}				p-Wert
	n	Allo NTx d14 + NaCl	n	Allo NTx d14 + Anti-CD20	
Post NTx Woche 2	5	3,79	5	10,89	0,0064

Anhang 22: B-Zellen gesamt (CD45RA⁺ IgG⁺) in der Milz in %.Abk.: n = Anzahl, \bar{x} = Mittelwert, allo = allogene, NTx = Nierentransplantation.

Zeitpunkt	B-Zellzahlen \bar{x}				p-Wert
	n	Allo NTx d14 + NaCl	n	Allo NTx d14 + Anti-CD20	
Post NTx Woche 2	5	36	5	14,6	0,0735

Anhang 23: Transitional 1 B-Zellen (IgD^{low} IgM^{medium}) in der Milz in %.Abk.: n = Anzahl, \bar{x} = Mittelwert, allo = allogene, NTx = Nierentransplantation.

Zeitpunkt	Transitional 1 B-Zellzahlen \bar{x}				p-Wert
	n	Allo NTx d14 + NaCl	n	Allo NTx d14 + Anti-CD20	
Post NTx Woche 2	5	14,3	5	52,36	<0,0001

Anhang 24: Transitional 2 B-Zellen (IgD^{high} IgM^{high}) in der Milz in %.Abk.: n = Anzahl, \bar{x} = Mittelwert, allo = allogene, NTx = Nierentransplantation.

Zeitpunkt	Transitional 2 B-Zellzahlen \bar{x}				p-Wert
	n	Allo NTx d14 + NaCl	n	Allo NTx d14 + Anti-CD20	
Post NTx Woche 2	5	0,4	5	0,1	0,0133

Anhang 25: Naive reife B-Zellen (IgD^{medium} IgM^{medium}) in der Milz in %.Abk.: n = Anzahl, \bar{x} = Mittelwert, allo = allogene, NTx = Nierentransplantation.

Zeitpunkt	Naive reife B-Zellzahlen \bar{x}				p-Wert
	n	Allo NTx d14 + NaCl	n	Allo NTx d14 + Anti-CD20	
Post NTx Woche 2	5	81,3	5	14,74	<0,0001

Anhang 26: Switched B-Zellen (IgD⁻ IgM⁻) in der Milz in %.Abk.: n = Anzahl, \bar{x} = Mittelwert, allo = allogene, NTx = Nierentransplantation.

Zeitpunkt	Switched B-Zellzahlen \bar{x}				p-Wert
	n	Allo NTx d14 + NaCl	n	Allo NTx d14 + Anti-CD20	
Post NTx Woche 2	5	3,82	5	26,18	<0,0001

Anhang 27: T-Zellen gesamt (CD3⁺) in den Lymphknoten in %.Abk.: n = Anzahl, \bar{x} = Mittelwert, allo = allogene, NTx = Nierentransplantation.

Zeitpunkt	T-Zellzahlen \bar{x}				p-Wert
	n	Allo NTx d14 + NaCl	n	Allo NTx d14 + Anti-CD20	
Post NTx Woche 2	5	64,74	4	93,23	<0,0001

Anhang 28: T-Helfer-Zellen (CD3⁺ CD4⁺) in den Lymphknoten in %.Abk.: n = Anzahl, \bar{x} = Mittelwert, allo = allogene, NTx = Nierentransplantation.

Zeitpunkt	T-Helfer-Zellzahlen \bar{x}				p-Wert
	n	Allo NTx d14 + NaCl	n	Allo NTx d14 + Anti-CD20	
Post NTx Woche 2	5	47,74	4	67,55	0,0001

Anhang 29: Zytotoxische T-Zellen (CD3⁺ CD8⁺) in den Lymphknoten in %.Abk.: n = Anzahl, \bar{x} = Mittelwert, allo = allogene, NTx = Nierentransplantation.

Zeitpunkt	Zytotoxische T-Zellzahlen \bar{x}				p-Wert
	n	Allo NTx d14 + NaCl	n	Allo NTx d14 + Anti-CD20	
Post NTx Woche 2	5	17,1	4	26,03	0,0004

Anhang 30: NKT-Zellen (CD3⁺ CD161⁺) in den Lymphknoten in %.Abk.: n = Anzahl, \bar{x} = Mittelwert, allo = allogene, NTx = Nierentransplantation.

Zeitpunkt	NKT-Zellzahlen \bar{x}				p-Wert
	n	Allo NTx d14 + NaCl	n	Allo NTx d14 + Anti-CD20	
Post NTx Woche 2	5	1,4	4	2,225	0,0053

Anhang 31: NK-Zellen (CD3⁻ CD161^{high}) in den Lymphknoten in %.Abk.: n = Anzahl, \bar{x} = Mittelwert, allo = allogene, NTx = Nierentransplantation.

Zeitpunkt	NK-Zellzahlen \bar{x}				p-Wert
	n	Allo NTx d14 + NaCl	n	Allo NTx d14 + Anti-CD20	
Post NTx Woche 2	5	0,26	4	0,983	0,1788

Anhang 32: B-Zellen gesamt (CD45RA⁺ IGG⁺) in den Lymphknoten in %.Abk.: n = Anzahl, \bar{x} = Mittelwert, allo = allogene, NTx = Nierentransplantation.

Zeitpunkt	B-Zellzahlen \bar{x}				p-Wert
	n	Allo NTx d14 + NaCl	n	Allo NTx d14 + Anti-CD20	
Post NTx Woche 2	5	31,72	4	4,4	<0,0001

Anhang 33: Transitional 1 B-Zellen (IgD^{low} IgM^{medium}) in den Lymphknoten in %.Abk.: n = Anzahl, \bar{x} = Mittelwert, allo = allogene, NTx = Nierentransplantation.

Zeitpunkt	Transitional 1 B-Zellzahlen \bar{x}				p-Wert
	n	Allo NTx d14 + NaCl	n	Allo NTx d14 + Anti-CD20	
Post NTx Woche 2	5	9,56	4	44,63	0,0002

Anhang 34: Transitional 2 B-Zellen (IgD^{high} IgM^{high}) in den Lymphknoten in %.Abk.: n = Anzahl, \bar{x} = Mittelwert, allo = allogene, NTx = Nierentransplantation.

Zeitpunkt	Transitional 2 B-Zellzahlen \bar{x}				p-Wert
	n	Allo NTx d14 + NaCl	n	Allo NTx d14 + Anti-CD20	
Post NTx Woche 2	5	0,56	4	0,175	0,1414

Anhang 35: Naive reife B-Zellen (IgD^{medium} IgM^{medium}) in den Lymphknoten in %.Abk.: n = Anzahl, \bar{x} = Mittelwert, allo = allogene, NTx = Nierentransplantation.

Zeitpunkt	Naive Reife B-Zellzahlen \bar{x}				p-Wert
	n	Allo NTx d14 + NaCl	n	Allo NTx d14 + Anti-CD20	
Post NTx Woche 2	5	86,74	4	31,98	<0,0001

Anhang 36: Switched B-Zellen (IgD⁻ IgM⁻) in den Lymphknoten in %.Abk.: n = Anzahl, \bar{x} = Mittelwert, allo = allogene, NTx = Nierentransplantation.

Zeitpunkt	Switched B-Zellzahlen \bar{x}				p-Wert
	n	Allo NTx d14 + NaCl	n	Allo NTx d14 + Anti-CD20	
Post NTx Woche 2	5	3,08	4	21,08	<0,0001

Anhang 37: Produktion an DSA im Gruppenvergleich

Abk.: DSA = Donor-spezifische Antikörper, MFI = Mean Fluorescent Intensity, n = Anzahl, \bar{x} = Mittelwert, allo = allogene, NTx = Nierentransplantation.

Zeitpunkt	MFI \bar{x}				p
	n	Allo NTx + NaCl	n	Allo NTx + Anti-CD20	
Prä NTx	7	17	9	14	0.3537
post NTx Woche 2	4	8319	4	3626	0.0004
post NTx Woche 4	3	9156	5	6506	0.1736

Anhang 38: Reaktivität der T-Zellen der Versuchstiere auf Spenderzellen im EliSpot.

Abk.: EliSpot = Enzyme Linked Immuno Spot Assay, n = Anzahl, \bar{x} = Mittelwert, allo = allogene, NTx = Nierentransplantation.

Zeitpunkt	\bar{x} (Punkte / Well)				p
	n	LEW-Normaltiere	n	LEW-Normaltier + Anti-CD20	
Prä NTx	2	11	3	11	0.9712
	n	Allo NTx + NaCl	n	Allo NTx + Anti-CD20	
post NTx Woche 2	5	255	6	205	0.2002
post NTx Woche 4	2	114	5	135	0.7028

10 Danksagung

Zu Beginn möchte ich mich bei meiner Doktormutter, Frau Prof. Dr. med. Martina Koch für die Überlassung des spannenden Themas bedanken, sowie für ihre Denkanstöße und die kritische Beleuchtung von Ergebnissen.

Ein besonderer Dank gilt auch meinem Betreuer Dr. med. Vinzent Spetzler für die geduldige Unterstützung während des gesamten Arbeitsprozesses und die Korrektur meiner Arbeit.

Weiterhin möchte ich mich bei den Mitarbeiterinnen der ehemaligen Arbeitsgruppe Koch bedanken: Frau Sabrina Christiansen danke ich für die praktische Durchführung der Nierentransplantationen und dafür, dass sie mir immer mit Rat, Tat und neuer Motivation zur Seite stand. Genauso möchte ich mich bei Frau Claudia Gossler für die geduldige Unterstützung und Einführung im Umgang mit den Versuchstieren und der stets hervorragenden praktischen Beratung bedanken.

Sowohl dem ehemaligen Labor der Hepatobiliären Chirurgie und Transplantationschirurgie als auch der Versuchstierhaltung des Campus Forschung danke ich für die Bereitstellung der gesamten Arbeitsmaterialien, sowie der exzellenten Mitversorgung der Versuchstiere. Weiterer Dank gilt Prof. Dr. med. Thorsten Wiech des Instituts für Pathologie für die Mitbeurteilung der histopathologischen Untersuchungen.

Außerordentlich dankbar bin ich außerdem meinen Eltern, die mir über die gesamte Zeit den Rücken gestärkt haben, mir Kraft gegeben haben und mich unterstützt haben, wo sie nur konnten. Weiterhin danke ich meinen engsten Freunden, die mich verständnisvoll und geduldig unterstützt und immer wieder motiviert haben.

Mona Nachtwey

11 Lebenslauf

– Lebenslauf wurde aus datenschutzrechtlichen Gründen entfernt –

12 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: