

Relevanz von regulatorischen B-Lymphozyten in der akuten Transplantatabstoßung in einem MHC-inkompatiblen Rattentransplantationsmodell

Masterarbeit

Im Studiengang

Pharmaceutical Biotechnology

von

Julia Spieker

Hepatobiliäre Chirurgie und Transplantationschirurgie des
Universitätsklinikums Hamburg-Eppendorf

September 2015

Referent:
Korreferentin

Prof. Dr. Jörg Andrä
Prof. Dr. Martina Koch

Hamburg, 24.09.2015

ZUSAMMENFASSUNG

Trotz moderner immunsuppressiver Therapie kommt es nach Organtransplantationen immer noch zu akuten und chronischen Abstoßungen, die das Überleben der transplantierten Organe begrenzen. Insbesondere Antikörper-vermittelte Abstoßungen sind in den letzten Jahren vermehrt untersucht worden und neben der T-Zelle rückt auch die Rolle der B-Zelle immer mehr ins Interesse der Transplantationsmedizin. Obwohl nicht zugelassen, wird Rituximab, ein chimärer Anti-CD20-Antikörper, sowohl in der Behandlung als auch in der Prophylaxe von Antikörper-vermittelten Abstoßungen nach Nierentransplantation eingesetzt. Rituximab depletiert reife B-Lymphozyten, seine Relevanz für die Bildung von Antikörpern ist aber umstritten. Diskutiert wird auch, ob B-Lymphozyten nicht sogar eine positive Rolle für die Transplantatakzeptanz spielen können, so dass der Einsatz von Rituximab kontrovers diskutiert wird.

Ziel dieser Arbeit war es Vorläufer-B-Zellen und B-Lymphozyten zu depletieren und näher zu charakterisieren. Untersucht wurde auch ihre jeweils anteilige Suppression, da postuliert wird, dass der Einsatz von Anti-CD20-Antikörpern auch zur Depletion von regulatorischen B-Zellen führt. Diese wirken auf das Transplantat womöglich toleranzinduzierend.

Zur Simulation einer akuten Abstoßung ist ein Nierentransplantationsmodell in Ratten (LEW.1W → LEW) verwendet worden. Die Injektion des B-Zell-depletierenden Anti-CD20-Antikörpers erfolgte an Tag 7 post Transplantation. Neben IL-10⁺ regulatorischen B-Zellen wurden auch die Marker Immunglobulin M und D etabliert und anhand dessen die B-Zell-Subpopulationen Switched, Transitional 1 und 2 B-Zellen, sowie Naive Mature B-Zellen definiert.

Der Einsatz des Anti-CD20-Antikörpers in Ratten führt zu einer fast vollständigen Depletion der IL-10⁺ B-Zellen. Die Ergebnisse zeigen auch Parallelen zum Verlauf der Entwicklung von regulatorischen T-Zellen, denen ebenfalls eine toleranzinduzierende Wirkung zugewiesen wird. Der

Depletionserfolg ist abhängig vom Anteil der IgM-Expression der jeweiligen B-Zellpopulation. Deshalb werden IgM⁻ Switched B-Zellen am geringsten depletiert. Diese Zellen wurden vermehrt zum Zeitpunkt der maximalen Depletion nachgewiesen und sie konnten auch bei Patienten und Mäusen, die eine starke Abstoßungsreaktion zeigten, nachgewiesen werden, sodass sie vermutlich einen negativen Einfluss auf das Transplantatüberleben haben. Demnach könnte die Entwicklung eines spezifischeren Antikörpers, der gezielt B-Zell-Subtypen depletiert, das Transplantatüberleben verlängern.

ABSTRACT

Acute and chronic rejections still occur, despite modern immunosuppressive therapy and show limiting effects on survival of transplanted organs. In particular, antibody-mediated rejections have been studied increasingly in recent years and in addition to T-cells it is more focused on the role of B-cells in that context. Although not licensed, rituximab, a chimeric anti-CD20 antibody, is used both in the treatment and in the prophylaxis of antibody-mediated rejection after kidney transplantation. Rituximab depletes mature B lymphocytes, its relevance to the formation of antibodies is very controversial. It is also discussed whether B lymphocytes even influence the transplanted graft positively. Therefore, the use of rituximab is debatable.

The aim of this study was to deplete and characterize all mature B-lymphocytes as well as late precursor B-cells. Their respective pro rata suppression was also investigated because it is postulated that the use of anti-CD20 antibodies also leads to depletion of regulatory B cells, supposedly inducing tolerance in transplants.

To simulate an acute rejection, a kidney transplant model in rats (LEW.1W → LEW) has been used. Injection of the B-cell depleting anti-CD20 antibody was carried out on day 7 post transplantation. In addition to IL-10-producing regulatory B-cells, Immunoglobulin M and D have been established as markers to define Switched, Transitional 1 and 2 B-lymphocytes as well as Naive Mature B-cells.

Application of Anti-CD20 antibody in rats leads to an almost entire depletion of IL-10⁺ B-cells. A secondary impact of the application shows influences in regulatory T cell development, which is assigned to tolerance-inducing effects. A successful depletion is dependent on IgM-expression of the respective B-cell population. This work confirms that IgM⁻ Switched B-cells displayed the least depletion. This population was significantly increased during the maximum effects of B-cell depletion in comparison to other B-cell subtypes. Patients and

ABSTRACT

mice, showing a strong rejection, dispose of high Switched B-cell populations in transplants, which might indicate a detrimental impact on graft survival. Therefore, the Anti-CD20 antibody shows unfavourable influences in transplantation medicine. In future, it would be important to develop antibodies, which differentiates between B cell subtypes to prolong transplant survival.

INHALTSVERZEICHNIS

1. EINLEITUNG	1
1.1. Das humane Immunsystem	1
1.2. Die Funktion und Aktivierung von T-Lymphozyten	2
1.2.1. Cytotoxische T-Zellen	3
1.2.2. T-Helferzellen	3
1.2.3. Regulatorische T-Zellen	4
1.3. Die Entwicklung von B-Lymphozyten und ihrer Subtypen	6
1.3.1. Aktivierung von B-Zellen	8
1.3.2. Regulatorische B-Zellen	8
1.4. Nierentransplantation und Abstoßungsreaktionen	12
1.5. <i>Major Histocompatibility Complex</i> im congenen Rattentransplantationsmodell	14
1.6. Die Ratte als Transplantationsmodell	14
1.7. Rituximab und seine Anwendung zur Behandlung der Transplantatrejektion	15
1.8. Zielsetzung	17
2. MATERIAL & METHODEN	18
2.1. Genehmigung der Tierversuche	18
2.2. Tiermodell	18
2.3. Überwachung des Allgemeinzustandes der Versuchstiere	20
2.4. Probengewinnung	20
2.4.1. Leukozytenisolierung aus peripherem Blut	22
2.4.2. Bestimmung der Zellzahl und Vialbilität	23

2.5. Durchflusszytometrische Analyse der Lymphozytenpopulationen	24
2.5.1. Immunfluoreszenzfärbung von Oberflächenmarkern	25
2.5.2. Intrazelluläre Immunfluoreszenzfärbung	25
2.6. Differenzialblutbild	26
2.7. Immunhistologische Analyse der Zellinfiltrate	27
2.8. Statistische Auswertung	28
3. ERGEBNISSE	29
3.1. Auswertung klinischer Parameter	29
3.1.1. Gewichtsentwicklung	29
3.2. Etablierung von Markern zur Differenzierung von B-Lymphozyten	30
3.3. Population der gesamten Lymphozyten	35
3.4. Charakterisierung von B-Zell-Subpopulationen	36
3.4.1. B-Lymphozyten – CD45RA ⁺ IgG ⁺	37
3.4.2. Naive Mature B-Zellen - IgD ^{medium} IgM ^{medium}	39
3.4.3. Transitional 1 B-Zellen – IgD ^{low} IgM ^{medium}	41
3.4.4. Transitional 2 B-Zellen – IgD ^{high} IgM ^{high}	43
3.4.5. Switched B-Zellen – IgD ⁻ IgM ⁻	45
3.4.6. Entwicklung der B-Zell-Subtypen im Vergleich	47
3.5. Nachweis von regulatorischen Lymphozyten	50
3.5.1. IL-10 ⁺ regulatorische B-Zellen	51
3.5.2. FoxP3 ⁺ regulatorische B-Zellen	53
3.5.3. IL-10 ⁺ regulatorische T-Zellen	54
3.5.4. FoxP3 ⁺ regulatorische T-Zellen	56
3.6. Monitoring der T- & NK-Zellpopulationen	60
3.6.1. T-Zellen – CD45 ⁺ CD3 ⁺	61
3.6.2. T-Helfer-Zellen – CD3 ⁺ CD4 ⁺	63
3.6.3. Cytotoxische T-Zellen – CD3 ⁺ CD8 ⁺	65
3.6.4. Natural Killer-Zellen – CD3 ⁻ CD161 ^{high}	67
3.6.5. Natural Killer T-Zellen – CD3 ⁺ CD161 ⁺	70
	VI

3.7. Immunhistologische Analyse der Zellinfiltrate	72
4. DISKUSSION	74
5. LITERATURVERZEICHNIS	I

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

ADCC	<i>Antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity</i>
APC	<i>Antigen presenting cells</i>
APC	Allophycocyanin
BCR	<i>B cell receptor</i>
Bregs	regulatorische B-Zellen
BSA	<i>bovine serum albumin</i>
CD	<i>Cluster of Differentiation</i>
CTL	<i>cytotoxic T lymphocyte</i>
Cy7	Cyanin 7
EAE	<i>experimental autoimmune encephalomyelitis</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
FACS	<i>Fluorescence-activated cell sorting</i>
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
FITC	Fluorescein-Isothiocyanat
FO B-Zellen	follikuläre B-Zellen
FoxP3	<i>Forkhead Box P3</i>
FSC	<i>forward scatter</i>
GC	<i>germinal center</i>
HLA	<i>human leucocyte antigen</i>
IFN	Interferon
IgD	Immunglobulin D
IgM	Immunglobulin M
IL	Interleukin
LEW	Lewis
LPS	Lipopolysaccharid
MHC	<i>major histocompatibility complex</i>
MZ B-Zellen	Marginalzonen B-Zellen
NK	Natural Killer
NKT	Natural Killer T-Zellen
NTX	Nierentransplantation

PAMP	<i>pathogen-associated molecular patterns</i>
PBS	<i>phosphate buffered saline</i>
PE	Phycoerythrin
PRR	<i>pattern recognition</i> Rezeptoren
SSC	<i>side scatter</i>
T1	Transitional 1
T2	Transitional 2
TCR	<i>T cell receptor</i>
TGF	Transforming Growth Factor
TH-Zellen	T-Helfer-Zellen
TIM-1	<i>T cell immunoglobulin and mucin domain</i>
TLR	<i>Toll-like</i> Rezeptoren
TNF	<i>tumor necrosis factor</i>
Tregs	regulatorische T-Zellen

TABELLENVERZEICHNIS

Tabelle 1: MHC-Haplotypen der MHC congenen LEW-Stämme	18
Tabelle 2: Verwendete Antikörper zur FACS-Analyse	26
Tabelle 3: Primärantikörper zur immunhistologischen Analyse der Zellinfiltrate in der transplantierten Niere	28
Tabelle 4: Vergleich des Depletionserfolgs anhand IgM-Anteile verschiedener B-Subtypen	49

ABBILDUNGSVERZEICHNIS

Abbildung 1: Überblick zur Entwicklung der B-Lymphozyten von unreifen B-Zellen bis zu Memory Switched B-Zellen	7
Abbildung 2: Funktionelle Effektormechanismen von regulatorischen B-Lymphozyten	10
Abbildung 3: Dargestellt ist der planmäßige Aufbau der Versuche in Wochen	20
Abbildung 4. Gewichtsentwicklung der Gruppen „Allo“ und „Allo Anti-CD20“ im Vergleich	30
Abbildung 5: Differenzierung der B-Zell-Subpopulationen anhand der Marker IgM (X-Achse) und IgD (Y-Achse)	31
Abbildung 6: Verlauf der B-Zell-Subtypen in Anti-CD20 depletierten Tieren	32
Abbildung 7: Etablierte IL-10-Färbung eines repräsentativen Tieres aus der Gruppe „Anti-CD20“	33
Abbildung 8: Entwicklung der MFI der IL-10 gefärbten Zellen im Versuchsverlauf über vier Wochen	34
Abbildung 9: Entwicklung der gesamten Lymphozyten der Gruppen „Allo“ und „Allo Anti-CD20“ im Vergleich	35
Abbildung 10: Repräsentative Verteilung der Subtypenpopulation von B-Lymphozyten in einem allogenen transplantierten Tier in Woche 1	36
Abbildung 11: FACS-Färbung der B-Lymphozyten	37
Abbildung 12: Dargestellt ist der wöchentlich analysierte gemittelte Anteil der B-Lymphozyten der gesamten Lymphozytenpopulation in Prozent im peripheren Blut	38

Abbildung 13: Dargestellt ist der gemittelte Anteil der B-Lymphozyten der gesamten Lymphozytenpopulation in Prozent im Lymphknoten und Milz	39
Abbildung 14: Dargestellt ist der wöchentlich analysierte, gemittelte Anteil der Naive Mature B-Zellen der gesamten Lymphozytenpopulation in Prozent im peripheren Blut	40
Abbildung 15: Dargestellt ist der gemittelte Anteil der Naive Mature B-Zellen der gesamten Lymphozytenpopulation in Prozent in den Lymphknoten und in der Milz in Woche 4 nach Versuchsende	41
Abbildung 16: Dargestellt ist der wöchentlich analysierte, gemittelte Anteil der Transitional 1 (T1) B-Zellen der gesamten Lymphozytenpopulation in Prozent im peripheren Blut	42
Abbildung 17: Dargestellt ist der gemittelte Anteil der Transitional 1 B-Zellen der gesamten Lymphozytenpopulation in Prozent in den Lymphknoten und in der Milz in Woche 4 nach Versuchsende	43
Abbildung 18: Dargestellt ist der wöchentlich analysierte gemittelte Anteil der Transitional 2 (T2) B-Zellen der gesamten Lymphozytenpopulation in Prozent im peripheren Blut	44
Abbildung 19: Dargestellt ist gemittelte Anteil der Transitional 2 B-Zellen der gesamten Lymphozytenpopulation in Prozent in den Lymphknoten und in der Milz in Woche 4 nach Versuchsende	45
Abbildung 20: Dargestellt ist der wöchentlich analysierte gemittelte Anteil der Switched B-Zellen der gesamten Lymphozytenpopulation in Prozent im peripheren Blut	46
Abbildung 21: Dargestellt ist gemittelte Anteil der Switched B-Zellen der gesamten Lymphozytenpopulation in Prozent in den Lymphknoten und in der Milz in Woche 4	47
Abbildung 22: Entwicklung der B-Zell-Subtypenverteilung im peripheren Blut und in den Organen Lymphknoten und Milz der Gruppe „Allo“	49

Abbildung 23: Entwicklung der B-Zell-Subtypenverteilung im peripheren Blut und in den Organen Lymphknoten und Milz der Gruppe „Allo Anti-CD20“	50
Abbildung 24: Vergleich von IL-10+ T- & B-Zellen in Woche 1 (links) vor der Depletion und in Woche 2 (rechts) nach der Depletion	51
Abbildung 25: Regulatorische B-Zellen der Gruppe „Allo“	52
Abbildung 26: Regulatorische B-Zellen der Gruppe „Allo Anti-CD20“	53
Abbildung 27: Nachweis von FoxP3+ B- & T-Zellen	54
Abbildung 28: IL-10+ regulatorische T-Zellen der Gruppe „Allo“	55
Abbildung 29: IL-10+ regulatorische T-Zellen der Gruppe „Allo Anti-CD20“	56
Abbildung 30: Anteil der regulatorischen T-Zellen im peripheren Blut	57
Abbildung 31: Anteil der aktivierten T-Zellen im peripheren Blut	58
Abbildung 32: Anteil der aktivierten T-Zellen in den Lymphknoten und in der Milz	59
Abbildung 33: Nachweis von regulatorischen T-Zellen in den Lymphknoten und in der Milz	60
Abbildung 34: Charakteristische Färbung der T-Lymphozyten	61
Abbildung 35: Gesamtanteil der T-Zellen	62
Abbildung 36: Anteil der T-Zellen in den Lymphknoten und der Milz	62
Abbildung 37: Charakteristische Färbung der T-Helfer-Zellen	63
Abbildung 38: Anteil der T-Helfer-Zellen im peripheren Blut	64
Abbildung 39: Anteil der T-Helfer-Zellen in den Lymphknoten und der Milz.	65
Abbildung 40: Charakteristische Färbung der cytotoxischen T-Zellen	66
Abbildung 41: Anteil der cytotoxischen T-Zellen im peripheren Blut	67

Abbildung 42: Anteil der cytotoxischen T-Zellen in den Lymphknoten und der Milz	68
Abbildung 43: Charakteristische Färbung der NK-& NKT-Zellen	69
Abbildung 44: Anteil der Natural Killer Zellen (NK) im peripheren Blut	70
Abbildung 45: Anteil der Natural Killer Zellen (NK) in den Lymphknoten und in der Milz	71
Abbildung 46: Anteil der Natural Killer T-Zellen (NKT) im peripheren Blut	72
Abbildung 47: Anteil der Natural Killer T-Zellen (NKT) in den Lymphknoten und in der Milz	73
Abbildung 48: Vergleich der NTX-Niere in einem isogen transplantierten Tier (links), einem allogenen transplantierten Tier mit B-Zell-Depletion (Mitte) und einem allogenen transplantierten Tier ohne B-Zell-Depletion (rechts)	74

1. EINLEITUNG

1.1. Das humane Immunsystem

Jeden Tag wird der Mensch vor pathogenen Mikroorganismen oder eigenen Zellen, die beispielsweise aufgrund von Mutationen Pathogenität erlangt haben, durch sein Immunsystem geschützt. Das Immunsystem setzt sich aus zwei Komponenten zusammen - der angeborenen und der adaptiven Immunabwehr. Die angeborene Immunantwort bildet die grundlegende Abwehrreaktion eines jeden Organismus' und ist unspezifisch. Die adaptive Immunantwort setzt zwar mit Verzögerung ein, verfügt aber über eine hohe Antigenspezifität und effizientere Abwehrmechanismen (Abbas, et al., 1996).

Neben den physikalischen und chemischen Barrieren, wie beispielsweise den Epithelien und von diesen gebildete antimikrobielle Substanzen (Podolsky, 1999), bilden auch phagozytierende Zellen einen Teil der angeborenen Immunabwehr. Zu den Phagozyten gehören Makrophagen und Granulozyten, welche Pathogene unspezifisch als fremd erkennen. Dies geschieht aufgrund bestimmter Oberflächenmoleküle, so genannter Pathogen-assoziiertes molekulare Strukturen (*Pathogen-associated molecular patterns* oder PAMP) (Medzhitov & Janeway, 1997). Anhand dieser *Pattern Recognition* Rezeptoren (PRR) auf der Oberfläche der Phagozyten kann mit PAMP interagiert werden (Kawai & Akira, 2010). Ein Beispiel für eine Klasse der PRR sind die Toll-like Rezeptoren (TLR). Sie kommen sowohl intrazellulär als auch auf der Oberfläche vor. TLR1, 2, 4 und 6 können beispielsweise bestimmte Lipide erkennen, während TLR 5 und 11 Proteine als Liganden binden. Lipopolysaccharid (LPS), das in der äußeren Membran gramnegativer Bakterien vorkommt, wird ebenfalls von TLR4 erkannt (Aderem & Ulevitch, 2000), (Kawai & Akira, 2007). So können Pathogene, die die ersten Barrieren überwunden haben und ins Gewebe eingedrungen sind, durch Phagozytose eliminiert werden. Neben Granulozyten und Makrophagen gehören auch natürliche Killerzellen (NK-Zellen) zum angeborenen Immunsystem. Diese

werden durch Interferone und Cytokine der Makrophagen aktiviert und können unter anderem Virusinfektionen eindämmen (Biron et al., 1999). Die NK-Zellen binden an die Zielzelle und setzen cytotoxische Granula frei, welche die entsprechenden Effektorproteine enthalten. Diese passieren die Zellmembran und führen zur Apoptose der Zielzelle (Vivier et al., 2011).

B- und T-Lymphozyten sind die Effektorzellen des adaptiven Immunsystems, die aktiviert werden, wenn ein Pathogen durch das angeborene Immunsystem nicht kontrolliert werden kann. Jede dieser Lymphozyten kann aufgrund somatischer Rekombination fast unendlich viele Varianten hochspezifischer Rezeptoren für entsprechende Antigene exprimieren (Nemazee, 2000). Diese entstehen nach erstmaligem spezifischem Kontakt zu einem Pathogen, sodass es zu einer verzögerten Immunantwort kommt. Die Aktivierung und Differenzierung entsprechender Lymphozyten kann bis zu vier Tagen dauern. Bestand einmal ein spezifischer Kontakt zwischen Pathogen und Lymphozyten, so kommt es zur Ausbildung eines immunologischen Gedächtnisses, das bei erneuter Infektion eine schnellere Reaktion generiert (Liu et al., 1991).

1.2. Die Funktion und Aktivierung von T-Lymphozyten

T-Lymphozyten lassen sich anhand ihrer Oberflächenmarker in zwei Untergruppen teilen. T-Helferzellen (T_H -Zellen) und regulatorische T-Zellen (Tregs) sind CD4 positiv (*Cluster of differentiation*), während cytotoxische T-Zellen (CTL, engl. *cytotoxic T lymphocyte*) CD8 positiv sind (Teh et al., 1988). Eine T-Zelle wird durch den Kontakt zu einem Antigen aktiviert und die Proliferation beginnt. Entsprechend ihrer Bestimmung differenzieren sie sich zu den oben genannten Untergruppen. Eine Antigenbindung erfolgt nur mit Antigenen, die von MHC-Molekülen präsentiert werden. Unterschieden wird dabei zwischen MHC-Klasse-I-Molekülen, die nur Peptide aus dem Cytosol präsentieren und von $CD8^+$ T-Zellen erkannt werden sowie MHC-Klasse-II-Molekülen, die in Vesikeln entstandene Peptide präsentieren und eine Bindung mit $CD4^+$ T-Zellen eingehen können (Banchereau et al., 2000). Als

Schutzmechanismus vor autoreaktiven T-Zellen ist ein sekundäres Signal zur Costimulation der T-Zellen notwendig. Verantwortlich dafür sind Moleküle wie B7 (B7.1/B7.2 = CD80/ CD86), die ebenfalls von den antigenpräsentierenden Zellen exprimiert werden und eine Bindung mit den CD28-Rezeptoren der entsprechenden T-Zelle eingehen (Lenschow et al., 1996). Die Funktion CD4⁺ T-Zellen besteht darin andere Zellen zu aktivieren (T_H-Zellen) oder zu regulieren (Tregs) (Abbas et al., 1996), während CD8⁺ T-Zellen mutierte, körpereigene Zellen eliminieren, als auch mit Viren oder Bakterien infizierte Zellen zerstören kann (Mosmann et al., 1997).

1.2.1. Cytotoxische T-Zellen

Die Aktivierung von naiven cytotoxischen T-Zellen erfolgt über die Bindung des T-Zell-Rezeptors (TCR, engl. *T Cell Receptor*) an ein Antigen, das vom MHC-I-Komplex einer Antigen-präsentierender Zelle (APC, engl.: *Antigen-presenting Cell*) präsentiert wird. Durch Ausbildung einer immunologischen Synapse zwischen aktivierter Effektor-T-Zelle und Zielzelle, erfolgt die Sekretion cytotoxischer Granzyme und Perforine, sowie IFN γ und TNF α (Wherry & Ahmed, 2004). Diese führen entweder zu einer direkten Lyse der Zielzelle oder induzieren Apoptose durch Aktivierung des Fas-Rezeptors (Wong & Pamer, 2004). 90-95 % der Effektor-CD8⁺-T-Zellen begehen Apoptose nach erfolgreicher Interaktion mit einer APC. Die verbleibenden cytotoxischen T-Zellen differenzieren sich zu einem Gedächtnisphänotyp und können bei wiederkehrender Infektion mit gleichem Antigen als Effektorzelle agieren (Carvalho et al., 2013).

1.2.2. T-Helferzellen

Die T-Helferzellen werden anhand der verschiedenen sekretierten Cytokine in weitere Subpopulationen unterteilt. T_H1-Zellen produzieren primär Interleukin-2 (IL), TNF α und IFN γ . IL-4, IL-5, IL-10 und IL-13 werden von T_H2-Zellen sekretiert (Mosmann & Coffman, 1998), während T_H17-Zellen vorwiegend IL-17 und IL-22 ausschütten (Weaver et al., 2006). Mosmann und Coffman

entdeckten, dass T_H1 -Zellen für die Bekämpfung intrazellulärer Mikroorganismen verantwortlich sind, während T_H2 -Zellen auf die Dezimierung extrazellulärer Pathogene spezialisiert sind (Mosmann & Coffman, 1998). Für die Ausbildung von Resistenzen gegen myobakterielle Infektionen spielen T_H1 -Zellen eine wichtige Rolle. Sie können außerdem diverse Autoimmunkrankheiten induzieren. T-Helferzellen differenzieren infolge eines IL-12 und IFN γ Signals zu T_H1 -Zellen (Zhu & Paul, 2010). Die Produktion von IFN γ aktiviert Makrophagen, die ihre mikrobielle Aktivität steigern (Suzuki et al., 1988). T_H2 -Zellen bekämpfen neben extrazellulärer Parasiten auch die Persistenz von Asthma und anderen Allergien. Durch die von T_H2 -Zellen sekretierten Cytokinen kommt es zur Induktion der humoralen Immunantwort von B-Zellen (Zhu & Paul, 2010). T_H17 -Zellen, die erst 2005 entdeckt wurden, sind ebenfalls für extrazelluläre Mikroorganismen verantwortlich, darunter vor allem für Bakterien und Pilze (Weaver et al., 2006), (Harrington et al., 2005). Wie auch T_H1 -Zellen, sind sie in die Pathogenese einer Reihe von Autoimmunerkrankungen involviert (Chen & O'Shea, 2008). Ein Teil der T_H -Zellen kann nach der Immunantwort als Gedächtniszelle existent bleiben und durch erneute Antigenstimulation reaktiviert werden, während der Großteil der T_H -Zellen, die als Effektorzellen fungieren, aufgrund der eingeleiteten Apoptose eine kürzere Lebensdauer haben (Zhu & Paul, 2008).

1.2.3. Regulatorische T-Zellen

Im Jahre 1971 wurden T-Zellen beschrieben, die einen suppressiven Charakter haben und später als regulatorische T-Zellen beziehungsweise Tregs bezeichnet wurden (Gershon & Kondo, 1971). Sakaguchi et al. konnten erst deutlich später die suppressive Funktion der CD4⁺ CD25⁺ T-Zellen in einem Mausmodell nachweisen, das unter entsprechender Depletion schwere Autoimmunerkrankungen aufwies (Sakaguchi et al., 1995). Als wichtiges Charakteristikum von regulatorischen T-Zellen ist der Transkriptionsfaktor FoxP3 (*Forkhead Box P3*) identifiziert worden (Sakaguchi, 2011). Die Bildung der Tregs erfolgt im Thymus und nach erfolgreicher Prozessierung erreicht ein geringer Teil die Peripherie (Finkel et al., 1989). Es ist allerdings auch möglich,

dass die Bildung der Tregs aus ursprünglich naiven T-Zellen in der Peripherie induziert wird (Curotto de Lafaille & Lafaille, 2009; Gravano & Vignali, 2012). Induzierte und natürlich vorkommende Tregs scheinen sich in ihren Funktionen zu ergänzen. Erst kürzlich ist entdeckt worden, dass induzierte Tregs womöglich Einfluss auf die Alloreaktivität in der Organtransplantation haben (Samstein et al., 2013). Neben FoxP3⁺ regulatorischen T-Zellen sind auch IL-10⁺ T-Zellen mit regulatorischen Funktionen nachgewiesen worden. Demnach gehen sie gegen APCs vor. Ihre exakte Funktion ist allerdings noch nicht bekannt (Magnani et al., 2011). Da sich sowohl natürliche als auch induzierte regulatorische T-Zell-Populationen zu ergänzen scheinen und übergreifende Funktionen haben, müssen sich sämtliche Strategien zur Induktion von Transplantattoleranz auf beide Populationen beziehen.

Die Repression der Immunreaktion durch die regulatorische Funktion der T-Zellen erfolgt über verschiedene Mechanismen (Vignali et al., 2008). Zum einen kann es über die Inhibierung der Aktivierung und Proliferation der T-Zellen erfolgen. Dies geschieht direkt oder indirekt durch die Reduktion der Antigen-Präsentation der APCs. Regulatorische T-Lymphozyten können dazu immunsuppressive Cytokine, wie TGFβ und IL-35 sekretieren (Li et al., 2006; Izcue et al., 2009). Darüber hinaus können sie Granzyme sekretieren und in Perforin-abhängiger Weise Zielzellen töten (Grossmann et al., 2004; Gondek et al., 2008). Zum anderen verfügen Tregs über die Fähigkeit Galectin-1 zu exprimieren, das eine Rolle bei der Interaktion von regulatorischen T-Zellen mit dendritischen Zellen und anderen T-Lymphozytenpopulation spielt (Garin et al., 2007). Hinzu kommt die erhöhte Expression von CD25 auf Tregs, die α-Kette des IL-2-Rezeptors. Damit konkurrieren sie unter bestimmten Bedingungen mit T-Lymphozyten um IL-2 und hemmen dadurch die Aktivierung und Proliferation der T-Zellen (De la Rosa et al., 2010; Sicard et al., 2015).

1.3. Die Entwicklung von B-Lymphozyten und ihrer Subtypen

Die Entdeckung und Charakterisierung von B-Lymphozyten erfolgte Mitte der sechziger und siebziger Jahre (Cooper et al., 1965; Kwan & Norman, 1974). B-Zellen übernehmen eine Schlüsselrolle bei der humoralen Immunantwort, indem sie Immunglobuline produzieren, auch Antikörper genannt. Diese sind gegen Antigene pathogener Mikroben gerichtet. B-Lymphozyten durchlaufen einen komplexen Reifungsprozess zur Bildung von verschiedenen Immunglobulinen, die eine unbegrenzte Anzahl von Antigenespezifität erlangen können. Die Entwicklung der B-Zellen verläuft über mehrere Stufen, die auf der Bildung verschiedener Zellmarker beruht.

Die Genese der B-Zellen aus hämatopoetischen Stammzellen beginnt im Knochenmark. Dieses verlassen sie als Transitional 1 (T1) und Transitional 2 (T2) B-Zellen und verfügen unter anderem über die Marker Immunglobulin D (IgD), Immunglobulin M (IgM) und CD20 (Chung et al., 2003). Transitional B-Zellen sind sehr kurzlebig und funktionell unreif. Sie erreichen den Status der reifen naiven B-Zellen nach der Ansiedlung in den peripheren lymphatischen Organen (Crespo et al., 2015). Transitional 2 B-Zellen exprimieren hohe IgM-Level. In den Lymphknoten und der Milz reagieren sie auf fremde Antigene, die von dendritischen Zellen gebunden sind, proliferieren und differenzieren sich entweder zu Plasmazellen oder migrieren über Follikel in das Germinale Zentrum (GC, engl.: *Germinal Center*) (Le Bien & Tedder, 2008). Als Mature B-Zellen exprimieren sie geringere Level des Immunglobulins M und beginnen CD21 und CD23 zu exprimieren (Silverman & Goodyear, 2006). Im GC differenzieren sich die naiven B-Zellen zu hochaffinen Antikörpersekretierenden Plasmazellen, die ins Knochenmark wandern und vorwiegend CD38 und CD138 exprimieren (Pieper et al., 2013), oder zu Memory B-Zellen (Jacob et al., 1991). Memory B-Zellen kontrollieren die peripheren lymphatischen Organe, um fremden Antigene zu detektieren (Le Bien & Tedder, 2008). Es wird postuliert, dass bestimmte Memory B-Zellen bei einem zweiten

Antigenkontakt einen so genannten „*Class Switch*“ durchführen können und die Expression von Immunglobulin M durch die Immunglobuline G, A oder E ersetzt werden (Kurosaki et al., 2015). Dadurch erreichen die Switched B-Zellen vermutlich eine höhere Antikörperaffinität, sodass sie bei einem zweiten Antigenkontakt effizienter agieren können (Liu, 1996; Kurosaki et al., 2015). Die genaue Funktionsweise von Switched B-Zellen ist allerdings noch nicht vollständig erforscht. Ein Teil der Memory B-Zellen ändert seinen Isotyp nicht und ist weiterhin IgM⁺ (Kaji et al., 2012). Eine Übersicht zur Entwicklung der B-Zellen ist in Abbildung 1 gezeigt.

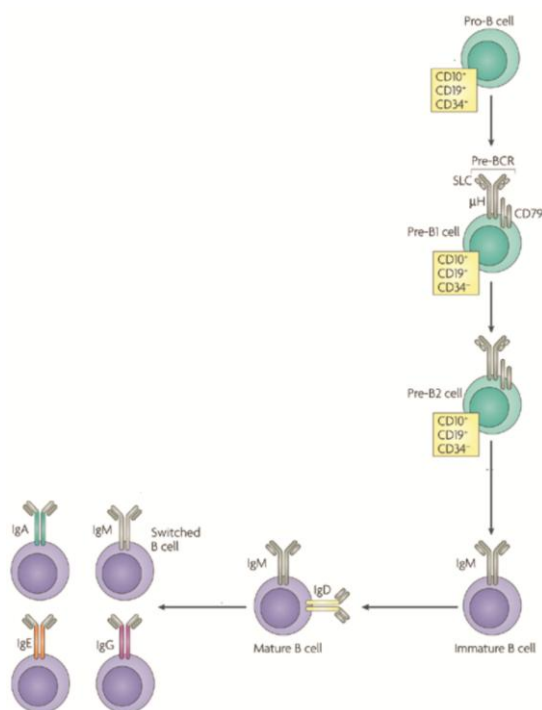


Abbildung 1: Überblick zur Entwicklung der B-Lymphozyten von unreifen B-Zellen bis zu Memory Switched B-Zellen. Dargestellt sind einzelne B-Zell-Subtypen mit ihren Oberflächenmarkern, es handelt sich dabei nicht um eine vollständige Darstellung aller Entwicklungsstadien. Abbildung modifiziert nach Marodi & Notarangelo (Marodi & Notarangelo, 2007).

Reife B-Zellen, die für die Marker IgM und IgD positiv sind, verfügen unstimuliert nur über eine kurze Lebensdauer von wenigen Tagen oder Wochen. Erst mit der Aktivierung durch die Antigenerkennung verlängert sich die Überlebensdauer (Oracki et al., 2010).

1.3.1. Aktivierung von B-Zellen

Mature Naive B-Zellen zirkulieren permanent im Blut, den lymphatischen Organen und der Lymphe. Erst nach dem Kontakt zu Antigenen werden sie in den sekundären lymphatischen Organen aktiviert (Crespo et al., 2015). Meistens ist dabei die Hilfe von CD4⁺ T-Zellen nötig. Nur im Fall von pathogenen Mikroben, einschließlich Lipidpolysacchariden (LPS), erfolgt eine direkte Aktivierung von B-Lymphozyten. Die direkte Aktivierung führt zu einer abgekürzten Differenzierung der B-Zellen und zur ausschließlichen Sekretion von IgM (Colvin-Adams & Agnihotri, 2011).

Anderenfalls erfolgt die B-Zell-Aktivierung über die Bindung eines Antigens am Antigen-spezifischen B-Zell-Rezeptor (BCR: engl.: *B cell receptor*). Der BCR wird über die Rezeptor-vermittelte Endozytose verdaut und die entstandenen Peptidfragmente werden über den MHC-II-Komplex auf der B-Zell-Oberfläche präsentiert, sodass sie mit CD4⁺ T-Zellen interagieren können (Pieper et al., 2013). Zusätzlich wird ein zweites Aktivierungssignal benötigt, das über die Interaktion von CD40 auf B-Zellen und CD40-Liganden auf T-Zellen erfolgt (MacLeod et al., 2011). Dadurch wird eine erhöhte Expression des Moleküls B7 ausgelöst, das für T-Zellen kostimulatorisch wirkt. Dieses Molekül besteht aus zwei Untereinheiten B7.1 (CD80) und B7.2 (CD86), die gemeinsam als Ligand für CD28 fungieren, der auf T-Zellen zu finden ist (Careno & Collins, 2002). Zusätzlich führt die Interaktion der Oberflächenproteine CD19, CD21 und CD81 mit dem BCR zu einer Aktivierung der PI3-Kinase und dadurch zu einer potenzierten Zellantwort (Asokan et al., 2013).

1.3.2. Regulatorische B-Zellen

Bereits in den siebziger Jahren ist B-Lymphozyten eine regulatorische Funktion im Zusammenhang mit Hypersensitivitätsreaktionen nachgewiesen worden. Dabei konnte festgestellt werden, dass B-Zellen relevant für die Unterdrückung der entsprechenden Symptome sein können (Katz et al., 1974). Erst Jahre später konnten in Mäusen evidente Beweise für diese regulatorische Rolle von

B-Zellen in Autoimmunkrankheiten publiziert werden (Wolf et al., 1996). Dadurch konnte erstmalig wissenschaftlich belegt werden, dass B-Lymphozyten eine Schlüsselrolle in der Minderung von Entzündungsreaktionen einnehmen.

Zu den am besten untersuchten Mechanismen der regulatorischen B-Zellen (Breg) zählt die Produktion des immunsuppressiven Cytokins Interleukin 10 (IL-10) (Candando et al., 2014). IL-10 verfügt über die Fähigkeit Immunantworten abzuschwächen, indem es die Produktion proinflammatorischer Cytokine, die Expression von kostimulatorischen Molekülen und die Antigenpräsentation hemmt (Pestka et al., 2004). Obwohl alle B-Lymphozyten über die Anlage verfügen IL-10 zu exprimieren, sind die Mechanismen, die *in vivo* zu einer Expression von IL-10 führen, nicht vollständig verstanden. In diesem Kontext gilt der TLR-Ligand (engl.: *toll like receptor*) als potentieller Stimulator (Barr et al., 2007).

Die Charakterisierung von Bregs ergibt sich als komplex, da es sich um eine heterogene Zellpopulationen handelt, die über eine hohe Diversität verfügt. Die meisten Untersuchungen hierzu sind am Menschen oder an der Maus durchgeführt worden. Dabei sind vorwiegend so genannte B10-Zellen untersucht worden, die in der Maus über CD19⁺, CD5⁺ und CD1d⁺ definiert werden, während sie im Menschen über die Marker CD19⁺, CD38⁺ und CD24⁺ charakterisiert sind. Beide Populationen sekretieren IL-10 (Blair et al., 2009; Mauri et al., 2003; Mizoguchi et al., 2002). Die Definition von Bregs ist mittlerweile weitaus komplexer, da im Zusammenhang mit der Sekretion von IL-10 auch weitere Breg-Populationen identifiziert worden sind, die über andere Oberflächenmarker verfügen (DiLillo et al., 2010; Iwata et al., 2011; Wood et al., 2012).

Die Entwicklung der regulatorischen B-Zellen ist weitgehend unklar. Lampropoulou und Kollegen postulieren, dass Bregs aus naiven folliculären B-Zellen (FO B-Zellen) entstehen (Lampropoulou et al., 2008). Entgegengesetzt dazu wurden in FO B-Zellen nur geringe IL-10-Konzentrationen, im Vergleich

zu anderen Populationen, nachgewiesen (Evans et al., 2007). Andere Publikationen gehen davon aus, dass sich IL-10-sekretierende B-Zellen aus den Marginal Zone B-Zellen (MZ B-Zellen) entwickeln (Dalwadi et al., 2004; Su et al., 2003; Mauri & Bosma, 2012). Allerdings scheint die exakte Herkunft der Bregs noch nicht endgültig geklärt zu sein.

Wie in Abbildung 2 gezeigt, sind Bregs durch eine Reihe von Effektormechanismen gekennzeichnet, die sich auf diverse Zellarten auswirken und dadurch eine Beeinflussung der Immunantwort vornehmen können (Fillatreau et al., 2008; Lemoine et al., 2009; Mauri & Bosma, 2012). Die Stimulation von potentiell IL-10-sekretierenden B-Zellen erfolgt über TLR, wie bereits zuvor erwähnt. Sodass es zu einer ersten Sekretion von IL-10 der Bregs kommt. Die Entzündungsreaktion ergibt automatisch auch eine Aktivierung von autoreaktiven T-Zellen und eine Verfügbarkeit zusätzlicher Epitope der Antigene. Dadurch erlangen Bregs ihre Aktivierungsmarker, wie z.B. CD40, BCR, CD80-CD86, und steigern die Produktion von IL-10 (Mauri & Bosma, 2012). Dies löst die Differenzierung von CD4⁺ T-Zellen in regulatorischen T-Zellen aus (Mann et al., 2007; Carter et al., 2011). Darüber hinaus wirkt IL-10 inhibierend auf die Differenzierung von T_H1- und T_H17-Zellen, sowie auf die Aktivierung von Monocyten (vgl. Abbildung 2).

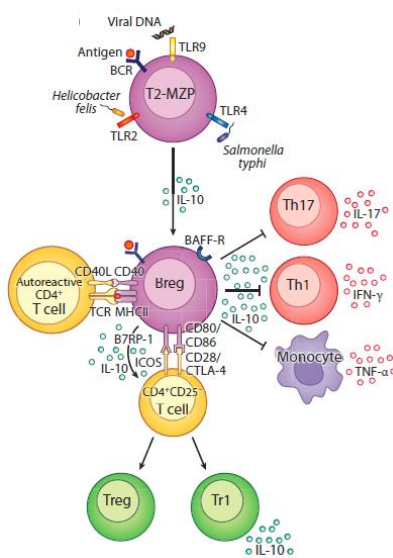


Abbildung 2: Funktionelle Effektormechanismen von regulatorischen B-Lymphozyten. Modifizierte Darstellung nach Mauri & Bosma der bisher bekannten Einflüsse von Bregs auf T-Zellen, Monocyten und B-Zellen, bildlich gezeigt wird die inhibitorische (⊖) und aktivierende (→) Wirkung von Bregs durch die Sekretion von unter anderem Interleukin 10 (Mauri & Bosma, 2012).

Die Aktivität von regulatorischen B-Zellen konnte sowohl im Kontext der Autoimmunkrankheiten, als auch in Verbindung mit Infektionen nachgewiesen werden, weshalb davon auszugehen ist, dass es bei der Aktivierung zur Interaktion mit verschiedenen Stimuli kommt.

Die Stimulierung von Bregs in Mensch und Maus scheint etwas unterschiedlich abzulaufen. Demnach führt in der Maus die Stimulation von TLR2 und TLR4 zu funktionsfähigen Bregs bei der Bekämpfung von EAE (engl.: *experimental autoimmune encephalomyelitis*), während im Menschen eine Aktivierung von TLR9 und Anti-BCR diese Funktion übernehmen (Bouaziz et al., 2010; Lampropoulou et al., 2010). In Mäusen ist für die Aktivierung von IL-10⁺ Bregs ebenfalls eine Stimulation von CD40 nötig, da CD40-defiziente Mausmodelle keine regulatorische B-Zell-Population ausbilden konnten (Fillatreau et al., 2002; Kehry, 1996). Dies konnte im humanen Kontext nicht beobachtet werden (Banchereau et al., 1991). Es hat sich gezeigt, dass zur Induktion von Bregs vermutlich mehrere Schritte der Aktivierung involviert sind. Der Beginn der Bregs-Aktivierung wird vornehmlich von TLR-Signalen induziert. Zur Gewährleistung der Ausbreitung und des Überlebens von regulatorischen B-Lymphozyten ist jedoch eine Interaktion von CD40 und BCR essentiell (Lampropoulou et al., 2010). Sowohl im Menschen als auch in der Maus scheint darüber hinaus auch IL-21 eine Rolle zu spielen, die allerdings noch nicht vollständig geklärt ist (Lindner et al., 2013).

Bisher gibt es erst wenige Publikationen zum Einfluss von regulatorischen B-Lymphozyten auf die Transplantatabstoßung. Sowohl in Tiermodellen als auch im humanen Kontext konnte der Einfluss von regulatorischen B-Zellen nachgewiesen werden. Parker und Kollegen lieferten den ersten Beweis für eine potentielle Rolle von Bregs im Zusammenhang mit induzierter Transplantattoleranz. In dem verwendeten Mausmodell zeigten die Tiere mit injizierten B-Zellen und CD40-Liganden-blockierende Antikörper ein höheres Transplantatüberleben (Parker et al., 1995). Nimi et al. konnten die Rolle der B-Zellen in der Toleranzinduktion nach Blockierung der CD40-CD40L-Interaktionen bestätigen (Nimi et al., 1998). Durch die Blockierung des Proteins

TIM-1 (engl.: *T cell immunoglobulin and mucin domain*) konnten steigende IL-10-Level und damit auch eine erhöhte Toleranz gegenüber des Transplantats bewiesen werden (Ding et al., 2011). Eine Depletion der regulatorischen T-Zellen mittels eines Anti-CD25-Antikörpers führte, trotz der Verwendung von Anti-TIM-1-Antikörper, wiederum zu einer erhöhten Abstoßung. Zur Toleranzinduktion scheinen also sowohl Interleukin 10 als auch regulatorische T-Zellen essentiell zu sein (Lee et al., 2012).

Patienten, die über einen längeren Zeitraum eine Transplantattoleranz zeigten, exprimierten höhere Level der Marker CD1d und CD5, die mit regulatorischen B-Zellen in Verbindung gebracht werden (Pallier et al., 2010). Newell und Kollegen konnten ebenfalls steigende IL-10-Level in toleranten Patienten nachweisen. Demnach zeigten Transitional B-Zellen eine höhere IL-10-Ausschüttung in Patienten ohne Abstoßungsreaktionen, als in Patienten mit akuter Abstoßung oder in gesunden Patienten (Newell et al., 2010; Chesneau et al., 2013). Silva et al. bestätigen diese These anhand der Untersuchung von Patienten mit akuter Abstoßung nach einer Nierentransplantation. Dort sind weniger IL-10⁺ B-Zellen nachgewiesen worden, als in gesunden Patienten (Sila et al., 2012). Demnach scheint IL-10 sowohl im Menschen, als auch bei Nagetieren, eine zentrale Rolle in der Immunsuppression sowie Transplantattoleranz einzunehmen und spezifisch für regulatorische B-Zellen zu sein.

1.4. Nierentransplantation und Abstoßungsreaktionen

Zur Behandlung einer terminalen Niereninsuffizienz gilt die Nierentransplantation (NTX) als Gold-Standard und Mittel der Wahl, da sie im Vergleich zur Dialyse, sowohl eine höhere Lebensqualität als auch eine geringere Sterblichkeit ermöglicht, und niedrigere Kosten verursacht (Magee & Pascual, 2008). Weltweit wurden im Jahr 2012 etwas mehr als 100.000 Organe transplantiert, am häufigsten davon Nieren (78.000). Innerhalb der EU sind etwa 30 % der weltweiten Transplantationen durchgeführt worden. Hier standen Ende 2013 86.000 Patienten auf der Warteliste für ein Organ, von denen die

meisten auf eine Niere warten. (EU, 2014). In der Transplantationsmedizin konnte in den letzten Jahren deutliche Fortschritte erreicht werden. So lag die durchschnittliche Überlebenserwartung nach einer Nierentransplantation in den Siebzigern noch bei 60 % im ersten Jahr, während es 2013 schon 96 % waren. Jedoch liegt die Wahrscheinlichkeit zu sterben, für einen Patienten, der ein Transplantat erhalten hat, so hoch als wäre er unter normalen Lebensumständen bereits 30 Jahre älter (Chapman, 2013). Trotz des Einsatzes von Immunsuppressiva nach einer Transplantation, kommt es immer wieder zu Abstoßungen, insbesondere bei Patienten, die schon einmal ein Transplantat erhalten haben, oder durch andere Umstände, z.B. Schwangerschaften sensibilisiert sind. Das Überleben eines Nierentransplantats liegt bei durchschnittlich 10,6 Jahren und nimmt mit der Anzahl der stattgehabten Transplantationen ab (Heidelberg, 2013). Ziel ist daher die Organfunktion so lange wie möglich zu erhalten.

Die Abstoßung eines Transplantats erfolgt aufgrund verschiedener immunologischer Reaktionen und kann einen Funktionsverlust hervorrufen. Aufgrund der fremden Antigene des Spenders erfolgt immer eine Immunantwort des Empfängers, die chronisch zu einem Funktionsverlust führen oder eine akute Abstoßung bewirken kann. Die Art der Rejektion wird anhand des zeitlichen Eintretens und des Verlaufs eingeteilt (Salisbury et al., 2014).

Die akute Rejektion ist der häufigste Grund für eine Transplantatabstoßung und tritt meist innerhalb weniger Wochen ein (Chinen & Buckley, 2010). Die chronische Rejektion tritt erst nach Monaten oder Jahren auf und ist durch eine fortschreitende Vernarbung des Transplantats gekennzeichnet (IFTA, siehe Banff Quelle). Diese entsteht durch eine erhöhte Kollagenproduktion der Fibroblasten, sowie Zellproliferation der glatten Muskelfasern (Solez et al., 1993). Chronische Abstoßung wird außerdem mit einer erhöhten Immunantwort durch T-Lymphozyten assoziiert (Baker et al., 2001). Das Ausmaß der Abstoßung wird anhand der Banff-Kriterien klassifiziert und in unterschiedliche Stufen eingeteilt (Haas et al., 2014).

1.5. *Major Histocompatibility Complex* im congenen Rattentransplantationsmodell

Für die Differenzierung zwischen fremd und selbst ist der *Major Histocompatibility Complex* (MHC) zuständig. Der MHC wird beim Menschen auch HLA (engl.: *Human Leucocyte Antigen*) genannt und die entsprechenden Gene befinden sich auf Chromosom 6. Die exprimierten MHC-Komplexe definieren die Zellen als körpereigen (Calabi & Milstein, 1986). Anhand des MHC-I-Komplexes können mit Viren infizierte Zellen oder krebsartige Zellen identifiziert werden. Der MHC-II-Komplex wird nur von wenigen Zelltypen, wie dendritischen Zellen, Makrophagen und B-Lymphozyten, exprimiert. Er bindet vorwiegend körperfremdes Material, das von cytotoxischen T-Lymphozyten sowie T-Helferzellen erkannt wird (Karre.K., 2003). Eine allogene Transplantation bezeichnet eine Transplantation, die zwischen zwei Individuen einer Art durchgeführt wird. Anhand der MHC-Komplexe auf den Zelloberflächen kann das Immunsystem auch allogene MHC-Moleküle des Transplantats detektieren. Die T-Zellen des Empfängers erkennen die MHC-Antigene als fremd, sodass eine Alloreaktivität und damit einhergehende Transplantatabstoßung verursacht wird (Hernandez-Fuentes & Novel, 1999). Deshalb erfolgt im Menschen immer eine Behandlung mit Immunsuppressiva. Um Experimente zu Abstoßungsreaktionen durchführen zu können, wurde das Rattentransplantationsmodell ohne Immunsuppression von Pöhnert und Kollegen verwendet (Poehnert et al., 2010).

1.6. Die Ratte als Transplantationsmodell

Zur Untersuchung des Transplantatversagens und der Wirkung eines Anti-CD20-Antikörpers ist ein MHC-inkompatibles Rattentransplantationsmodell verwendet worden. Dies ermöglicht eine Analyse der immunologischen Mechanismen der Abstoßung unter standardisierten Bedingungen. Dazu wurde das Transplantationsmodell von Pöhnert et al. verwendet, das voll MHC-inkompatibel ist und über den identischen genetischen Hintergrund verfügt. Es

ist ein Nierentransplantationsmodell eingesetzt worden, das auf der Basis zweier MHC-congene Rattenstämme aufbaut (Poehnert et al., 2010). Dies ermöglicht relevante Untersuchungen, die am Patienten nicht möglich wären, da keine standardisierten Bedingungen vorliegen und viele unbekannte Variablen die Ergebnisse beeinflussen, sodass keine zuverlässigen Aussagen über die Interaktion von B- und T-Lymphozyten im Zusammenhang mit einer B-Zell-Depletion nach einer Nierentransplantation ermöglicht würden.

Die Ratte verfügt über ein ähnliches Immunsystem wie der Mensch. Neben dem B-Zell-Marker CD20, sind auf B-Lymphozyten auch Isoformen des humanen CD45 zu finden (Qin et al., 2011). Der MHC-Komplex in der Ratte unterscheidet sich marginal vom humanen MHC-Komplex. Wie auch in der Maus, verfügt der MHC-I über zwei Regionen: die telomerwärts gelegene RT1.C-Region und die centromere RT1.A-Region. RT1.B/D repräsentieren den MHC-II-Komplex (Dressel et al., 2002).

1.7. Rituximab und seine Anwendung zur Behandlung der Transplantatrejektion

Rituximab ist ein chimärer monoklonaler Anti-CD20-Antikörper, der aus einer humanen konstanten Region des IgG1 κ (Fc) und einer variablen Region (Fv) des murinen Anti-CD20-Antikörpers hergestellt wird. CD20 ist auf späten prä-B-Zellen und reifen B-Zellen exprimiert, nicht jedoch auf Stammzellen, frühen Vorläufer-B-Zellen und ausdifferenzierten Plasmazellen (Boye et al., 2003). CD20 ist vermutlich in der Regulation der B-Zell-Aktivierung, Proliferation und Differenzierung involviert. (Tedder & Engel, 1994).

Rituximab (MabThera® von Roche, EU, Rituxan® von Genentech, USA) ist 1997 von FDA zur Anwendung als Therapeutikum gegen maligne Lymphome zugelassen worden (Cragg et al., 2005). Später ist es auch für die Therapie von rheumatischer Arthritis lizenziert worden (Barnett et al., 2013). Zusätzlich wird Rituximab als Medikament in anderen Autoimmunerkrankungen getestet. Momentan ist Rituximab nicht für die Behandlung nach Nierentransplantationen

zugelassen, jedoch wird es auf *Off-Label*-Basis verwendet. Bisher sind keine Phase II- oder III-Studien durchgeführt worden und die Datenlage wird kontrovers diskutiert (Zaza et al., 2014).

Da Rituximab keine Plasmazellen depletiert, beeinflusst es auch nicht direkt die Antikörpersekretion. Dennoch zeigt es vermutlich eine Wirkung aufgrund der Depletion von B-Lymphozyten, die als APC eine Relevanz für die Transplantatrejektion haben könnten.

1.8. Zielsetzung

Ziel dieser Arbeit ist es, den Einfluss einer CD20⁺ B-Zell-Depletion näher zu charakterisieren. Dies wird in einem Rattentransplantationsmodell durchgeführt, in dem ebenfalls erste Untersuchungen zu regulatorischen B-Zellen stattfinden, welche zuvor ausschließlich im Menschen und in der Maus charakterisiert worden sind. Dazu ist ein Antikörper gegen CD20 für Ratten verwendet worden, der ebenfalls, wie Rituximab im Menschen, CD20⁺ B-Zellen depletiert.. In diesem Kontext wird ein besonderes Augenmerk auf die Entwicklung der B-Lymphozyten gelegt. Dabei sollen folgende Fragestellungen untersucht werden:

1. Ändert sich die Zusammensetzung der B-Zell-Subtypen durch die Depletion von B-Lymphozyten?
2. Inwiefern beeinflusst die IgM-Expression den Erfolg der Depletion?
3. Führt eine Anti-CD20-Behandlung auch zur Depletion von regulatorischen B-Zellen?
4. Nimmt die B-Zell-Depletion Einfluss auf regulatorischen T-Zellen?
5. Beeinflusst eine B-Zell-Depletion die Entwicklung von T-Lymphozyten und NK-Zellen?
6. Welche Zellinfiltrate sind vorwiegend in den Transplantaten immunhistologisch nachweisbar und unterscheidet sich die Zusammensetzung der Infiltrate der beiden Versuchsgruppen?

2. MATERIAL & METHODEN

2.1. Genehmigung der Tierversuche

Die Tierversuche waren vor Projektbeginn gemäß dem Tierschutzgesetz von der zuständigen Behörde unter dem Aktenzeichen G11/046 genehmigt worden. Ich habe im Januar 2015 erfolgreich an dem Kurs „Tierexperimentelles Arbeiten mit der Maus I“ des Universitätsklinikums Hamburg-Eppendorf teilgenommen. Eine Durchführung der Tierversuche erfolgte nach den Richtlinien der EU.

2.2. Tiermodell

Für die Versuche sind aus der Inzucht stammende männliche Lewis-Ratten verwendet worden, die von der Medizinischen Hochschule Hannover bezogen worden sind. Die Tiere wurden nach entsprechenden Vorgaben in der Versuchstierhaltung des Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf gehalten. Es sind konstante Bedingungen durch einen standardisierten Tag-Nacht-Rhythmus und entsprechende atmosphärische Bedingungen gewährleistet. Außerdem hatten die Tiere allzeit ausreichend Nahrung und Wasser zur Verfügung.

Für die Experimente sind zwei unterschiedliche Lewis-Stämme (LEW) verwendet worden, die über den gleichen genetischen Hintergrund verfügen und sich lediglich in den MHC-Haplotypen unterscheiden (Tabelle 1).

Tabelle 1: MHC-Haplotypen der MHC congenen LEW-Stämme

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

Es sind drei verschiedene Versuchstiergruppen generiert worden, die zum Teil eine Immunsuppression erhielten. Dazu ist ein monoklonaler Mouse anti-rat CD20-Antikörper (Genentech, CD20 ID: OR-211486) verwendet worden, der eine Ausgangskonzentration von 20 mg/ml hatte und 1:10 mit Natriumchlorid verdünnt wurde. Die Lagerung erfolgte bei -80 °C. Den Versuchstieren wurde entsprechend ihres Gewichts 1mg/kg injiziert. Am Ende des Versuches sind den Tieren aus Versuchsgruppe 2 und 3 Leber, NTX-Niere, Milz und Lymphknoten entnommen worden.

Versuchsgruppe 1 „Anti-CD20“ (n=2): LEW-Normaltiere + anti-CD20

In dieser Gruppe haben die Versuchstiere an Tag 0 (d0) den B-Zell-depletierenden Antikörper anti-CD20 intravenös erhalten. Die Tiere sind in Woche 4 beziehungsweise Woche 7 getötet worden. Das Tier in Woche 7 wurde planmäßig aus dem Versuch genommen. Das Tier in Woche 4 ist tot aufgefunden worden.

Versuchsgruppe 2 „Allo“ (n=3):LEW + allogene Nierentransplantation (LEW.1W → LEW)

Die allogene Nierentransplantation erfolgte an Tag 0. Die Tiere wurden alle planmäßig in Woche 4 getötet und haben keine Immunsuppression erhalten.

Versuchsgruppe 3 „Allo Anti-CD20“ (n=5): LEW + allogene Nierentransplantation (LEW.1W → LEW) + anti-CD20

Die allogene Nierentransplantation erfolgte ebenfalls an Tag 0. An Tag 7 haben die Tiere den Antikörper anti-CD20 intravenös erhalten. Alle Tiere sind planmäßig in Woche 4 getötet worden.

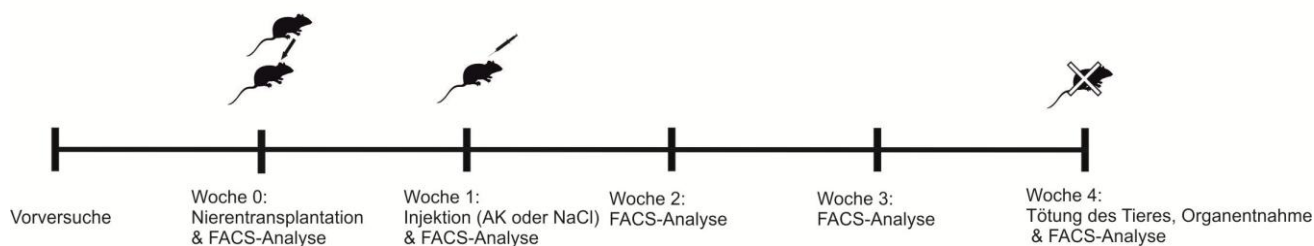


Abbildung 3: Dargestellt ist der planmäßige Aufbau der Versuche in Wochen, beginnend mit den Vorversuchen und der Nierentransplantation (LEW.1W → LEW) in Woche 0; in Woche 1 wird dem Tier der anti-CD20-Antikörper (AK) oder Natriumchlorid (NaCl) intravenös gespritzt; Versuchsende wurde auf Woche 4 gelegt und dem Tier werden NTX-Niere, Milz, Lymphknoten und Knochenmark entnommen und mittels Durchflusszytometrie und immunhistologischen Färbungen analysiert, wöchentlich erfolgt zusätzlich die FACS-Analyse der Lymphozyten aus dem peripheren Blut.

2.3. Überwachung des Allgemeinzustandes der Versuchstiere

Vor der Transplantation wurde das Gewicht der Tiere regelmäßig kontrolliert. Alle Versuchstiere hatten zum Zeitpunkt der Transplantation ein Körpergewicht von 200-300 g. Im Anschluss an die Transplantation und im Verlauf des Versuchs bis zum Tötungszeitpunkt wurden, neben dem Körpergewicht, auch Parameter wie Körperhaltung, Bewegung, Fell, Ausscheidung und Nahrungsaufnahme überwacht. Unter entsprechenden Umständen sind die Tiere aufgrund eines schlechten Allgemeinzustandes vorzeitig aus dem Versuch genommen worden.

2.4. Probengewinnung

Retrobuläre Blutentnahme

Die Blutentnahme erfolgte retrobulär unter Isofluran-Narkose. Sobald das Tier betäubt war, wurde eine Glaskapillare am Augenwinkel der Ratte eingeführt. Die Glaskapillare wurde hinter dem Augapfel entlang geführt und im retrobulär gelegenen Venenkomplex eingestochen, sodass das Blut in einem Heparin-Röhrchen aufgefangen werden konnte.

Material

Isofluran	Abbott
Glaskapillaren	Brand
Eppendorf Tubes 1,5 ml	Eppendorf
EDTA-Röhrchen	Sarstedt

Isolierung von Lymphozyten aus Milz, Knochenmark und Lymphknoten

Die Ratte wird am Ende des Versuchs mit CO₂ betäubt und durch eine Herzpunktion getötet. Zunächst wird die Milz entnommen und mit dem Skalpell in kleine Stücke geschnitten, die in einer Petrischale in X-Vivo-Medium kühl gelagert werden. Mithilfe eines Spritzenkolbens werden die Stücke der Milz durch einen 70 µm Cellstrainer gesiebt und mit X-Vivo-Medium in ein 50 ml Falcon gespült. Die Zellsuspension wird in insgesamt 50 ml X-Vivo-Medium aufgenommen. Dem Tier werden außerdem ungefähr 20 bis 30 Lymphknoten entnommen, die ebenfalls in einer Petrischale gefüllt mit X-Vivo-Medium weiterverarbeitet werden. Wichtig ist hierbei die Zerstörung der Lymphknotenkapsel mithilfe einer Pinzette, um das Austreten der Zellen in das Medium zu ermöglichen. Die so gewonnenen Lymphozyten werden mit einer sterilen Pipette in einen 70 µm Cellstrainer überführt und nach gleicher Methode, wie zur Aufbereitung der Milz, verarbeitet. Zur Isolierung der Leukozyten aus dem Knochenmark muss ein Oberschenkelknochen entnommen werden, der vollständig von Muskelfasern befreit wird. Die Epiphysen werden mit einer Schere entfernt, sodass nur die Diaphyse erhalten bleibt. Durch in einer 10 ml Spritze aufgenommenes PBS wird das Mark aus der Diaphyse in den 40 µm Cellstrainer gespült bis kein Mark im Knochen mehr sichtbar ist. Zur Herstellung der Zellsuspension wird genauso, wie bereits beschrieben, vorgegangen. Allerdings erfolgt hier die Suspension in PBS. Nach Herstellung der Zellsuspensionen werden alle Proben bis zur Weiterverarbeitung auf Eis gelagert. Im Anschluss werden alle Proben für 10 min bei 1500 rpm und 4 °C zentrifugiert. Die Zellsuspensionen aus Milz und Knochenmark werden im Anschluss erylysiert. Dazu wird das Zellpellet aus der

Milz in 25 ml Erylysepuffer aufgenommen und das Zellpellet aus dem Knochenmark in 5 ml. Die Inkubation erfolgt für 5 min bei 4 °C. Die Zellsuspension des Knochenmarks wird im Anschluss ebenfalls auf 25 ml mit PBS aufgefüllt und es folgt ein weiterer Zentrifugationsschritt unter oben beschriebenen Bedingungen. Alle drei Proben werden im Anschluss noch zwei weitere Male zentrifugiert und jeweils in 20 ml X-Vivo-Medium (Milz & Lymphknoten) bzw. PBS (Knochenmark) gewaschen. Am Ende wird die Lebendzellzahl, anhand der unter 2.4.2 beschriebenen Methode, bestimmt.

Material

Medium X-Vivo	Lonza
PBS	Gibco Life Technologies
Zentrifugationsröhrchen 50 ml	BD Falcon
Petrischalen	Nunc
Cellstrainer 40 µm	BD Falcon
Cellstrainer 70 µm	BD Falcon
Einmalspritze 10 ml	Braun
Einmalspritze 2 ml	Braun
Centrifuge 5804R	Eppendorf
Cleanbench HeraSafe	Heraeus

Erylysepuffer (pH 7,5):

NH ₄ Cl	155 mM
KHCO ₃	10 mM
EDTA	1 mM
dH ₂ O	1000 ml

2.4.1. Leukozytenisolierung aus peripherem Blut

Im Verhältnis von 1:10 wurde dem EDTA-Blut Erylysepuffer zugegeben, wodurch es zur Lyse der Erythrozyten kommt. Dies erfolgt bei einer fünfminütigen Inkubationszeit bei 4 °C und anschließender Zentrifugation bei 1500 rpm und 4 °C für 10 min. Der Überstand wurde verworfen. Im Anschluss wurde das Zellpellet in 10 ml Medium 199 gelöst und bei gleichen Bedingungen zentrifugiert. Dieser Vorgang wurde noch einmal wiederholt. Nach dem letzten

Waschschritt ist der Überstand verworfen worden und das Zellpellet wurde in FACS-Waschpuffer suspendiert.

Material

Medium 199	Gibco Life Technologies
Centrifuge 5804R	Eppendorf
Zentrifugationsröhrchen 50 ml	BD Falcon

Erylysepuffer (pH 7,5):

NH ₄ Cl	155 mM
KHCO ₃	10 mM
EDTA	1 mM
dH ₂ O	1000 ml

FACS-Waschpuffer:

PBS	9,55 g
BSA	5 g
NaN ₃	1g
dH ₂ O	1000 ml

2.4.2. Bestimmung der Zellzahl und Vialbilität

Die Bestimmung der Leukozytenzahl erfolgte durch eine 1:20 Färbung des Vollbluts mit der Türk'sche-Lösung. Dabei werden die Erythrozyten durch eine stark hypotone Essigsäurelösung zerstört. Die Leukozyten hingegen werden mit Gentianaviolett angefärbt und können dann in einer Zählkammer ausgezählt werden. Mithilfe einer 1:10 Trypan-Blau-Färbung der Zellsuspension kann die Zellviabilität bestimmt werden. Es handelt sich dabei um einen sauren Farbstoff, der an Proteine bindet und selektiv in Zellen mit geschädigter Membran aufgenommen wird. Die lebenden Zellen werden ebenfalls durch Auszählen in der Zählkammer bestimmt. Es sind jeweils vier Großquadrate mit 16 Kleinquadraten ausgezählt worden. Anhand folgender Formel kann im Anschluss die Zellzahl als auch die Viabilität berechnet werden:

$$\frac{\text{Summe der Großquadrate}}{\text{Anzahl der Großquadrate}} * \text{Verdünnungsfaktor} * \text{Kammerfaktor} = \text{Zellzahl/ml}$$

Material

Neubauer Zählkammer	Marienfeld
Türks Lösung	Merck
Trypanblau	Invitrogen Life Technologies
Lichtmikroskop Wilovert S	Helmut Hund GmbH

2.5. Durchflusszytometrische Analyse der Lymphozytenpopulationen

Für die durchflusszytometrische Analyse wurde ein FACS Canto (BD) mit einem Argonionenlaser (488 nm) und einem HeNe-Laser (633 nm) verwendet. Detaillierte Erklärungen zum Prinzip der Durchflusszytometrie sind in „Zelluläre Diagnostik“ von Sack et al, zu finden(Sack, et al., 2006). Bei dieser Methode werden die Zellen von einem Laser fokussiert und deren Streulicht, als auch ihre Fluoreszenz gemessen. Bei dem gestreuten Licht wird zwischen dem so genannten „Forwardscatter“ (FSC) und dem „Sidescatter“ (SSC) unterschieden. Anhand des FSC können Aussagen über die Zellgröße getroffen werden, während der SSC Information zur Granularität einer Zelle liefert. Dies ermöglicht die Differenzierung einiger Zellarten, wie beispielsweise Lymphozyten und Granulozyten. Um eine Zelle näher spezifizieren zu können, werden diese mit fluoreszenz-gekoppelten Antikörpern markiert. Dies erlaubt die Markierung spezifischer Marker auf der Oberfläche oder intrazellulär, sodass eine detailliertere Aussage über eine Zellpopulation getroffen werden kann. Die vom Detektor ermittelte Anzahl der jeweiligen Zellen kann in Dotplots oder Histogrammen angezeigt werden. Dies ermöglicht Aussagen über die Häufigkeit entsprechender Eigenschaften innerhalb einer Zellsuspension. Eine Auswertung der Daten erfolgte mit der Software FlowJo von der Firma Tree Star® Inc. und FACSDiva von der Firma BD.

2.5.1. Immunfluoreszenzfärbung von Oberflächenmarkern

Zunächst wird die Zellsuspension für 10 min bei 1500 rpm und 4 °C herunterzentrifugiert und anschließend zweimal in Medium 199 aufgenommen und bei gleichen Bedingungen zentrifugiert. Je nach Größe des Zellpellets wird es in 1-3 ml FACS-Waschpuffer gelöst und entsprechendes Volumen (~ 100 µl), das anhand der Zellzahl ($1 \cdot 10^5$ – $1 \cdot 10^6$ Zellen/Well) ermittelt wurde, in eine 96-Well-Plate pipettiert. Anschließend wurden 100 µl FACS-Waschpuffer auf die Zellen gegeben, für 30 sec gevortext und für 2 min bei 1500 rpm und 4 °C zentrifugiert. Der Überstand wurde ausgeschlagen. Entsprechend der ermittelten Verdünnung wurden die Antikörper (Tabelle 2) auf die Wells verteilt und für 30 sec gevortext. Eine Inkubation erfolgte für 15 min bei 4 °C im Dunkeln. Es folgen zwei weitere Waschvorgänge mit FACS-Waschpuffer, vortexen und anschließender Zentrifugation wie oben beschrieben, bevor die Zellpellets in 100-200 µl FACS-Waschpuffer gelöst und in FACS-Röhrchen überführt werden. Im Anschluss erfolgt die Messung.

2.5.2. Intrazelluläre Immunfluoreszenzfärbung

Zur intrazellulären Färbung von FoxP3 und IL-10 sind zwei verschiedene Protokolle verwendet worden. Die FoxP3-Analyse erfolgte mit erylysiertem Blut, wie zuvor beschrieben. Nach der Färbung der Oberflächenmarker, erfolgt eine 20-minütige Inkubation bei Raumtemperatur mit Fix/Perm-Puffer. Nach zwei Waschvorgängen folgt eine Inkubation für 15 min bei Raumtemperatur mit Perm-Puffer und nach zwei weiteren Waschvorgängen erfolgt die Inkubation mit den Antikörpern gegen FoxP3 (Tabelle 2) und dessen Isotypkontrolle für 15 min bei Raumtemperatur. Die entsprechenden Antikörpervolumina werden in jeweils 100 µl Perm-Puffer in die Wells gegeben. Zum Schluss folgen wiederum zwei Waschschritte und ein Lösen des Zellpellets in 100µl FACS-Waschpuffer.

Zur Färbung von IL-10 wird Heparin-Vollblut zunächst mit Lipopolysaccharid für 4 h bei 37°C und 5 % CO₂ im Brutschrank stimuliert. Im Anschluss erfolgt die Färbung der Oberflächenmarker. Die Lyse der Erythrozyten wird in diesem Protokoll mit der FACS-Lysis Solution durchgeführt und für 10 min bei Raumtemperatur inkubiert. Die Waschschrte sind ähnlich wie zuvor. Nur wird stattdessen ein Volumen von 1 ml PBS verwendet und die Zentrifugationszeiten betragen 5 min. Nach zweimaligem Waschen werden die Zellen zur Fixierung für 45 min bei Raumtemperatur mit Fix/Perm-Puffer inkubiert. Nach zwei weiteren Waschschrten wird der IL-10-Antikörper und seine Isotypkontrolle (Tabelle 2) in 100 µl Perm-Puffer für 30 min bei Raumtemperatur auf die Zellen gegeben. Nach finalen zwei Waschgängen werden die Zellen in 200 µl PBS suspendiert und können gemessen werden.

Tabelle 2: Verwendete Antikörper zur FACS-Analyse, dargestellt sind der Antikörper, sowie dessen Klon, das zugehörige Fluorochrom, die Herstellerkonzentration sowie die eingesetzte Verdünnung und das Volumen.

Antikörper	Klon	Fluorochrom	Hersteller	Konzentration	Verdünnung	Volumen
CD3	1F4	FITC	BioLegend	0,5 mg/ml	1:40	10 µl
CD4	W3/25	PE	BioLegend	0,2 mg/ml	1:200	10 µl
CD4	W3/25	FITC	BioLegend	0,5 mg/ml	1:80	10 µl
CD8a	OX-8	APC	eBioscience	0,2 mg/ml	1:40	10 µl
CD25	OX-39	PE	BioLegend	0,2 mg/ml	1:20	10 µl
CD45	OX-1	PE/Cy7	BioLegend	0,2 mg/ml	1:40	10 µl
CD45RA	OX-33	PE	BioLegend	0,2 mg/ml	1:100	10 µl
CD161	Okt 78	APC	BioLegend	0,5 mg/ml	1:40	10 µl
IL-10	A5-4	AlexaFluor647	BD	0,2 mg/ml	1:30	10 µl
FOXP3	150D	AlexaFluor647	BioLegend	50 µg/ml	1:2	5 µl
IgG1	MOPC-21	AlexaFluor647	BioLegend	0,5 mg/ml	1:20	5 µl
IgG1	MOPC-21	PE	BioLegend	0,2 mg/ml	1:20	10 µl
IgG	Polyklonal	FITC	Dianova	1,5 mg/ml	1:40	10 µl
IgM	MRM-47	FITC	BioLegend	0,5 mg/ml	1:40	10 µl
IgD	MARD-3	Biotin	Serotec	0,5 mg/ml	1:1000	10 µl

2.6. Differenzialblutbild

Zur Erstellung von Blutausrichen wurden 5 µl Heparin-Vollblut auf einen Objektträger gegeben und anschließend mit einem Deckgläschen ausgestrichen. Der Objektträger trocknete mindestens 30 min an der Luft bevor die Zellen gefärbt werden konnten. Die Blutausriche wurden mit der Pappenheim-Färbung eingefärbt. Demnach sind die Objektträger zunächst für

3 min mit der May-Grünwald-Lösung bei Raumtemperatur unter dem Abzug inkubiert worden. Im Anschluss erfolgt eine 3-minütige Inkubation mit dH₂O und danach die finale Färbung durch die Giemsa-Lösung für 15 Minuten. Nach abschließendem Waschen mit dH₂O können die Blutausrichhe über Nacht unter dem Abzug trocknen und am nächsten Tag mit Entellan eingedeckelt werden. Sodass im Anschluss die Auswertung des Differentialblutbildes unter dem Mikroskop erfolgen kann und pro Blutausrichhe 100 Zellen ausgezählt werden. Daraus wird der prozentuale Anteil von Lymphozyten, Granulozyten und Monozyten bestimmt. Anhand der ermittelten Leukozytenzahl durch die Türks-Färbung (vgl. Kapitel 2.4.2) kann auch der absolute Wert für die Lymphozyten berechnet werden.

2.7. Immunhistologische Analyse der Zellinfiltrate

Zur immunhistologischen Untersuchung ist ein Teil der transplantierten Niere nach Ende des Versuchs bei -80 °C kryokonserviert worden und zur Anfertigung von Kryoschnitten in Tissue Tek eingebettet worden. Am Kryostaten sind bei -25 °C 5 µm Schnitte auf Objektträgern angefertigt worden. Die Schnitte wurden bei Raumtemperatur über Nacht getrocknet. Bevor die Schnitte gefärbt werden konnten, wurden sie zunächst bei -20 °C in Aceton für 10 min fixiert und anschließend für maximal 10 min unter dem Abzug getrocknet. Die Schnitte wurden in eine Feuchtekammer gelegt und sind zunächst für 10 min mit normalem Rattenserum geblockt worden. Anschließend ist das Rattenserum mit PBS abgespült worden und es folgte eine 45-minütige bei 4 °C Inkubation mit den entsprechenden Primärantikörpern (Tabelle 3). Im Anschluss sind die Kryoschnitte jeweils für 2 min mit PBS gewaschen worden. Die Inkubation mit dem Peroxidase-konjugierten Sekundärantikörper (rat anti-mouse IgG, 0,8 mg/ml, JacksonImmunoResearch) erfolgte für eine Stunde ebenfalls bei 4 °C. Der Sekundärantikörper ist bereits 1:2 mit Glycerol vorverdünnt und wurde anschließend mit PBS 1:10 verdünnt, sodass er eine finale Verdünnung von 1:20 erreicht. Zusätzlich ist noch Rattenserum mit einer Verdünnung von 1:50 hinzugegeben worden. Im Anschluss erfolgten wieder, wie zuvor beschrieben, zwei Waschgänge und die Inkubation mit der AEC-

Substratlösung für mindestens 20 min bei Raumtemperatur. Im Anschluss werden die Schnitte zweimal kurz mit Leitungswasser gespült, bevor sie für 2 min mit Hematoxylin gefärbt werden. Anschließend werden die Kryoschnitte für 10 min in Leitungswasser inkubiert, um die Färbung zu intensivieren. Die Schnitte müssen im Anschluss für mindestens 30 min trocknen.

Tabelle 3: Primärantikörper zur immunhistologischen Analyse der Zellinfiltrate in der transplantierten Niere.

Klon	Spezifität	Verdünnung	Gewebe	Konzentration	Hersteller
ED1	CD68-Rezeptor:Gewebemakrophagen, Monozyten dendritische Zellen	1:200/ 1:5000	Milz/ Niere	1 mg/ml	BMA Biomedicals
341	CD8-Rezeptor: cyt. T-Zellen	1:10	Milz	0,5 mg/ml	BD Pharmingen
R73	α/β -T-Zellrezeptor	1:5000	Milz/ Niere	0,5 mg/ml	BioLegend
KiB1R	B-Lymphozyten	1:100	Milz/ Niere	0,1 mg/ml	BMA Biomedicals
10/78	CD161-Rezeptor: NK-Zellen	1:5000	Niere	1 mg/ml	AbD Serotec

2.8. Statistische Auswertung

Die statistische Auswertung der Daten erfolgte mit OriginPro 8 der Firma OriginLab. Zum Vergleich zweier Gruppen ist ein unabhängiger T-Test verwendet worden.

3. ERGEBNISSE

3.1. Auswertung klinischer Parameter

Um den Gesundheitszustand der Tiere beurteilen zu können, sind verschiedene Parameter gemessen worden. Es wurden Körperhaltung, Bewegung, Nahrungsaufnahme, Ausscheidung und Körpergewicht täglich überprüft. Im Folgenden wird die Gewichtsentwicklung der Tiere gezeigt.

3.1.1. Gewichtsentwicklung

In Abbildung 4 ist das gemittelte Körpergewicht der Versuchsgruppen „Allo“ und „Allo Anti-CD20“ in Gramm dargestellt. In der Darstellung ist der Prä-Operationswert der Tiere an Tag 0 dargestellt, sowie im Folgenden die Gewichtsentwicklung beider Gruppen im Zweitagesrhythmus ab Tag 7. Nach der Transplantation nehmen beide Gruppen im Mittel zunächst ab. Etwas ab Tag 7 erholen sich die Tiere von der Operation und es beginnt langsam eine Gewichtszunahme. Der Vergleich beider Gruppen zeigt, dass die Tiere der „Allo Anti-CD20“-Gruppe im Mittel etwas schwerer sind und sich von der Transplantation aufgrund der B-Zell-Depletion schneller erholen haben, als die Gruppe der Tiere ohne Injektion der Anti-CD20-Antikörpers.

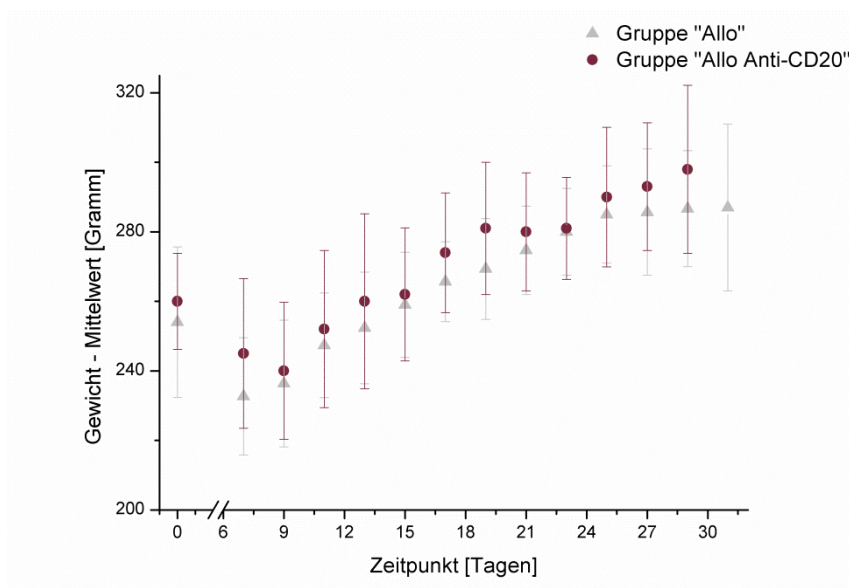


Abbildung 4. Gewichtsentwicklung der Gruppen „Allo“ und „Allo Anti-CD20“ im Vergleich. Dargestellt ist das Gewicht der jeweiligen Gruppe im Mittel mit Standardabweichung. Die Gewichtsentwicklung wurde ab Tag 7 bis zum Versuchsende dargestellt. Das Gewicht ist für jeden zweiten Tag dargestellt.

3.2. Etablierung von Markern zur Differenzierung von B-Lymphozyten

Um die einzelnen Subpopulationen von B-Lymphozyten näher zu charakterisieren, mussten zunächst geeignete Marker identifiziert werden. Die Recherche ergab eine sinnvolle Differenzierung von B-Zellen anhand der Immunglobuline M und D (IgM, IgD). Ähnliche Versuche wurden mit Ratten von Le Berre et al., 2014 publiziert, die anhand dieser Oberflächenmarker vier verschiedene Subtypen unterscheiden konnten: Naive Mature B-Zellen, Switched B-Zellen und Transitional 1 und 2 B-Zellen (Le Berre, et al., 2014). Versuche mit entsprechenden Verdünnungsreihen für jeden Antikörper ergaben eine optimale Verdünnung von 1:40 für IgM und von 1:1000 für IgD. In Abbildung 5 ist die Charakterisierung der Subpopulationen beispielhaft dargestellt. Naive Mature B-Zellen sind $\text{IgM}^{\text{medium}} \text{IgD}^{\text{medium}}$ positiv, Transitional 1 (T1) B-Zellen sind $\text{IgM}^{\text{medium}} \text{IgD}^{\text{low}}$ positiv, Transitional 2 (T2) B-Zellen sind für beide Marker high positiv und Switched B-Zellen sind für beide Marker negativ. Die Zellen sind außerdem mit einem Antikörper gegen CD45RA gefärbt worden,

sodass zur Charakterisierung ausschließlich CD45RA positive Zellen verwendet worden sind und es sich demnach um B-Lymphozyten handelt.

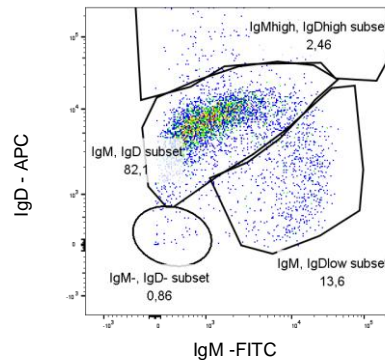


Abbildung 5: Differenzierung der B-Zell-Subpopulationen anhand der Marker IgM (X-Achse) und IgD (Y-Achse). Dargestellt sind die Subtypen Naive Mature B-Zellen ($IgM^{medium}IgD^{medium}$), Transitional 1 B-Zellen ($IgM^{medium}IgD^{low}$), Transitional 2 B-Zellen ($IgM^{high}IgD^{high}$) sowie Switched B-Zellen ($IgM^{low}IgD^{high}$).

Die Etablierung wurde an den Tieren der Gruppe „Anti-CD20“ durchgeführt, die keiner allogenen Nierentransplantation unterzogen worden sind, sondern nur an Tag 0 den Antikörper Anti-CD20 injiziert bekommen haben. Die Entwicklung der einzelnen Subtypen im Vergleich zur gesamten Lymphozytenzahl ist in den nachfolgenden Abbildungen dargestellt. In allen vier Subtypen tritt die Depletion in Woche 1 nach Versuchsbeginn ein. Danach erholen sich alle Populationen langsam. Die beiden Tiere sind über vier und sechs Wochen im Versuch gewesen, sodass sich die Daten für Woche 5 und 6 nur auf ein Tier beziehen.

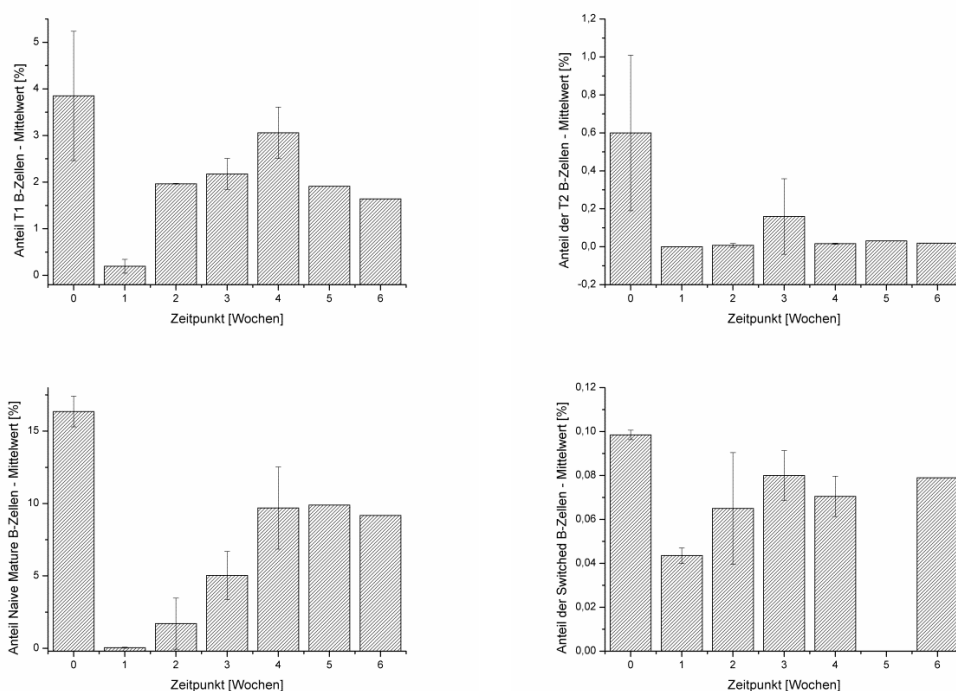


Abbildung 6: Verlauf der B-Zell-Subtypen in Anti-CD20 depletierten Tieren. Dargestellt sind die vier verschiedenen B-Zell-Populationen: T1 B-Zellen (oben links), T2 B-Zellen (oben rechts), Naive Mature B-Zellen (unten links) und Switched B-Zellen (unten rechts), die anhand der Marker IgM und IgD identifiziert worden sind.

Die Population der Transitional 1 B-Zellen (Abb. oben links) nehmen, wie erwartet, nach der Depletion in Woche 1 ab und erreichen mit 0,195 % im Mittel ihren tiefsten Wert. Danach erholt sich die Population langsam und steigt stetig bis sie mit 3,06 % in Woche 4 ihr Maximum erreicht und damit fast den Ausgangswert von 3,85 % erreicht hat. Danach sinkt der Anteil leicht. In Woche 6 hat das verbliebene Tier einen Wert von 1,64 % erreicht und liegt damit deutlich unter dem Wert vor der Depletion. Die Population der Transitional 2 B-Zellen wird vollständig depletiert und steigt dann wieder. Ab Woche 2 scheint die Population für die weiteren Wochen mehr oder weniger konstant zu sein. Der erhöhte Mittelwert in Woche 3 ist auf ein Tier zurückzuführen und wird als Ausreißer gewertet. Die Werte der Tiere schwanken bis zum Ende des Versuchs um etwa 0,016 %. Die Naiven Mature B-Zellen sind in Woche 1 ebenfalls fast vollständig depletiert. Danach erholen sie sich langsam und erreichen ab Woche 4 einen Wert um knapp 10 % und haben damit den anfänglichen Anteil von ungefähr 16 % ebenfalls noch nicht wieder erreicht. Im Vergleich zum Anteil werden die Switched B-Zellen am geringsten depletiert

und sinken von etwa 0,09 % auf 0,04 %. Der Anteil der Switched B-Zellen konnte in Woche 5 aufgrund unrealistischer Ergebnisse nicht berücksichtigt werden. Wie alle anderen Subpopulationen bleiben auch die Switched B-Zellen mit ihrem Anteil nach sechs Wochen unter den Prä-Werten.

Zusätzlich wurde zur Charakterisierung von regulatorischen B-Lymphozyten ein Antikörper für den Marker IL-10 etabliert. Die Literaturrecherche ergab diverse Möglichkeiten regulatorische B-Zellen zu definieren und eine endgültige Definition ist bisher noch nicht gefunden, jedoch fand in vielen Publikationen eine Charakterisierung von regulatorischen B-Zellen (Bregs) über IL-10 statt, sodass sich deshalb ebenfalls für die Etablierung von IL-10 entschieden wurde. Versuche mit verschiedenen Verdünnungsreihen ergaben eine optimale Verdünnung von 1:30 für den verwendeten IL-10-Antikörper. In folgender Abbildung ist ein repräsentatives Bild der gefärbten Zellen durch einen Antikörper gegen CD45RA, zur Identifikation von B-Lymphozyten und Antikörper gegen IL-10, sowie dessen Isotyp, zu finden.

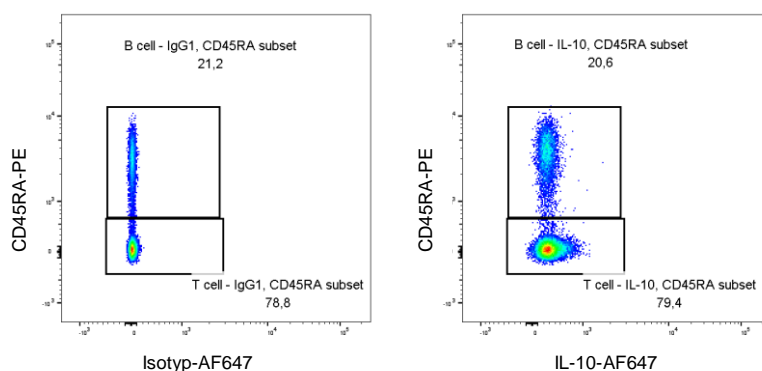


Abbildung 7: Etablierte IL-10-Färbung eines repräsentativen Tieres aus der Gruppe „Anti-CD20“. Die linke Abbildung zeigt die Färbung für CD45RA und dem Isotypen, rechts ist die Färbung für IL-10 zu sehen. Die CD45RA-negative Population wurden als T-Lymphozyten beschrieben.

Wie in Abbildung 7 zu sehen, zeigt die gesamte Population einen Shift in IL-10-positive Richtung, sodass hier nicht zwischen eindeutig IL-10-negativen und IL-10-positiven Zellen zu unterscheiden ist. Vielmehr muss in diesem Zusammenhang die Intensität der IL-10-Färbung verglichen werden. Deshalb wurde sich bei der Auswertung der Ergebnisse hier für die so genannte MFI (Median Fluorescence Intensity), statt die prozentualen Anteile IL-10-positiver

Populationen zu vergleichen, entschieden. In Abbildung 8: sind die Ergebnisse der etablierten Färbungen über den gesamten Versuchsverlauf eines Tieres der Gruppe „Anti-CD20“ zu sehen. Die Y-Achse zeigt die MFI, die aus der Differenz der MFI der Isotypfärbung und der MFI der IL-10-Färbung ermittelt wurde. Auf der X-Achse sind die Zeitpunkte in Wochen dargestellt. Zu sehen ist eine verstärkte IL-10-Färbung der nicht depletierten Zellen ab Woche 1, die in Woche 2 die höchsten IL-10 Ausschüttungen zeigen und mit Abnahme des Depletionseffektes wieder sinken. Der höchste Grad der Depletion wurde in Woche 1 erreicht (Daten nicht gezeigt). Danach steigt der Anteil der B-Lymphozyten wieder. In Woche 2 nimmt die IL-10-Ausschüttung noch zu, fängt ab Woche 3 allerdings an zu sinken. Sodass mit nachlassender Depletion die IL-10-Produktion wieder zu sinken scheint. Allerdings scheint dies erst mit einer leichten Verzögerung einzutreten.

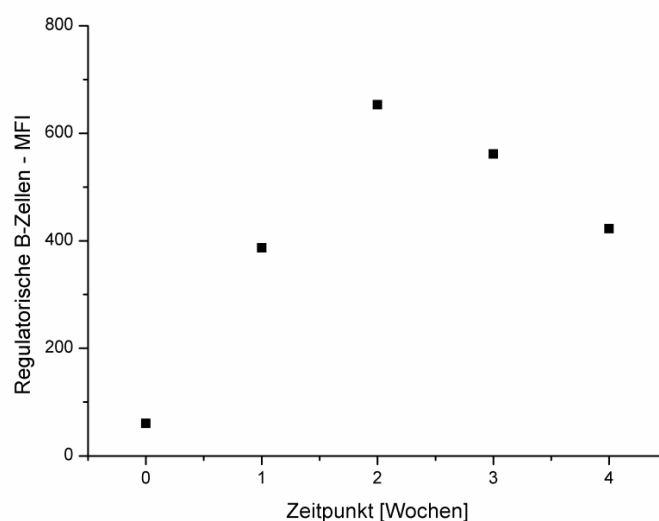


Abbildung 8: Entwicklung der MFI der IL-10 gefärbten Zellen im Versuchsverlauf über vier Wochen. Dargestellt ist der Verlauf eines repräsentativen Tieres der Gruppe „Anti-CD20“. Die Y-Achse zeigt die Median Fluorescence Intensity (MFI) und auf der X-Achse sind die Zeitpunkte der Messungen in Wochen abgebildet. In Woche 2 erreichen die Zellen ihre maximale IL-10-Ausschüttung.

Diese Ergebnisse bilden die Grundlage für die weiteren Versuche an transplantierten Tieren, die zum Teil ebenfalls einen B-Zell-depletierenden Antikörper injiziert bekommen haben. Darüber hinaus sind auch T- und NK-Zellen charakterisiert worden, deren Marker bereits etabliert sind.

3.3. Population der gesamten Lymphozyten

Die Gesamtlymphozytenpopulation beträgt vor der Transplantation in beiden Gruppen zwischen 8 und 9 Mrd. Zellen/L. Danach steigt die Zellzahl in beiden Gruppen deutlich auf über 14 Mrd. Zellen/L. Die Mittelwerte für die Gruppe „Allo Anti-CD20“ sinken in Woche 2 auf den Ausgangswert. Die beiden Versuchsgruppen unterscheiden sich in Woche 2, zum maximalen Einfluss der Depletion, nicht. In Woche 3 steigt der Anteil der Lymphozyten in der Allo-Gruppe leicht, sinkt in Woche 4 wieder, sodass sich die Gruppen nicht unterscheiden. Vor allem in Woche 4 sind für beide Gruppen im Vergleich zu den anderen Mittelwerten hohe Standardabweichungen ermittelt worden. Insgesamt zeigen die Werte keine starken Schwankungen und lagen im Normalbereich.

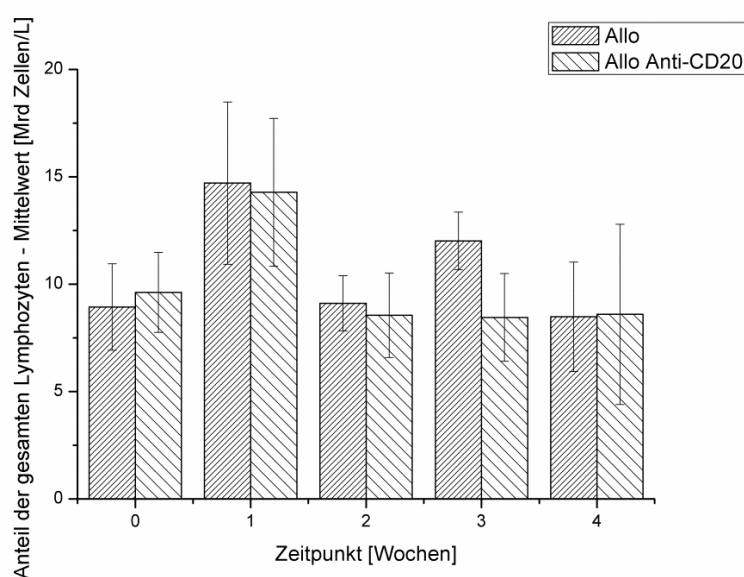


Abbildung 9: Entwicklung der gesamten Lymphozyten der Gruppen „Allo“ und „Allo Anti-CD20“ im Vergleich. Dargestellt ist der wöchentlich analysierte gemittelte Anteil der gesamten Lymphozytenpopulation in absoluten Mrd. Zellen/L im peripheren Blut. Vergleich der Gruppen „Allo“ (n=3), die in Woche 1 nach der Nierentransplantation eine NaCl-Injektion erfahren haben, und „Allo Anti-CD20“ (n=5), die in Woche 1 den Antikörper Anti-CD20 zur Depletion der B-Zellen injiziert bekommen haben.

3.4. Charakterisierung von B-Zell-Subpopulationen

Die Charakterisierung der B-Zell-Subpopulationen erfolgte mittels der zuvor etablierten Marker Immunglobulin M (IgM) und Immunglobulin D (IgD) (vgl. Kapitel 3.2). Dabei fungiert der Antikörper gegen CD45RA als Marker zur Identifikation von B-Lymphozyten. Im Folgenden sind die einzelnen Populationen anteilig an der Population der gesamten Lymphozyten dargestellt, wodurch der Erfolg der Depletion und der Wiederanstieg der beiden Versuchsgruppen im Vergleich untersucht wurden. Am Ende des Versuches (Woche 4) sind den Tieren die transplantierte Niere (NTX-Niere) sowie die Milz entnommen worden, aus denen Lymphozyten isoliert wurden. Diese wurden ebenfalls durchflusszytometrisch analysiert. Die Ergebnisse sind in folgenden Kapiteln zu finden. In Abbildung 10 ist eine charakteristische Doppelfärbung der B-Lymphozyten mit IgM und IgD zu sehen, anhand dessen die Bestimmung der Subpopulationen erfolgte. Dargestellt sind Transitional 1 B-Zellen (T1), Transitional 2 B-Zellen (T2), Naive Mature B-Zellen und Switched B-Zellen.

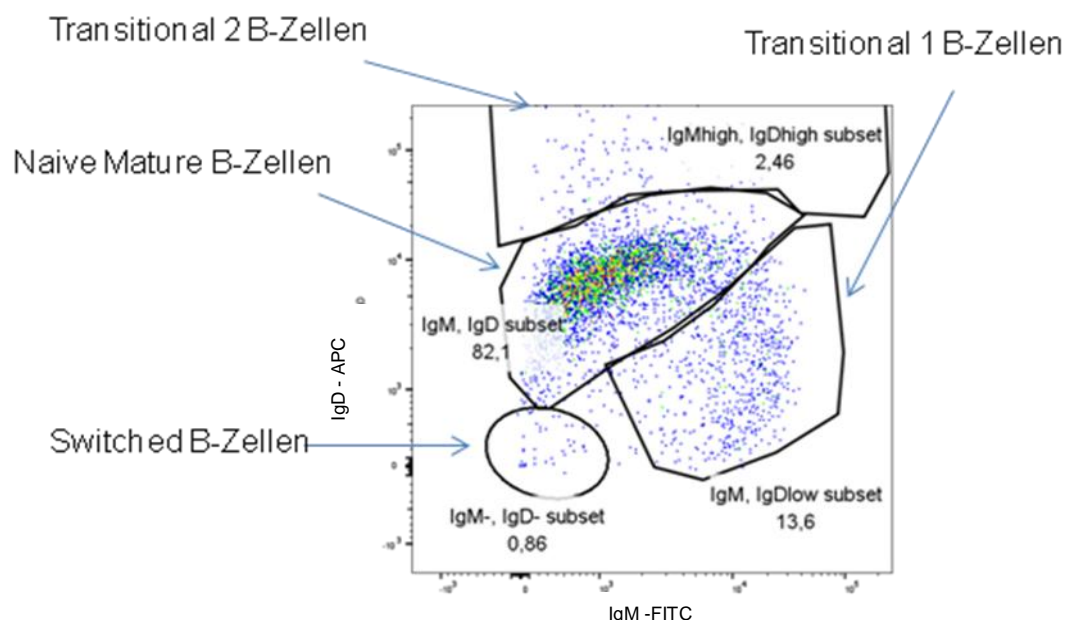


Abbildung 10: Repräsentative Verteilung der Subtypenpopulation von B-Lymphozyten in einem allogenen transplantierten Tier in Woche 1 Dargestellt ist das Tier LEW300. Die Populationen beziehen sich auf CD45RA⁺ B-Zellen. Gezeigt ist hier die Fluoreszenzfärbung der Zellen mittels IgM-FITC und IgD-APC. Die Population IgM^{high}, IgD^{high} repräsentiert T2-B-Zellen, IgM, IgD steht für Naive Mature B-Zellen, IgM, IgD^{low} sind als T1-B-Zellen definiert und Switched B-Zellen sind für beide Marker negativ.

3.4.1. B-Lymphozyten – CD45RA⁺IgG⁺

Die Definition reifer B-Zellen im peripheren Blut, wie auch in den Organen, erfolgte über die Oberflächenmarker CD45RA und Immunglobulin G (IgG). In Abbildung 11 ist eine typische Färbung von B-Lymphozyten gezeigt. Dabei befindet sich die für beide Marker positive Population im Feld Q2, jeweils oben rechts. In der linken Abbildung sind die Daten eines Tieres vor der Transplantation in Woche 0 gezeigt. Rechts ist die Färbung bei maximaler Depletion der B-Zellen in Woche 2 dargestellt. Die Population sinkt von 23,0 % auf 0,41 %.

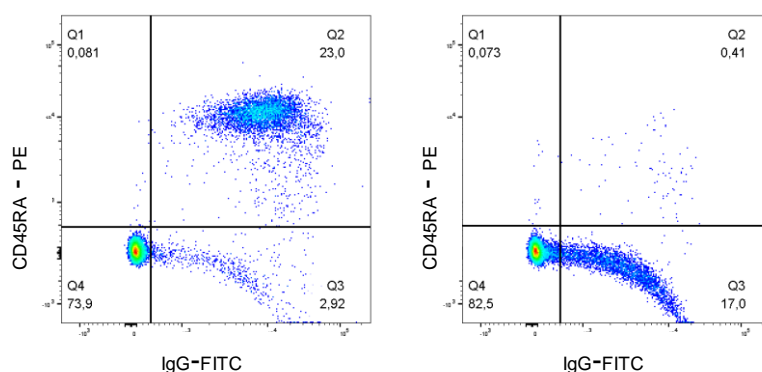


Abbildung 11: FACS-Färbung der B-Lymphozyten. Dargestellt ist ein repräsentatives Tier der Gruppe „Allo Anti CD20“, das für die Marker CD45RA (Y-Achse) und IgG (x-Achse) gefärbt wurde. Links ist der Zustand der gefärbten Zellen in Woche 0 vor der Transplantation zu sehen, rechts in der Abbildung ist die FACS-Analyse für Woche 2 mit maximaler B-Zell-Depletion (Q2) zu sehen.

Der Verlauf der B-Lymphozyten beider Versuchsgruppen im Vergleich ist in Abbildung 12 dargestellt. Die B-Lymphozytenpopulationen der Gruppe „Allo“ (n=3) und der Gruppe „Allo Anti-CD20“ (n=5) unterscheiden sich in Woche 0 und 1 nicht signifikant. Erst mit eintretender Depletion in Woche 2 der Allo Anti-CD20 Tiere ist eine signifikante Differenz ($p \leq 0,05$) beider Gruppen ermittelt worden (Allo Anti-CD20 Woche 2: $0,33 \% \pm 0,27 \%$). In Woche 3 beginnt sich die Population der B-Zell-depletierten Tiere langsam zu erholen, variieren aber immer noch signifikant. Diese Signifikanz ist in Woche 4 aufgehoben, jedoch ist die Ausgangspopulation noch nicht erreicht.

Die Transplantation scheint sich auch auf die Entwicklung der „Allo“-Tiere auszuwirken, da diese im Verlauf bis Woche 3 im Mittel leicht abnimmt (Woche 0: 23,5 % \pm 2,00 %, Woche 3: 17,3 % \pm 2,38 %) und sich in Woche 4 langsam erholen zu scheint. Die Werte der nicht B-Zell-depletierten Tiere befinden sich im Normbereich.

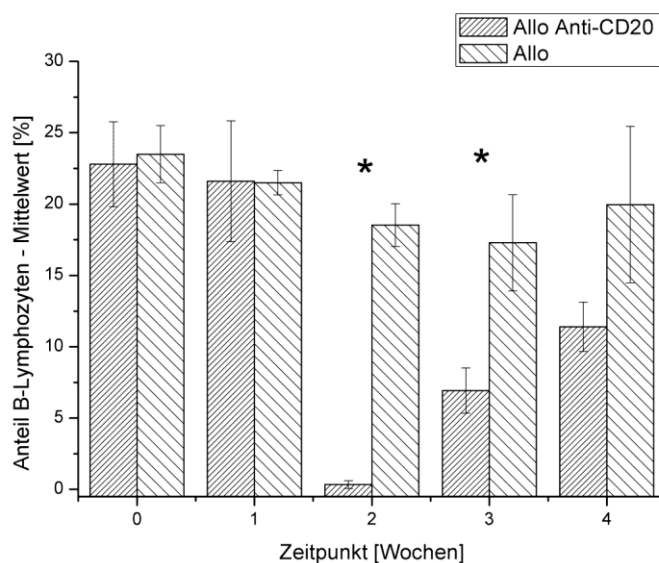


Abbildung 12: Dargestellt ist der wöchentlich analysierte gemittelte Anteil der B-Lymphozyten der gesamten Lymphozytenpopulation in Prozent im peripheren Blut. Vergleich der Gruppen „Allo“ (n=3), die in Woche 1 nach der Nierentransplantation eine NaCl-Injektion erfahren haben, und „Allo Anti-CD20“ (n=5), die in Woche 1 den Antikörper Anti-CD20 zur Depletion der B-Zellen injiziert bekommen haben. In Woche 2 und 3 konnten signifikante Unterschiede zwischen den B-Lymphozyten beider Gruppen ermittelt werden.

Ein Vergleich der Organe Milz und Niere beider Gruppen zeigt am Ende des Versuches in Woche 4 jeweils geringere Anteile der B-Lymphozyten in der Gruppe „Allo Anti-CD20“, jedoch ist dieser Unterschied nur in den Lymphozytenpopulationen der Lymphknoten signifikant (Allo: 30,17 % \pm 1,46 %, Allo Anti-CD20: 15,33 % \pm 1,62 %).

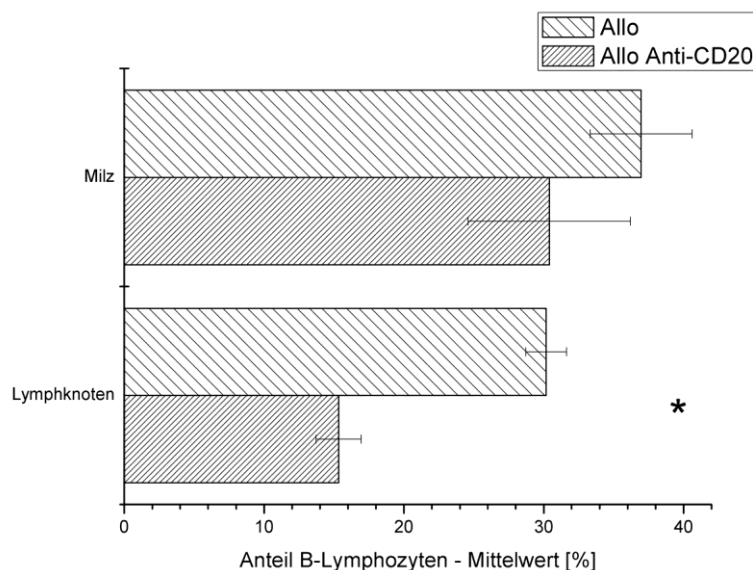


Abbildung 13: Dargestellt ist gemittelter Anteil der B-Lymphozyten der gesamten Lymphozytenpopulation in Prozent im Lymphknoten und Milz in Woche 4 nach Versuchsende. Vergleich der Gruppen „Allo“ (n=3), die in Woche 1 nach der Nierentransplantation eine NaCl-Injektion erfahren haben, und „Allo Anti-CD20“ (n=5), die in Woche 1 den Antikörper Anti-CD20 zur Depletion der B-Zellen injiziert bekommen haben. Der Anteil der Lymphknoten zeigt einen signifikanten Unterschied zwischen den B-Lymphozyten beider Gruppen.

3.4.2. Naive Mature B-Zellen - $IgD^{medium}IgM^{medium}$

Die Definition der Naiven Mature B-Zellen erfolgte über die Marker $IgD^{medium}IgM^{medium}$. Dabei wurde zu Beginn der Transplantation kein signifikanter Unterschied der Versuchsgruppen im Vergleich festgestellt. Erst in Woche 2 mit dem maximalen Depletionseffekt des Antikörpers Anti-CD20 zeigte sich eine Signifikanz ($p \leq 0,05$) in der Abweichung beider Gruppen. In Woche 3 erholt sich die Population der B-Zell-depletierten Tiere ein wenig, jedoch bleibt die Signifikanz weiterhin bestehen, die sich erst in Woche 4 am Ende des Versuches aufhebt. Die prozentualen Anteile beider Gruppen weichen mit 8,19 % (Allo Anti-CD20) zu 14,00 % (Allo) weiterhin deutlich voneinander ab. Auch die Naiven Mature B-Zellen der Allo-Tiere verzeichnen über den gesamten Versuchsverlauf eine abnehmende Tendenz von 19,37 % in Woche 0 zu 14,00 % in Woche 4.

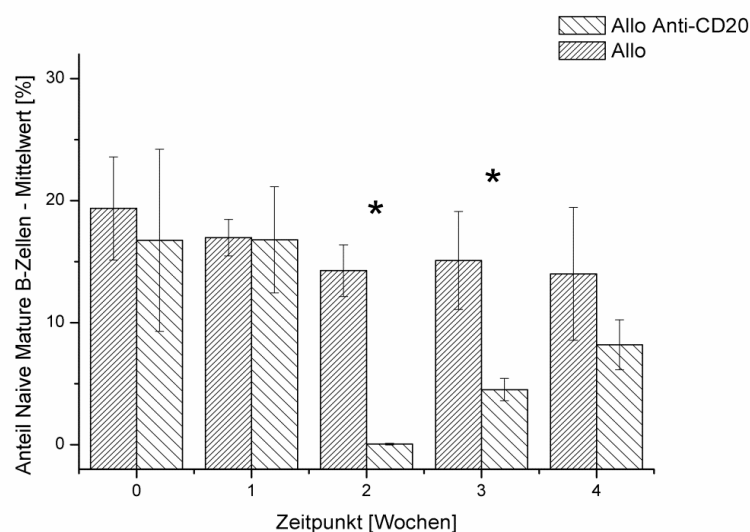


Abbildung 14: Dargestellt ist der wöchentlich analysierte gemittelte Anteil der Naive Mature B-Zellen der gesamten Lymphozytenpopulation in Prozent im peripheren Blut. Vergleich der Gruppen „Allo“ (n=3), die in Woche 1 nach der Nierentransplantation eine NaCl-Injektion erfahren haben, und „Allo Anti-CD20“ (n=5), die in Woche 1 den Antikörper Anti-CD20 zur Depletion der B-Zellen injiziert bekommen haben. In Woche 2 und 3 konnten signifikante Unterschiede zwischen den B-Lymphozyten beider Gruppen ermittelt werden.

Ein Vergleich der Naiven Mature B-Zellen in den Organen zeigen keine signifikanten Abweichungen, jedoch weisen die Populationen der Allo Anti-CD20-Gruppe auf einen leichten Depletionseffekt hin, der in den Lymphknoten deutlicher zu erkennen ist als in der Milz (vgl. Abbildung 15). Ein Vergleich mit den Subtyppopulationen der Gruppe „Allo“ im peripheren Blut und in den Organen hat ergeben, dass in Lymphknoten und Milz mit 23,2 % und 28,2 % deutlich mehr Zellen zu finden sind, als im peripheren Blut in Woche 4. Der Unterschied in der anderen Versuchsgruppe ist ähnlich groß.

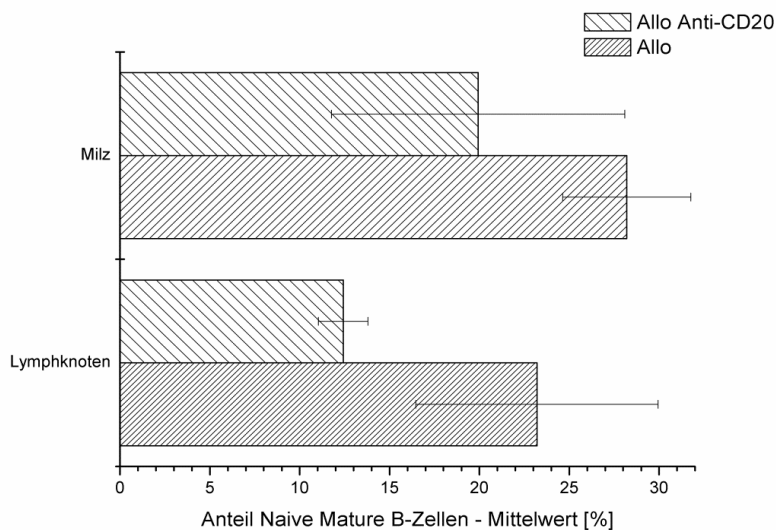


Abbildung 15: Dargestellt ist gemittelter Anteil der Naive Mature B-Zellen der gesamten Lymphozytenpopulation in Prozent in den Lymphknoten und in der Milz in Woche 4 nach Versuchsende. Vergleich der Gruppen „Allo“ (n=3), die in Woche 1 nach der Nierentransplantation eine NaCl-Injektion erfahren haben, und „Allo Anti-CD20“ (n=5), die in Woche 1 den Antikörper Anti-CD20 zur Depletion der B-Zellen injiziert bekommen haben.

3.4.3. Transitional 1 B-Zellen – IgD^{low}IgM^{medium}

Die B-Zellpopulation, die gering positiv für IgD und normal positiv IgM war, wurde als Transitional 1 B-Zellen identifiziert. In Woche 0 und 1 haben beide Populationen ähnliche Anteile an den Lymphozyten im peripheren Blut. Jedoch nehmen die T1-B-Zellen bereits in Woche 1 um etwa 50 % ab. Die B-Zell-Depletion der Allo Anti-CD20-Tiere ist in Woche 2 ebenfalls zu erkennen, jedoch konnte keine Signifikanz, vermutlich aufgrund hoher Standardabweichungen, festgestellt werden. In Woche 3 hat sich die Population der Allo Anti-CD20-Gruppe erholt und ihren anfänglichen Wert fast wieder erreicht. Auffällig ist, dass die T1 B-Zellen der Tiere, deren B-Lymphozyten zuvor depletiert wurden, bis zum Versuchsende in Woche 4 einen höheren Teil der gesamten Lymphozytenzahl repräsentieren, als die der nicht B-Zell-depletierten Tiere. Aufgrund hoher Standardabweichungen über den gesamten Versuchsverlauf müssen diese Daten differenziert betrachtet werden.

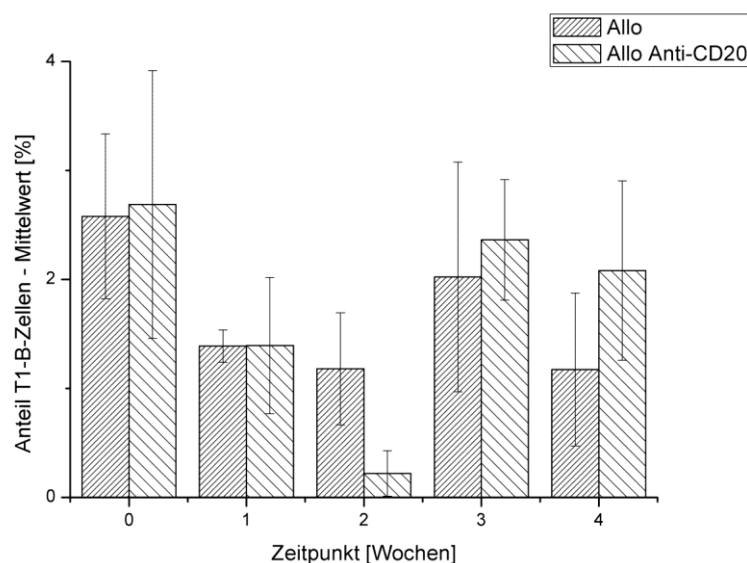


Abbildung 16: Dargestellt ist der wöchentlich analysierte gemittelte Anteil der Transitional 1 (T1) B-Zellen der gesamten Lymphozytenpopulation in Prozent im peripheren Blut. Vergleich der Gruppen „Allo“ (n=3), die in Woche 1 nach der Nierentransplantation eine NaCl-Injektion erfahren haben, und „Allo Anti-CD20“ (n=5), die in Woche 1 den Antikörper Anti-CD20 zur Depletion der B-Zellen injiziert bekommen haben.

Die T1 B-Zellen in den Lymphknoten liegen mit 1,31 % (Allo) und 1,41 % (Allo Anti-CD20) im Mittel deutlich unter den Messwerten der T1 Zellen im peripheren Blut und unterscheiden sich im Vergleich der Gruppen untereinander kaum. Die Anteile in der Milz scheinen dagegen deutlich über denen im peripheren Blut zu liegen. Dort konnten in der Gruppe „Allo“ 4,66 % und in den B-Zell-depletierten Tieren 3,92 % im Mittel nachgewiesen werden, während im peripheren Blut in Woche 4 1,17 % (Allo Anti-CD20) und 2,58 % (Allo) detektiert wurden (vgl. Abbildung 17).

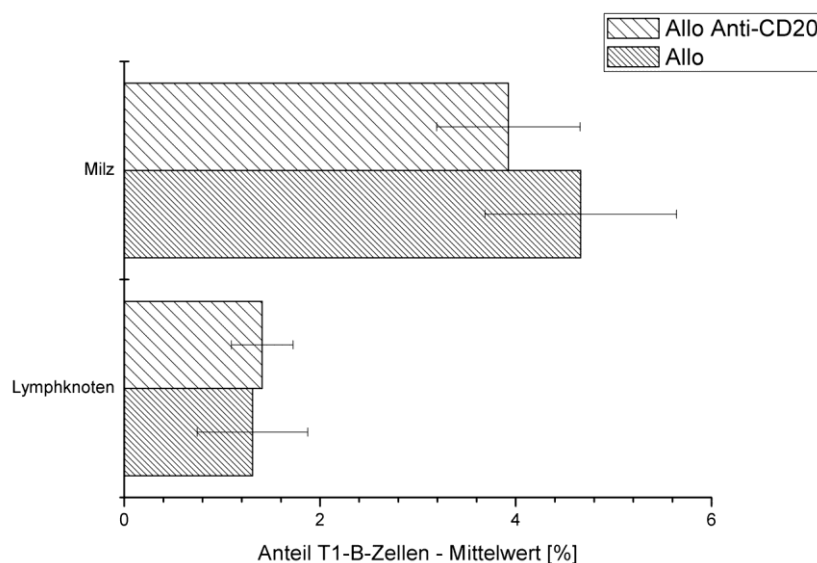


Abbildung 17: Dargestellt ist gemittelter Anteil der Transitional 1 B-Zellen der gesamten Lymphozytenpopulation in Prozent in den Lymphknoten und in der Milz in Woche 4 nach Versuchsende. Vergleich der Gruppen „Allo“ (n=3), die in Woche 1 nach der Nierentransplantation eine NaCl-Injektion erfahren haben, und „Allo Anti-CD20“ (n=5), die in Woche 1 den Antikörper Anti-CD20 zur Depletion der B-Zellen injiziert bekommen haben.

3.4.4. Transitional 2 B-Zellen – IgD^{high}IgM^{high}

Charakteristisch für die Transitional 2 B-Zelle (T2) ist die hohe Expression der beiden Marker IgM und IgD. Die Ergebnisse des Nachweises im peripheren Blut ist in Abbildung 18 zu sehen. Auffallend ist der große Unterschied beider Populationen bereits in Woche 0 vor der Transplantation. Dies ist vermutlich der hohen Standardabweichungen in der Gruppe „Allo Anti-CD20“ zu Schulden, die dadurch ein unerwartetes Ergebnis zeigen. In folgenden Analysen des Versuchs unterscheiden sich die Gruppen im geringeren Maße und entsprechen damit den Erwartungen. Über den gesamten Versuchsverlauf sind in beiden Versuchsgruppen recht hohe Standardabweichungen ermittelt worden, wodurch die Aussagekraft der Daten vermindert wird und verifiziert werden müsste. Insgesamt liegen die Anteile der T2 B-Zellen mit einer Range von ungefähr 0,1 % bis 0,6 % in einem sehr geringen Bereich im Vergleich zu den bisherigen Subtypen. Trotz der hohen Standardabweichungen lässt sich in Woche 2 eine B-Zell-Depletion erkennen, die nicht signifikant ist. In Woche 3 hat sich die Subpopulation bereits regeneriert und unterscheidet sich nicht deutlich von der Gruppe „Allo“. Dies bestätigt sich ebenfalls am Versuchsende.

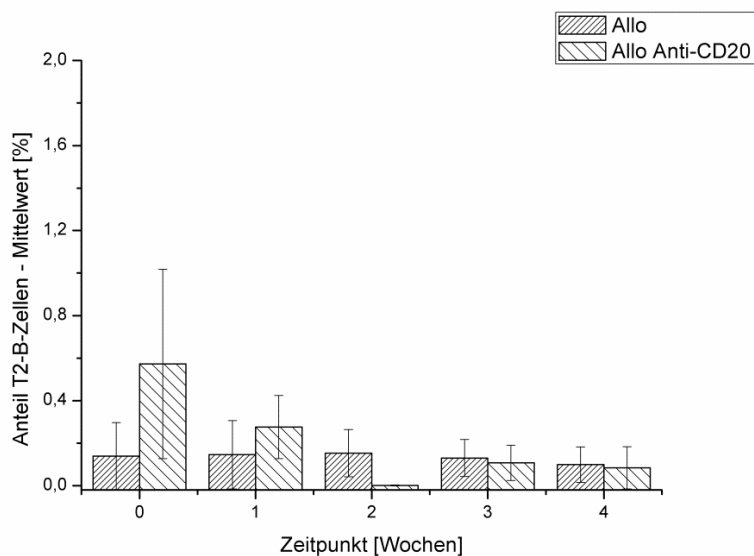


Abbildung 18: Dargestellt ist der wöchentlich analysierte gemittelte Anteil der Transitional 2 (T2) B-Zellen der gesamten Lymphozytenpopulation in Prozent im peripheren Blut. Vergleich der Gruppen „Allo“ (n=3), die in Woche 1 nach der Nierentransplantation eine NaCl-Injektion erfahren haben, und „Allo Anti-CD20“ (n=5), die in Woche 1 den Antikörper Anti-CD20 zur Depletion der B-Zellen injiziert bekommen haben.

In Abbildung 19 sind die Ergebnisse der Analyse von Lymphozytenpopulation in Lymphknoten und Milz dargestellt. Insgesamt sind die T2 B-Zellen in den Organen im geringeren Prozentsatz repräsentiert als im peripheren Blut. Auch bei dieser Auswertung sind sehr hohe Standardabweichungen ermittelt worden, sodass sich auch keine signifikanten Unterschiede der Versuchsgruppen untereinander erkennen ließen.

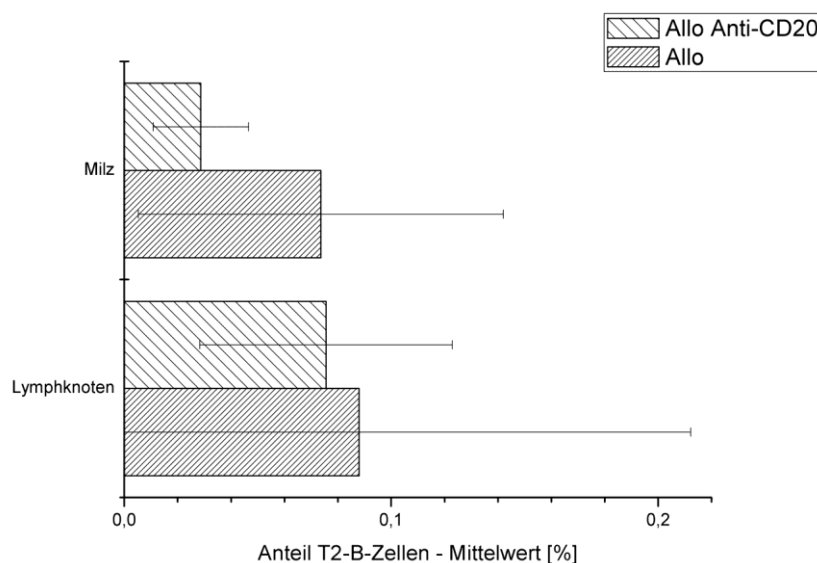


Abbildung 19: Dargestellt ist gemittelter Anteil der Transitional 2 B-Zellen der gesamten Lymphozytenpopulation in Prozent in den Lymphknoten und in der Milz in Woche 4 nach Versuchsende. Vergleich der Gruppen „Allo“ (n=3), die in Woche 1 nach der Nierentransplantation eine NaCl-Injektion erfahren haben, und „Allo Anti-CD20“ (n=5), die in Woche 1 den Antikörper Anti-CD20 zur Depletion der B-Zellen injiziert bekommen haben.

3.4.5. Switched B-Zellen – IgD⁻IgM⁻

Switched B-Lymphozyten sind sowohl für IgM als auch IgD negativ. Ihre Analyseergebnisse zur Repräsentation im peripheren Blut sind in Abbildung 20 graphisch dargestellt. Nach der Transplantation in Woche 1 steigt der Anteil der Switched B-Zellen in beiden Versuchsgruppen deutlich von ungefähr 0,15 % in Woche 0 auf etwa 0,27 % in Woche 1 im Mittel (beider Versuchsgruppen) an. Mit beginnendem Depletionseffekt in Woche 2 sinkt der Anteil der Gruppe „Allo Anti-CD20“ erkennbar und zeigt erst am Ende des Versuchs ähnlich hohe Werte, wie die Analyse der Allo-Tiere ergab. Auch die Population der Allo-Tiere scheint nach anfänglichem Anstieg in Woche 1 über das gesamte Monitoring leicht zu sinken und erreicht damit in Woche 4 in etwa das Ausgangsniveau des Versuchsbeginns.

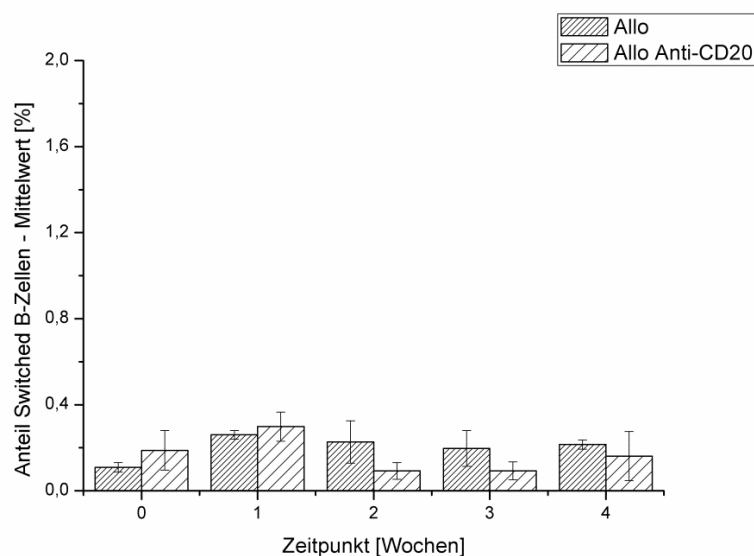


Abbildung 20: Dargestellt ist der wöchentlich analysierte gemittelte Anteil der Switched B-Zellen der gesamten Lymphozytenpopulation in Prozent im peripheren Blut. Vergleich der Gruppen „Allo“ (n=3), die in Woche 1 nach der Nierentransplantation eine NaCl-Injektion erfahren haben, und „Allo Anti-CD20“ (n=5), die in Woche 1 den Antikörper Anti-CD20 zur Depletion der B-Zellen injiziert bekommen haben.

Die Ergebnisse der Organanalysen sind in folgender Abbildung zu finden. Die Anteile sowohl in Milz als auch in den Lymphknoten scheinen höher zu sein als im peripheren Blut. Die Ergebnisse zur Analyse der Milz unterscheiden sich nicht deutlich. Vermutlich haben die Tiere, die eine Antikörper-Behandlung erfahren haben, eine niedrigere Population als die nicht behandelten Tiere. Da diese Ergebnisse ebenfalls hoher Standardabweichungen aufweisen, lässt sich dies nicht zweifelsfrei bestätigen. Wahrscheinlicher ist dagegen ein Unterschied in den Lymphknoten, deren Ergebnisse etwas deutlicher sind. So ist hier noch eine leichte Depletion der Switched B-Zellen am Ende des Versuches zu erkennen (vgl. Abbildung 21).

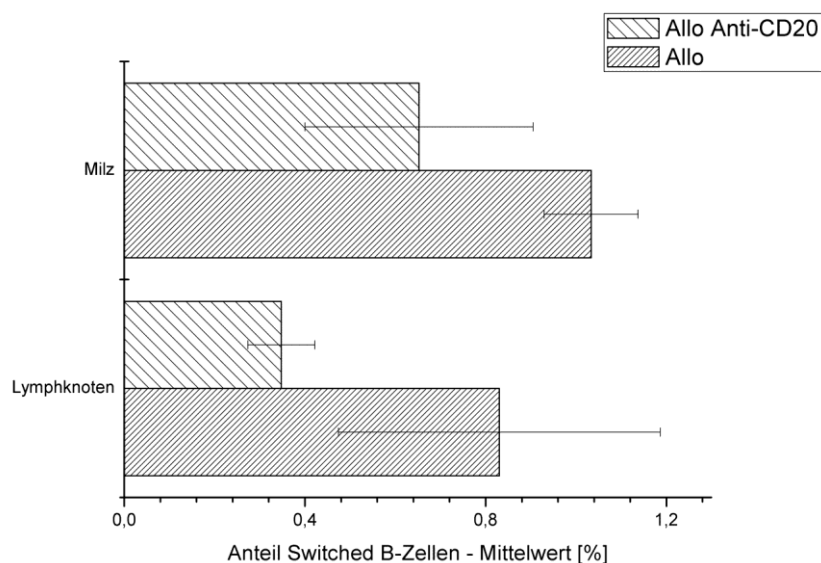


Abbildung 21: Dargestellt ist gemittelter Anteil der Switched B-Zellen der gesamten Lymphozytenpopulation in Prozent in den Lymphknoten und in der Milz in Woche 4 nach Versuchsende. Vergleich der Gruppen „Allo“ (n=3), die in Woche 1 nach der Nierentransplantation eine NaCl-Injektion erfahren haben, und „Allo Anti-CD20“ (n=5), die in Woche 1 den Antikörper Anti-CD20 zur Depletion der B-Zellen injiziert bekommen haben.

3.4.6. Entwicklung der B-Zell-Subtypen im Vergleich

In den vergangenen Kapiteln ist der Einfluss des Anti-CD20-Antikörpers auf die einzelnen Subtypen der B-Lymphozyten untersucht worden. Dabei sind verschieden starke Einflüsse des Antikörpers auf den Depletionserfolg ermittelt worden. Dies wurde unter anderem auf den Anteil des Immunglobulins M zurückgeführt. Zur genaueren Untersuchung sind hierfür die Daten in Tabelle 4 aufbereitet worden. In den Spalten sind die vier verschiedenen Subtypen aufgeführt und anhand ihres IgM-Anteils aufsteigend sortiert. Verglichen worden sind die prozentualen Anteile der jeweiligen Population an der Gesamtlymphozytenpopulation in Woche 1, vor der Depletion und in Woche 2 zum Zeitpunkt des maximalen Depletionseffekts. Daraus wurde der Grad der Depletion in Prozent berechnet. Der Vergleich zeigt, dass die IgM⁺ Switched B-Zellen mit einer prozentualen Reduktion um 70,9 % die geringste Depletion erfahren haben. T1 B-Zellen sind um 84,2 % reduziert worden und die Naiven Mature B-Zellen und die T2 B-Zellen sind um 99,6 % beziehungsweise 99.7 %

verringert worden. Auffällig ist der geringe Unterschied des Depletionserfolgs zwischen Naiven Mature und T2 B-Zellen, obwohl die Naiven Mature B-Zellen als Zellen mit einer mäßigen IgM-Expression definiert wurden, unterscheiden sie sich in ihrem Grad der Depletion kaum von den T2 B-Zellen, die eine hohe IgM-Expression aufweisen.

Tabelle 4: Vergleich des Depletionserfolgs anhand IgM-Anteile verschiedener B-Subtypen. Dargestellt sind die Switched, T1, Naive Mature und T2-B-Zellen der Gruppe „Allo Anti-CD20“. Anordnung der Spalten in der Reihenfolge des steigenden IgM-Anteils. Verglichen worden sind die prozentualen Anteile in der Woche 1 nach der Transplantation zu Woche 2 nach Transplantation (entspricht Woche 1 nach Gabe des Anti-CD20-Antikörpers). Die Daten zeigen eine zunehmende Depletion mit steigendem IgM-Gehalt. Beginnend mit einem Grad der Depletion um 70,9 % der Switched B-Zellen bis zu 99,7 % bei T2-B-Zellen.

Zelltyp	Switched B-Zellen IgM ^{low}	T1-B-Zellen IgM ^{med}	Naive Mature B-Zellen IgM ^{med}	T2-B-Zellen IgM ^{high}
Woche 1 [%]	0,298	1,394	16,8	0,276
Woche 2 [%]	0,0866	0,2208	0,06454	0,00087
Grad der Depletion [%]	70,9	84,2	99,6	99,7

Des Weiteren wurde die Entwicklung der B-Zell-Subtypen untersucht. Dabei ging es um den Einfluss des Anti-CD20-Antikörpers auf die Verteilung der Subpopulationen. Dafür sind die Anteile der verschiedenen Populationen der B-Lymphozyten errechnet worden. Die Ergebnisse der Gruppe „Allo“ sind in Abbildung 22 ausgewertet worden. Dabei repräsentiert jedes Kuchendiagramm den Anteil der entsprechenden B-Zell-Subtypen anteilig an der vorhandenen B-Lymphozytenpopulation. Dargestellt ist der gesamte Versuchsverlauf von Woche 0 bis Woche 4, sowie die Analyse der Organe am Versuchsende zum Zeitpunkt der Woche 4. Während des Versuchs scheint sich keine Population deutlich zu verändern. Die Naiven Mature B-Zellen sind im Durchschnitt mit knapp 90 % vertreten und bilden damit die größte Population. Die T1 B-Zellen erreichen Werte zwischen 7 % und 12 %. Die geringsten Anteile haben die T2 und Switched B-Zellen mit jeweils unter 1 % beziehungsweise unter 2 %. Lediglich in den Lymphknoten scheint sich die Verteilung ein wenig abweichend entwickelt zu haben. Dort liegt der Anteil der T1 B-Zellen bei 4,99 % und die Switched B-Zellen erreichen mit 3,29 % einen deutlich höheren Messwert. Ein erhöhter Anteil an Switched B-Zellen ist auch in der Milz zu finden (3,09 %).

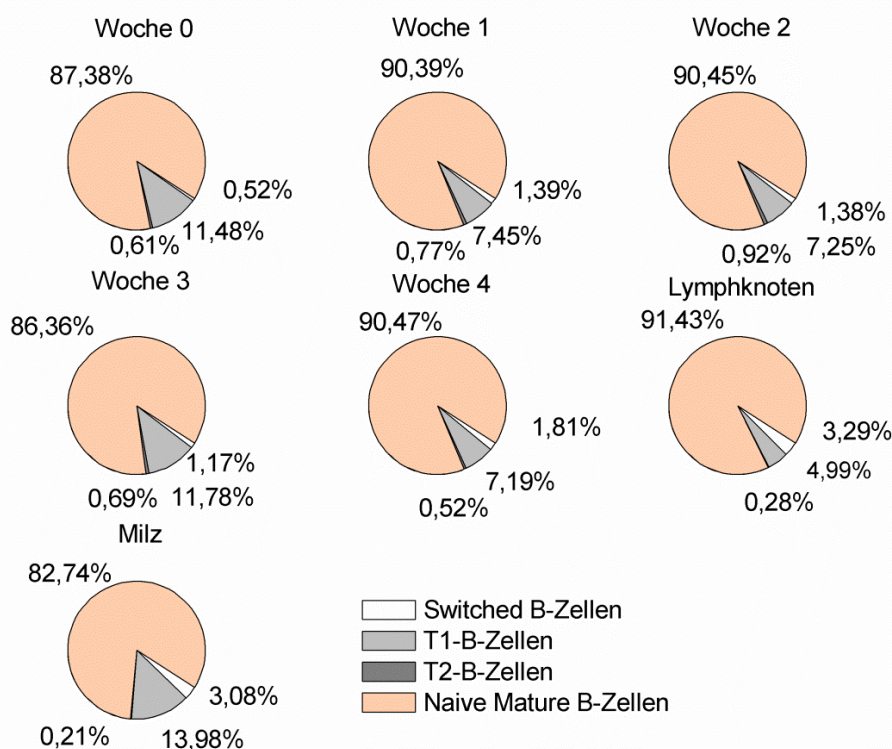


Abbildung 22: Entwicklung der B-Zell-Subtypenverteilung im peripheren Blut und in den Organen Lymphknoten und Milz der Gruppe „Allo“ (n=3). Dargestellt sind die Verteilungen der Subtypen Switched, T1, T2 und Naive Mature B-Zellen in Prozent der entsprechenden B-Lymphozytenpopulation.

Ein Vergleich mit den Ergebnissen der Gruppe „Allo Anti-CD20“ unterscheidet sich vor allem in Woche 2 deutlich (vgl. Abbildung 23). Der prozentuale Teil der Naiven Mature B-Zellen ist von 89,54 % in Woche 1 auf 13,36 % in Woche 2 gesunken. Ebenfalls hat sich das Ergebnis der T2 B-Zellen von 1,59 % auf 0,17 % reduziert. Die T1 B-Zellen haben sich dagegen deutlich vermehrt und bilden mit 46,17 % den größten Anteil der Populationen. Die Switched B-Zellen sind von 1,64 % in Woche 1 auf 40,31 % in Woche 2 gestiegen und haben sich damit um mehr als das Zwanzigfache erhöht. In Woche 3 scheinen sich die Naiven Mature B-Zellen wieder an ihren Ausgangswert anzunähern und repräsentieren 63,44 % der gesamten B-Lymphozyten. Die T2 B-Zellen haben ihren ursprünglichen Wert wieder erreicht. Ebenso die Switched B-Zellen. Die T1 B-Zellen liegen mit 33,71 % noch deutlich über ihrem Vergleichswert aus

Woche 1. Woche 4 zeigt bestätigt die Anpassung der Anteile an die Verteilungen zu Versuchsbeginn. Nur die T1 B-Zellen sind noch ein wenig erhöht. Die Ergebnisauswertung von Milz und Lymphknoten zeigen dagegen keine deutlichen Unterschiede zu den Organanalysen der Gruppe „Allo“.

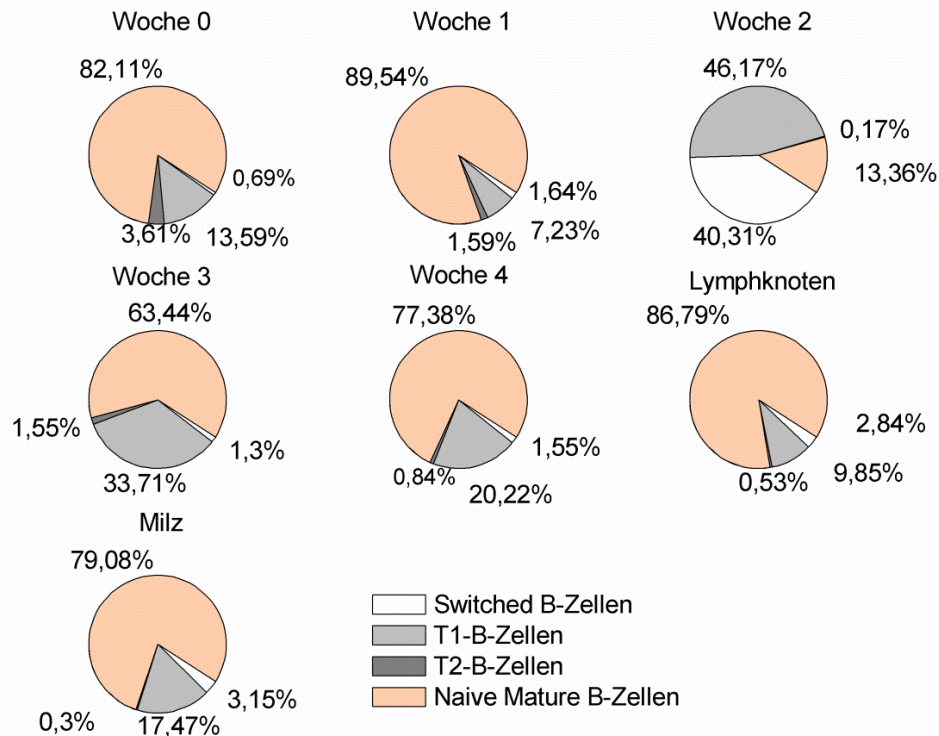


Abbildung 23: Entwicklung der B-Zell-Subtypenverteilung im peripheren Blut und in den Organen Lymphknoten und Milz der Gruppe „Allo Anti-CD20“ (n=5). Dargestellt sind die Verteilungen der Subtypen Switched, T1, T2 und Naive Mature B-Zellen in Prozent der entsprechenden B-Lymphozytenpopulation.

3.5. Nachweis von regulatorischen Lymphozyten

Die Charakterisierung der regulatorischen B-Zellen (Bregs) erfolgte vorwiegend über IL-10. Es sind aber auch Resultate zur Charakterisierung von FoxP3⁺ B-Zellen ermittelt worden, die in folgenden Kapiteln gezeigt werden. Neben den regulatorischen B-Lymphozyten sind auch regulatorische T-Lymphozyten charakterisiert worden. Ebenfalls anhand der Marker FoxP3 und IL-10.

3.5.1. IL-10⁺ regulatorische B-Zellen

Die Definition der regulatorischen B-Zellen erfolgte über die Doppelfärbung für CD45RA und IL-10. In Abbildung 24 ist die Doppelfärbung für CD45RA –PE und IL-10-AF647 zu sehen. Die linke Grafik zeigt die Färbung der Zellen in Woche 1 unmittelbar vor der B-Zell-Depletion, während auf der rechten Grafik der maximal Depletionseffekt in Woche 2 zu sehen ist. Des Weiteren ist ein Shift der Zellpopulation in IL-10-positive Richtung von Woche 1 zu Woche 2 zu sehen. Aufgrund dieses Shifts scheinen die meisten Zellen eine stärkere IL-10-Expression zu zeigen. Deshalb wurde zur Auswertung der IL-10⁺ Zellen die MFI (Median Fluorescence Intensity) ermittelt und im zeitlichen Verlauf dargestellt.

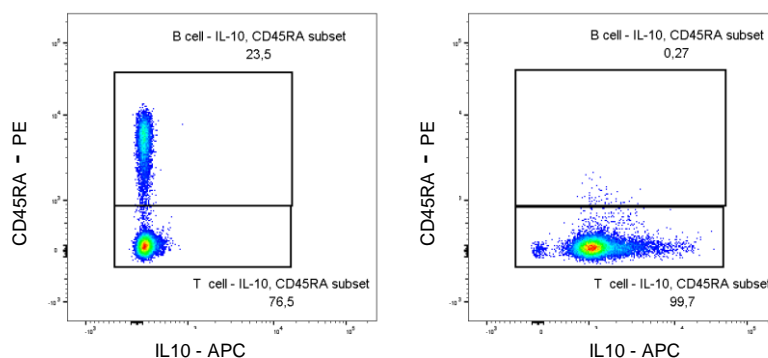


Abbildung 24: Vergleich von IL-10⁺ T- & B-Zellen in Woche 1 (links) vor der Depletion und in Woche 2 (rechts) nach der Depletion. Gezeigt ist das repräsentative Tier LEW 309 der Gruppe „Allo Anti-CD20“, das an Tag 7 den Anti-CD20-Antikörper injiziert bekommen hat. Die Zellen wurden zur Identifikation von B-Zellen mit CD45RA-PE (Y-Achse) und IL-10-AF647 (X-Achse) gefärbt.

In Abbildung 25 sind die MFI-Werte der Tiere dargestellt, die keine Antikörper-Behandlung erhalten haben. Gezeigt ist die IL-10-Ausschüttung der Zellen, unabhängig von der Anzahl der IL-10⁺-B-Zellen. Da die IL-10-Sekretion der einzelnen Tiere stark variiert, sind die Werte nicht gemittelt worden und der Verlauf jedes Tieres ist abgebildet. Dabei ist zu sehen, dass die MFI der einzelnen Tiere im Versuchsverlauf ansteigt. Bis auf das Tier LEW310, dessen MFI in Woche 4 bereits wieder sinkt, steigen die anderen Werte noch, sodass die Zellen ihre maximale IL-10-Ausschüttung noch nicht erreicht zu haben scheinen.

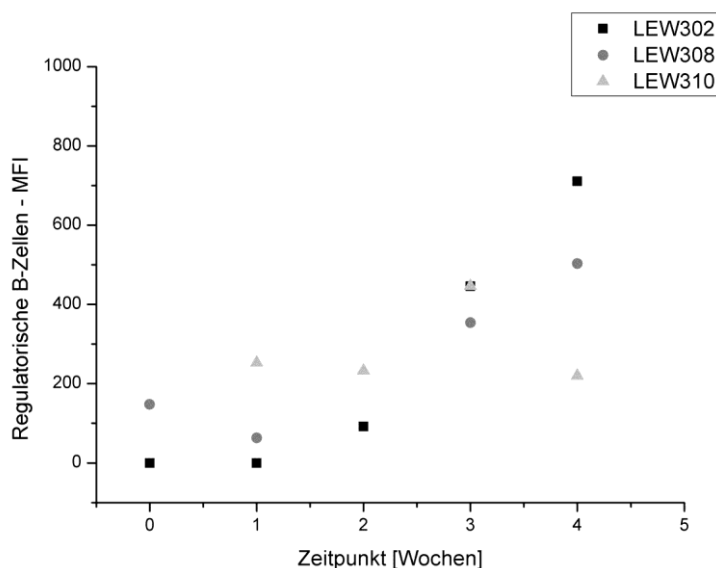


Abbildung 25: Regulatorische B-Zellen der Gruppe „Allo“. Dargestellt ist die Differenz des Medians der Fluoreszenzintensität (MFI) aus IL-10⁺ regulatorischen B-Zellen und der entsprechenden MFI des Isotyps zu IL-10 im peripheren Blut. Die Tiere der Versuchsgruppe „Allo“ (n=3) haben in der Woche 1 nach der Nierentransplantation eine NaCl-Injektion erhalten.

Äquivalent zur vorherigen Grafik, zeigt Abbildung 26 für die Tiere der Gruppe „Allo Anti-CD20“, deren B-Zellen depletiert wurden, den Verlauf der IL-10-Expression. Die MFI der depletierten Tiere scheinen ihre maximalen Messwerte in Woche 2 oder 3 zu erreichen und in Woche 4 bereits wieder zu sinken. Zusätzlich ist der Median der Fluoreszenzintensität zur maximalen Ausprägung deutlich höher als die maximalen Werte der Allo-Tiere. In Woche 2 erreicht die Depletion ihre maximale Wirkung, das heißt, dass nur sehr wenige Zellen zu diesem Zeitpunkt IL-10 exprimieren. Zwei der Tiere haben in Woche 2 eine niedrige IL-10-Expression, während drei Tiere ihre maximale IL-10-Expression zeigen und die wenigen verbliebenen Zellen damit deutlich mehr IL-10 ausschütten. Die beiden Tiere, die in Woche 2 eine sehr geringe IL-10-Produktion zu verzeichnen hatten, erreichen ihr Maximum in Woche 3. In Woche 4 nähern sich die Werte der Tiere wieder einander an und sind deutlich gesunken.

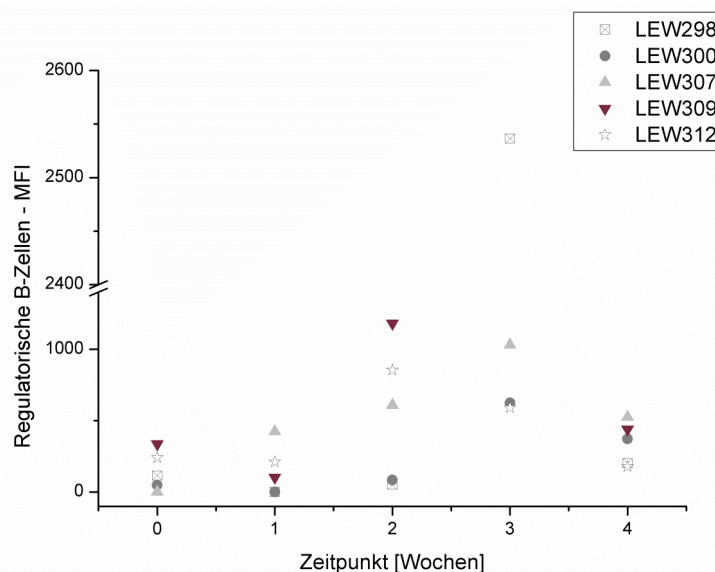


Abbildung 26: Regulatorische B-Zellen der Gruppe „Allo Anti-CD20“. Dargestellt ist die Differenz des Medians der Fluoreszenzintensität (MFI) aus IL-10⁺ regulatorischen B-Zellen und der entsprechenden MFI des Isotyps zu IL-10 im peripheren Blut. Die Tiere der Versuchsgruppe „Allo Anti-CD20“ (n=5) haben in der Woche 1 nach der Nierentransplantation eine Injektion des Antikörpers Anti-CD20 erhalten.

3.5.2. FoxP3⁺ regulatorische B-Zellen

Neben der Analyse von IL-10⁺ regulatorischen B-Zellen, wurde auch die Expression von FoxP3⁺ B-Zellen untersucht. Die Ergebnisse der FACS-Analyse sind in Abbildung 27 gezeigt. Die oberen beiden FACS-Bilder zeigen die Doppelfärbung für CD45RA und FoxP3 (28b) beziehungsweise dessen Isotyp (28a). FoxP3⁺ B-Zellen wären für beide Marker positiv und demnach in dem Bereich Q2 in Grafik 28b erwartet worden. Wie diese Analyse zeigt, konnten im peripheren Blut, wie auch in den Organen Milz und Lymphknoten, keine B-Zellen nachgewiesen werden, die FoxP3 exprimieren. Die FoxP3⁺ Population in Q1 in Abbildung 28b zeigt, dass es vermutlich T-Zellen gibt, die FoxP3 produzieren. Zur Überprüfung ist deshalb auch eine Färbung mit CD4 als Marker für T-Zellen gefärbt worden. Die Ergebnisse sind in Abbildung 27 c und d abgebildet. In der linken Grafik ist die Färbung mit dem Isotyp zu sehen, rechts mit FoxP3. Hier gibt es sowohl eine Population, die für CD4 positiv ist, also auch Zellen, die FoxP3 ausschütten und für CD4 negativ sind.

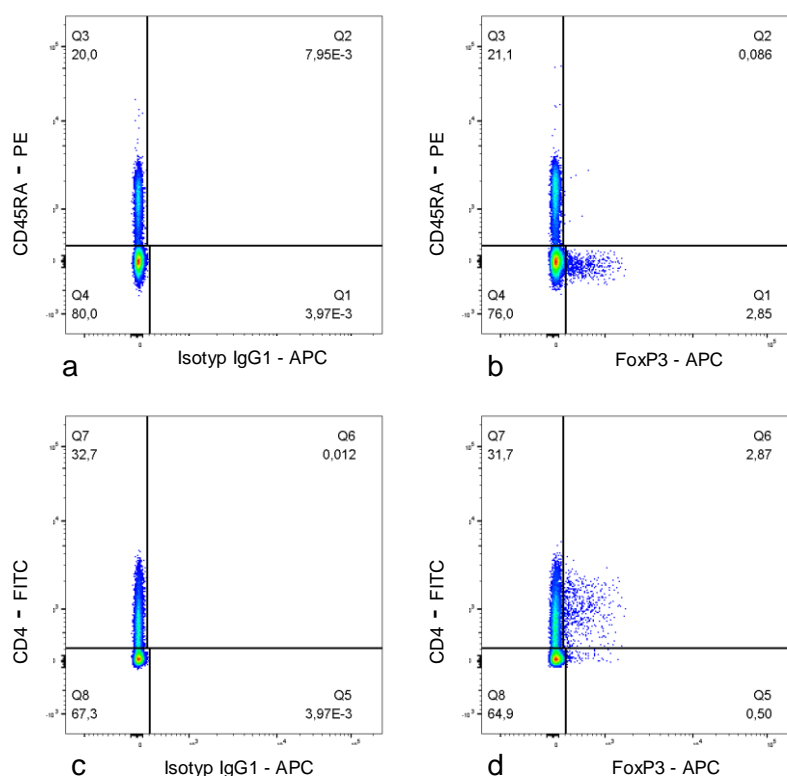


Abbildung 27: Nachweis von FoxP3⁺ B- & T-Zellen. Repräsentative Darstellung der FACS-Analyse zu FoxP3⁺ B-Zellen und FoxP3⁺ T-Zellen im peripheren Blut des Tieres LEW 312 in Woche 1 der Gruppe „Allo Anti-CD20“. Gezeigt sind jeweils die Isotypkontrollen für FoxP3 mit CD45RA zum Nachweis von B-Zellen (Abb. a) sowie CD4 zum Nachweis von T-Zellen (Abb. c). In den Abbildungen b und d sind die entsprechenden Färbungen mit FoxP3 zu sehen. Es konnten keine FoxP3⁺ B-Zellen nachgewiesen werden (Abb. b Q2).

3.5.3. IL-10⁺ regulatorische T-Zellen

Auch T-Lymphozyten sind auf regulatorische Marker analysiert worden. Eine beispielhafte FACS-Färbung ist in Abbildung 24 zu sehen. Die CD45RA⁻IL-10⁺ Population ist als T-Lymphozytenpopulation definiert worden. Wie zuvor bei den IL-10⁺ B-Zellen ist auch zur Auswertung der IL-10⁺ T-Zellen die MFI verwendet worden. Die Ergebnisse der IL-10⁺ T-Zell-Analyse der Allo-Gruppe ist in Abbildung 28 zu finden. Die sind nicht gemittelt worden und es sind die Werte aller Tiere gezeigt. Bis auf das Tier LEW310 zeigen alle Tiere eine steigende Kurve, die ihr Maximum in Woche 4 am Ende des Versuches noch nicht erreicht zu haben scheinen. LEW310 hat die maximale IL-10-Ausschüttung in Woche 3 erreicht und zeigt danach bereits eine sinkende MFI. Die Analyse der IL-10⁺ T-Zellen zeigt einen ähnlichen Verlauf wie der der IL-10⁺ regulatorischen B-Zellen.

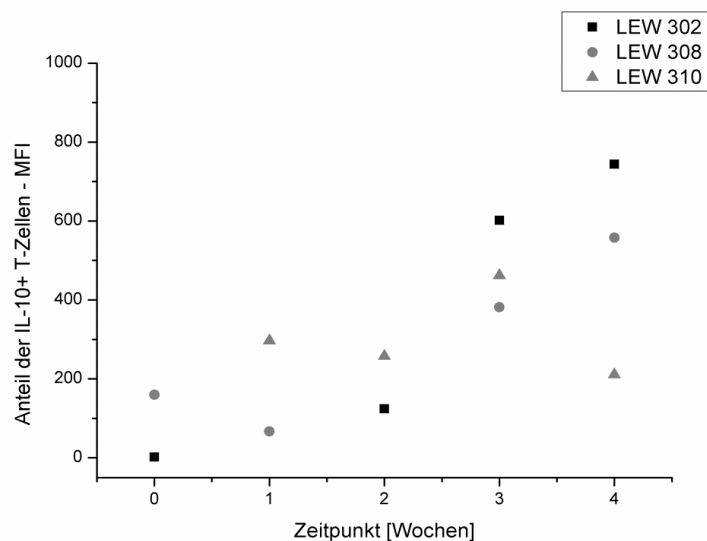


Abbildung 28: IL-10⁺ regulatorische T-Zellen der Gruppe „Allo“. Dargestellt ist die Differenz des Medians der Fluoreszenzintensität (MFI) aus CD4⁺IL-10⁺ regulatorischen T-Zellen und der entsprechenden MFI des Isotyps zu IL-10 im peripheren Blut. Die Tiere der Versuchsgruppe „Allo“ (n=3) haben in der Woche 1 nach der Nierentransplantation eine NaCl-Injektion erhalten.

Einen ähnliches Ergebnis ist auch in der Gruppe „Allo Anti-CD20“ zu finden (vgl. Abbildung 29). Dort zeigt der Ergebnisverlauf ebenfalls Parallelen zu den Ergebnissen der regulatorischen B-Zell-Analyse. Das Maximum der IL-10-Sekretion ist bei den Tieren in Woche 2 oder 3 zu sehen. Deutlich erhöht ist der maximale Wert des Tieres LEW309 in Woche 3 (MFI:12553), während sich die maximalen Messwerte der anderen Tiere in Bereichen zwischen einer MFI von 700-1000 anordnen. In Woche 4 sinken die Werte aller Tiere bereits wieder und erreichen eine Fluoreszenzintensität von 200-600.

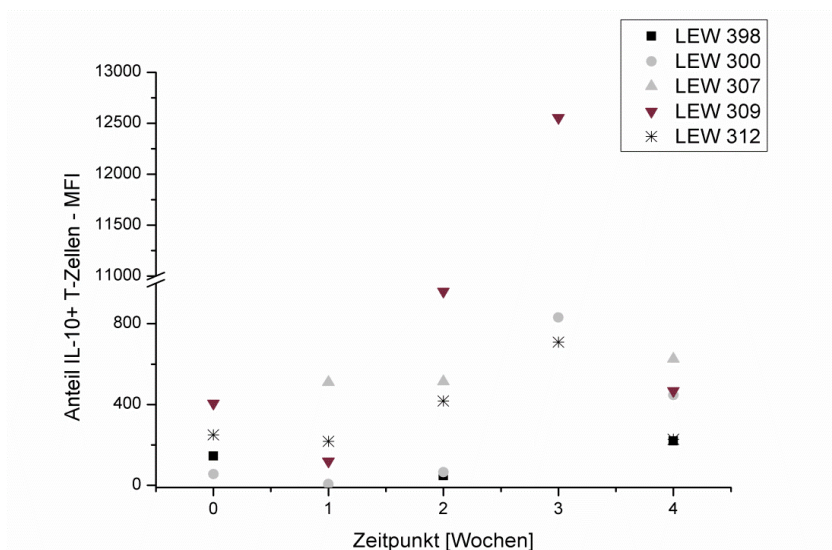


Abbildung 29: IL-10⁺ regulatorische T-Zellen der Gruppe „Allo Anti-CD20“. Dargestellt ist die Differenz des Medians der Fluoreszenzintensität (MFI) aus CD4⁺IL-10⁺ regulatorischen T-Zellen und der entsprechenden MFI des Isotyps zu IL-10 im peripheren Blut. Die Tiere der Versuchsgruppe „Allo Anti-CD20“ (n=5) haben in der Woche 1 nach der Nierentransplantation eine Injektion des Antikörpers Anti-CD20 erhalten.

3.5.4. FoxP3⁺ regulatorische T-Zellen

Wie bereits in Kapitel 3.5.2. nachgewiesen, gibt es FoxP3⁺ exprimierende T-Zellen. Bei der CD4⁺ FoxP3⁺ Population handelt es sich um regulatorische T-Zellen. Die Ergebnisse der Analyse sind in Abbildung 30 dargestellt. Gezeigt sind der gemittelte prozentuale Anteil, sowie die Standardabweichung der Populationen beider Gruppen im Vergleich. Analysiert worden sind die Lymphozyten des peripheren Blutes. Mit Beginn der Transplantation scheinen beide Populationen in Woche 1 zu sinken. Erst in Woche 2 steigt die Expressionsrate wieder, sowohl die der B-Zell-depletierten Tiere, als auch der nicht depletierten Tiere. Zu beachten ist allerdings die hohe Standardabweichung. In Woche 3 scheinen die regulatorischen T-Zellen der Allo-Tiere noch weiter zu steigen, während der Anteil an regulatorischen T-Zellen in der Gruppe „Allo Anti-CD20“ langsam ein wenig sinkt. Am deutlichsten unterscheiden sich beide Gruppe in Woche 4, in der die Population der regulatorischen T-Zellen der von 2,81 % im Mittel in Woche 3 auf 1,26 % im Mittel in Woche 4 gesunken ist. Während die Population der Allo-Tiere sich nur geringfügig ändert und jeweils etwa 3 % betrug.

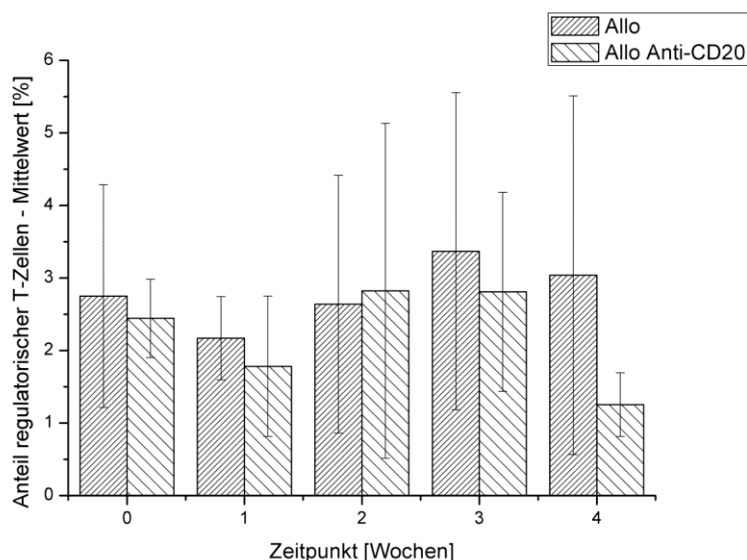


Abbildung 30: Anteil der regulatorischen T-Zellen im peripheren Blut. Dargestellt ist der wöchentlich analysierte gemittelte Anteil der regulatorischen T-Zellen der gesamten Lymphozytenpopulation in Prozent im peripheren Blut. Vergleich der Gruppen „Allo“ (n=3), die in Woche 1 nach der Nierentransplantation eine NaCl-Injektion erfahren haben, und „Allo Anti-CD20“ (n=5), die in Woche 1 den Antikörper Anti-CD20 zur Depletion der B-Zellen injiziert bekommen haben.

Neben FoxP3 sollen regulatorische T-Lymphozyten auch CD25 exprimieren, der als Aktivierungsmarker gilt. Die Ergebnisse des Monitorings zum CD4⁺CD25⁺ Zellen ist in Abbildung 31 dargestellt. Die Grafik zeigt die Entwicklung der Populationen im peripheren Blut über den gesamten Versuchsverlauf. Die Messwerte beider Gruppen steigen nach der Transplantation in Woche 1 an. In Woche 2 scheinen die aktivierten T-Zellen der B-Zell-depletierten Tiere mit 5,37 % im Mittel noch einmal deutlich stärker anzusteigen, als die Population der Allo-Tiere mit einem mittleren Wert von 4,03 %. In Woche 3 sinken beide Werte auf 3,12 % (Allo) und 3,90 % (Allo Anti-CD20). Woche 4 zeigt Dezimierung der Allo-Population, während die aktivierten T-Zellen der B-Zell-depletierten Tiere konstant bleibt. Insgesamt ist der Anteil der aktivierten T-Zellen größer als der der regulatorischen T-Zellen, die FoxP3⁺ exprimieren, sodass davon auszugehen ist, dass weitere T-Zellen über den Aktivierungsmarker verfügen.

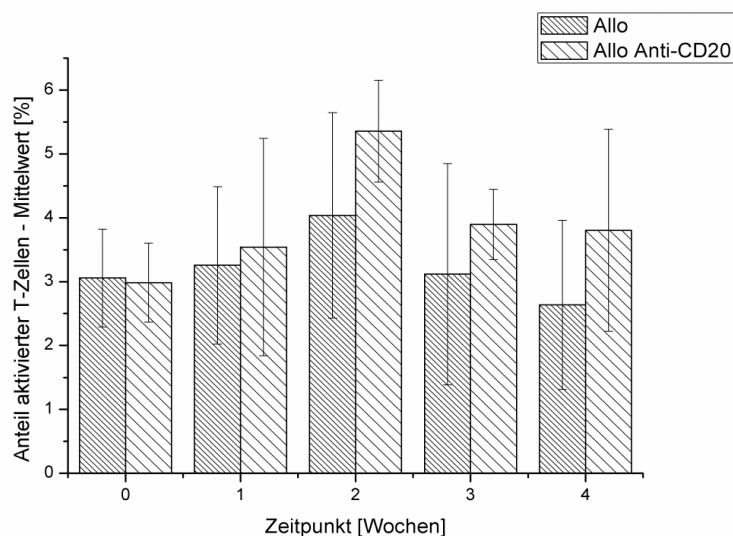


Abbildung 31: Anteil der aktivierten T-Zellen im peripheren Blut. Dargestellt ist der wöchentlich analysierte gemittelte Anteil der aktivierten T-Zellen der gesamten Lymphozytenpopulation in Prozent im peripheren Blut. Vergleich der Gruppen „Allo“ (n=3), die in Woche 1 nach der Nierentransplantation eine NaCl-Injektion erfahren haben, und „Allo Anti-CD20“ (n=5), die in Woche 1 den Antikörper Anti-CD20 zur Depletion der B-Zellen injiziert bekommen haben.

Die Analyse der Organe am Versuchsende zeigte keine Unterschiede. Allerdings konnte hier in der Gruppe „Allo“ nur ein Tier berücksichtigt werden und die Auswertung der Gruppe „Allo Anti-CD20“ basiert auf der Analyse von drei Versuchstieren, sodass die Aussagekraft etwas eingeschränkt ist. Jedoch zeigt nur die Population der B-Zell-depletierten Tiere in den Lymphknoten eine hohe Standardabweichung. Im Mittel unterscheiden sich weder die Populationen in der Milz, noch in den Lymphknoten deutlich.

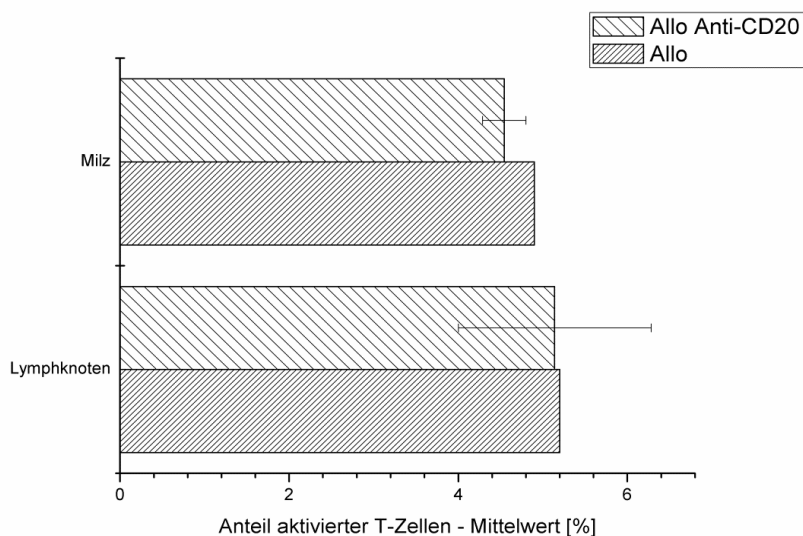


Abbildung 32: Anteil der aktivierten T-Zellen in den Lymphknoten und in der Milz. Dargestellt ist der gemittelte Anteil der aktivierten T-Zellen der gesamten Lymphozytenpopulation in Prozent in den Lymphknoten und in der Milz in Woche 4 nach Versuchsende. Vergleich der Gruppen „Allo“ (n=1), die in Woche 1 nach der Nierentransplantation eine NaCl-Injektion erfahren haben, und „Allo Anti-CD20“ (n=3), die in Woche 1 den Antikörper Anti-CD20 zur Depletion der B-Zellen injiziert bekommen haben.

Eine statistische Auswertung des Nachweises von FoxP3⁺ regulatorischen Zellen in den Organen Milz und Lymphknoten war leider nicht möglich. Jedoch zeigen die Grafiken in Abbildung 33, dass sowohl in den Lymphknoten (a,b), als auch in der Milz ein Nachweis von FoxP3⁺ T-Zellen möglich war. Die Abbildungen zeigen jeweils die Doppelfärbungen für CD4 und FoxP3, sowie den entsprechenden Isotyp dazu.

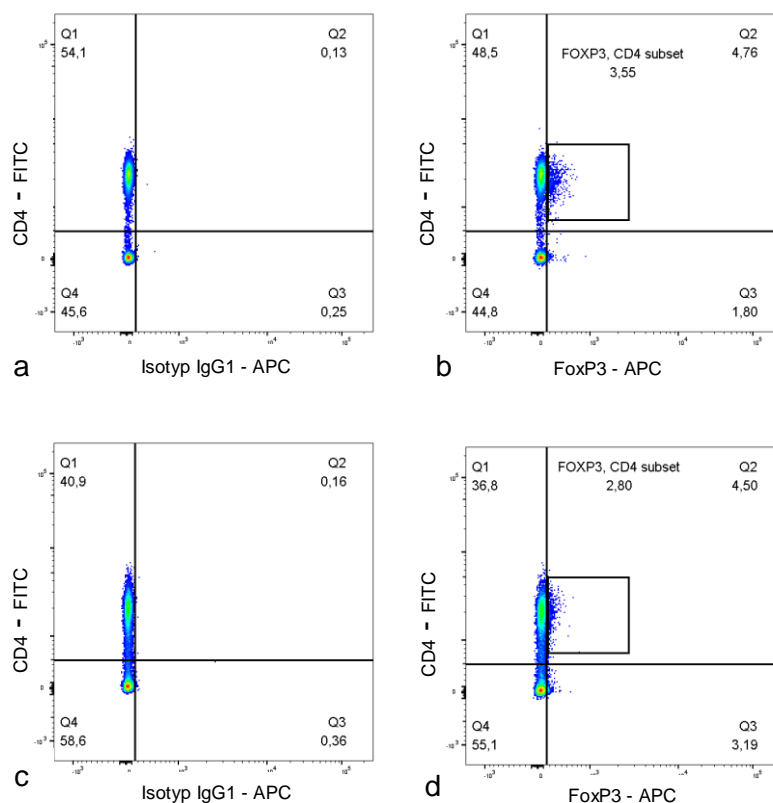


Abbildung 33: Nachweis von regulatorischen T-Zellen in den Lymphknoten (Abb. a,b) und in der Milz (Abb. c,d). Repräsentative Darstellung der FACS-Analyse zu FoxP3⁺ T-Zellen des Tieres LEW 308 in Woche 4 am Ende des Versuches der Gruppe „Allo“. Gezeigt sind jeweils die Isotypkontrollen für FoxP3 mit CD4 zum Nachweis von regulatorischen T-Zellen (Abb. a, c). In den Abbildungen b und d sind die entsprechenden Färbungen mit FoxP3 zu sehen.

3.6. Monitoring der T- & NK-Zellpopulationen

Neben der Charakterisierung von B-Lymphozyten und regulatorischen Immunzellen, fand auch ein Monitoring der T-Helfer-Zellen, cytotoxischen T-Zellen sowie Natural Killer Zellen (NK) und Natural Killer T-Zellen (NKT) statt, die in folgenden Kapiteln beschrieben wird. Die Darstellung der CD45⁺ Populationen im peripheren Blut wird in absoluten Zellzahlen ausgewertet, da die B-Lymphozyten der „Allo Anti-CD20“-Gruppe depletiert sind und sich demnach alleine aufgrund der Depletion die prozentuale Zusammensetzung der T- & NK-Zellen ändert, ohne einen Einfluss der Depletion untersuchen zu können. Die Darstellung in absoluten Zellzahlen ist für Organe Lymphknoten und Milz nicht möglich, weshalb der Aspekt des Einflusses der Depletion bei der Auswertung berücksichtigt werden muss.

3.6.1. T-Zellen – CD45⁺CD3⁺

Die gesamte Population der T-Zellen ist über die Marker CD45, der auf sämtlichen Lymphozyten zu finden ist, sowie CD3 definiert. CD3 ist auf allen T-Lymphozyten zu finden und bildet mit dem TCR (*T cell receptor*) den TCR-Komplex. Eine charakteristische Färbung zur FACS-Analyse ist in Abbildung 34 zu sehen. Die Zellen sind für die Marker CD3 und CD45 positiv und repräsentieren in Woche 0 einen Anteil von 69,0 % aller Lymphozyten.

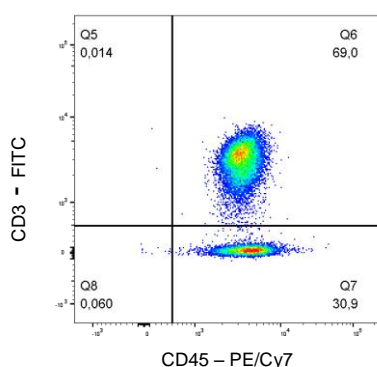


Abbildung 34: Charakteristische Färbung der T-Lymphozyten. Dargestellt ist die Färbung der Marker CD3-FITC (y-Achse) und CD45-PE/cy7 (x-Achse). Gezeigt ist ein repräsentatives Tier in Woche 0.

In Abbildung 35 ist der absolute Anteil der T-Lymphozyten beider Gruppen im Vergleich dargestellt. Der Verlauf der Werte zeigt, dass sich die Populationen nicht charakteristisch unterscheiden. In Woche 1 ist ein leichter Anstieg nach der Transplantation für beide Gruppen zu erkennen. Ab Woche 3 pendeln die Zahlenwerte beider Gruppen wieder um den Anfangswert in Woche 0 mit jeweils ungefähr 6 Milliarden Zellen/L. Vor allem in Woche 4 ist eine hohe Standardabweichung für die Berechnung der T-Lymphozytenpopulation ermittelt worden.

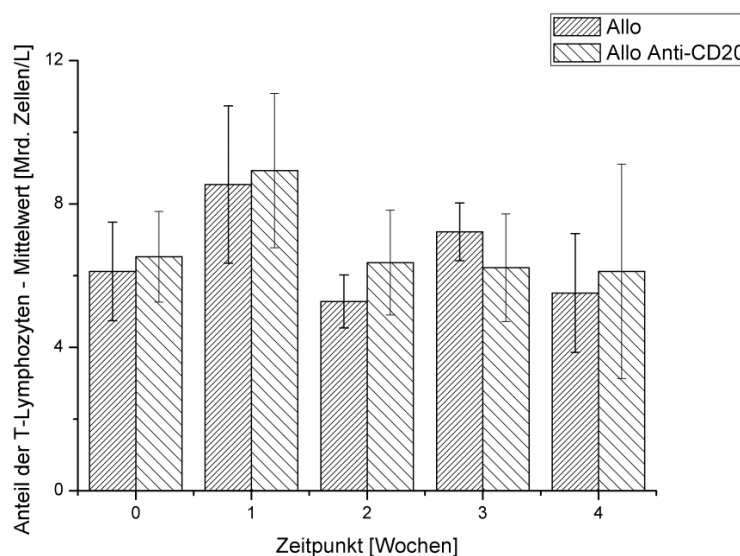


Abbildung 35: Gesamtanteil der T-Zellen. : Dargestellt ist der wöchentlich analysierte gemittelte Anteil der T-Zellen der gesamten Lymphozytenpopulation in Milliarden Zellen/L im peripheren Blut. Vergleich der Gruppen „Allo“ (n=3), die in Woche 1 nach der Nierentransplantation eine NaCl-Injektion erfahren haben, und „Allo Anti-CD20“ (n=5), die in Woche 1 den Antikörper Anti-CD20 zur Depletion der B-Zellen injiziert bekommen haben.

Ein Vergleich mit der Analyse der Organe am Ende des Versuches zeigt, dass die Allo-Tiere geringere T-Zellpopulationen aufweisen als die Allo Anti-CD20-Tiere, das, wie oben erwähnt, vermutlich auf die B-Zell-Depletion zurückzuführen ist. Ein Vergleich mit dem Anteil der B-Lymphozyten in den Organen zeigt, dass sich dort beide Gruppen um 10-15 % unterscheiden (vgl. Abbildung 13). Dies ist in etwa der Prozentsatz um den sich hier die Tiere der Allo-Gruppe von denen aus der Gruppe der B-Zell-depletierten Tiere unterscheiden. Daher wären in absoluten Werten ebenfalls etwa gleich große Zahlenwerte der beiden Gruppen in den Organen zu erwarten.

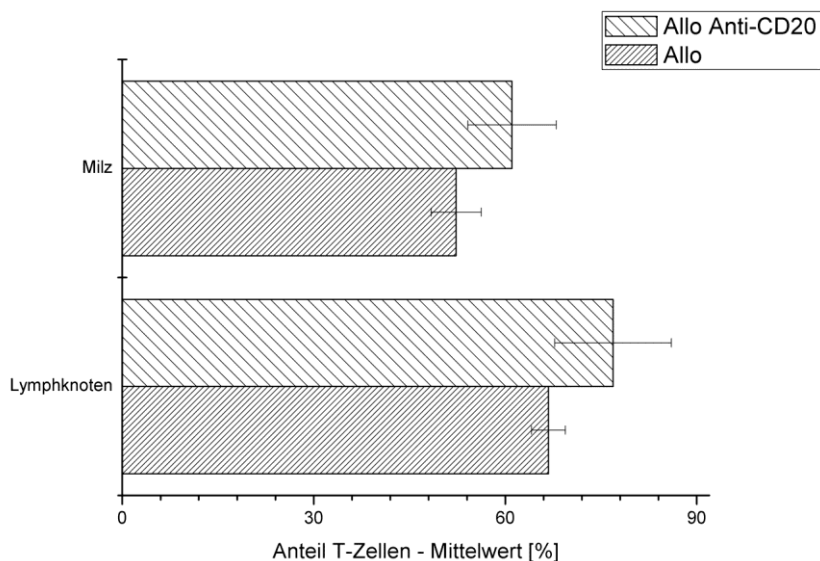


Abbildung 36: Anteil der T-Zellen in den Lymphknoten und der Milz. Dargestellt ist gemittelter Anteil der T-Zellen der gesamten Lymphozytenpopulation in Prozent in den Lymphknoten und in der Milz in Woche 4 nach Versuchsende. Vergleich der Gruppen „Allo“ (n=3), die in Woche 1 nach der Nierentransplantation eine NaCl-Injektion erfahren haben, und „Allo Anti-CD20“ (n=5), die in Woche 1 den Antikörper Anti-CD20 zur Depletion der B-Zellen injiziert bekommen haben.

3.6.2. T-Helfer-Zellen – CD3⁺CD4⁺

T-Helfer-Zellen sind über die Marker CD3⁺CD4⁺ definiert. Das Ergebnis der entsprechenden Färbungen der T-Helfer-Zellen im peripheren Blut ist in Abbildung 38 gezeigt.

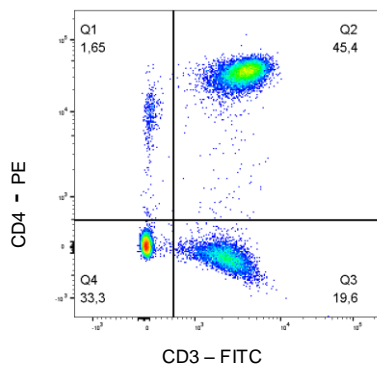


Abbildung 37: Charakteristische Färbung der T-Helfer-Zellen. Dargestellt ist die Färbung der Marker CD3-FITC (x-Achse) und CD4-PE (y-Achse). Gezeigt ist ein repräsentatives Tier in Woche 0.

Die Entwicklung der T-Helfer-Zellen der beiden Versuchstiergruppen ist im Vergleich in Abbildung 38 gezeigt. Es ist ein langsamer Anstieg der T-Helfer-Zellen nach der Transplantation zu sehen, der in Woche 2 ein wenig abnimmt und sich ab dann auf sein Ausgangsniveau zwischen 4 und 5 Mrd. Zellen/L einpendelt. Es sind keine signifikanten Unterschiede zwischen Tieren, die eine Antikörper-Behandlung erfahren haben und nicht behandelten Tieren zu erkennen.

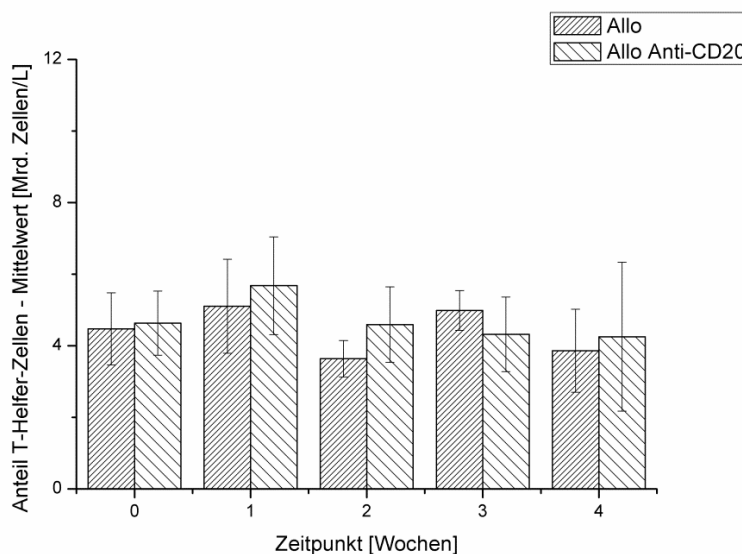


Abbildung 38: Anteil der T-Helfer-Zellen im peripheren Blut. Dargestellt ist der wöchentlich analysierte gemittelte Anteil der T-Helfer-Zellen (T_H) der gesamten Lymphozytenpopulation in Prozent im peripheren Blut. Vergleich der Gruppen „Allo“ (n=3), die in Woche 1 nach der Nierentransplantation eine NaCl-Injektion erfahren haben, und „Allo Anti-CD20“ (n=5), die in Woche 1 den Antikörper Anti-CD20 zur Depletion der B-Zellen injiziert bekommen haben.

In Abbildung 39 ist der Anteil der T-Helfer-Zellen in der Milz und den Lymphknoten gezeigt. Auch hier ist der Einfluss der B-Zell-Depletion zu erkennen, denn die Anzahl der T-Helfer-Zellen ist in den Tieren entsprechend höher. Die Anzahl der T-Helfer-Zellen scheint in den Lymphknoten ein wenig höher zu sein als in der Milz.

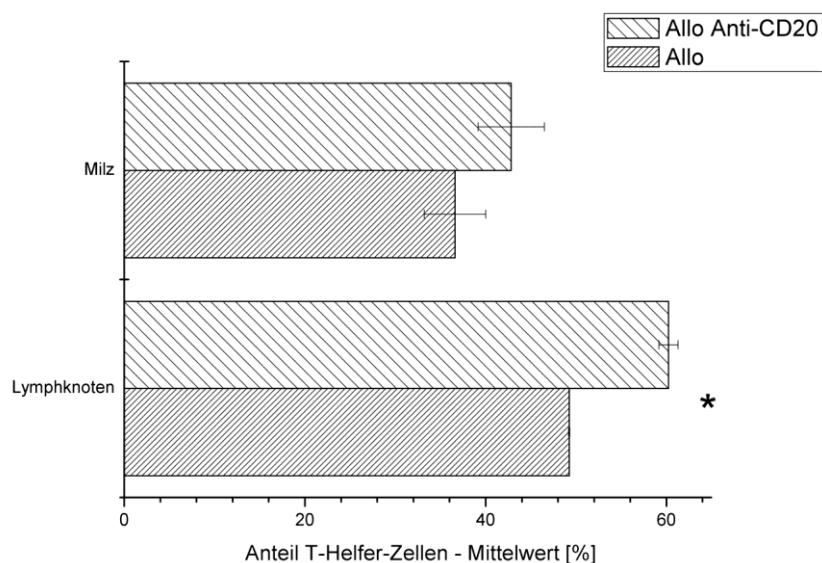


Abbildung 39: Anteil der T-Helfer-Zellen in den Lymphknoten und der Milz. Dargestellt ist der gemittelte Anteil der T-Helfer-Zellen (T_H) der gesamten Lymphozytenpopulation in Prozent in den Lymphknoten und in der Milz in Woche 4 nach Versuchsende. Vergleich der Gruppen „Allo“ (n=3), die in Woche 1 nach der Nierentransplantation eine NaCl-Injektion erfahren haben, und „Allo Anti-CD20“ (n=5), die in Woche 1 den Antikörper Anti-CD20 zur Depletion der B-Zellen injiziert bekommen haben. Die Ergebnisse zeigen signifikante Unterschiede der beiden Gruppen im Vergleich in Lymphknoten.

3.6.3. Cytotoxische T-Zellen – CD3⁺CD8⁺

Zur Charakterisierung von cytotoxischen T-Zellen sind die Lymphozyten mit CD3 und CD8 markiert worden. Das Ergebnis der durchflusszytometrischen Analyse ist in Abbildung 40 zu sehen. Die Population der cytotoxischen T-Zellen beträgt in diesem Beispiel 16,7 % und ist im Quadrat 2 zu finden.

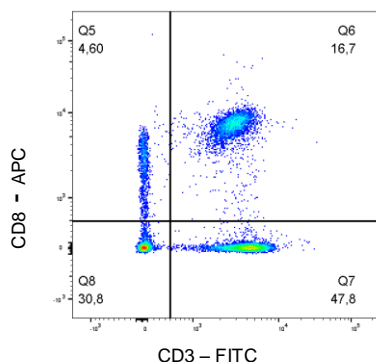


Abbildung 40: Charakteristische Färbung der cytotoxischen T-Zellen. Dargestellt ist die Färbung der Marker CD3-FITC (x-Achse) und CD8-APC (y-Achse). Gezeigt ist ein repräsentatives Tier in Woche 0.

Eine Auswertung der Ergebnisse ist in Abbildung 41 zu sehen. Dort ist die absolute Zellzahl der CD3⁺CD8⁺ Zellen in Mrd. Zellen/L gegen die Zeitpunkte in Wochen aufgetragen. Die Resultate zeigen, dass sich die Populationen der beiden Versuchstiergruppen kaum unterscheiden. Auffallend ist der Anstieg der Zellzahl in der ersten Woche nach der Transplantation. Danach sinken die absoluten Werte der cytotoxischen T-Zellen wieder und erreichen die Range ihrer anfänglichen Werte wieder (~ 1,65 Mrd. Zellen/L). In Woche 4 ist eine relativ hohe Standardabweichung der „Allo Anti-CD20“-Gruppe erreicht worden.

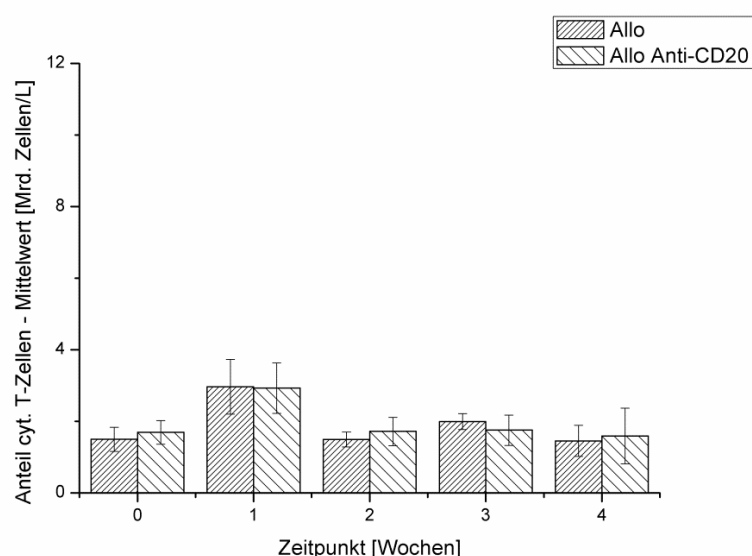


Abbildung 41: Anteil der cytotoxischen T-Zellen im peripheren Blut. Dargestellt ist der wöchentlich analysierte gemittelte Anteil der cytotoxischen T-Zellen der gesamten Lymphozytenpopulation in absoluten Zahlen im peripheren Blut. Vergleich der Gruppen „Allo“ (n=3), die in Woche 1 nach der Nierentransplantation eine NaCl-Injektion erfahren haben, und „Allo Anti-CD20“ (n=5), die in Woche 1 den Antikörper Anti-CD20 zur Depletion der B-Zellen injiziert bekommen haben.

Entsprechend ist in Abbildung 42 die Analyse der Organe in prozentualen Werten dargestellt. Die Analyse ergab für die Populationen in den Lymphknoten einen signifikanten Unterschied, der kritisch betrachtet werden muss, da, wie bereits zuvor erwähnt, die B-Zell-Depletion zu diesem Ergebnis geführt haben könnte.

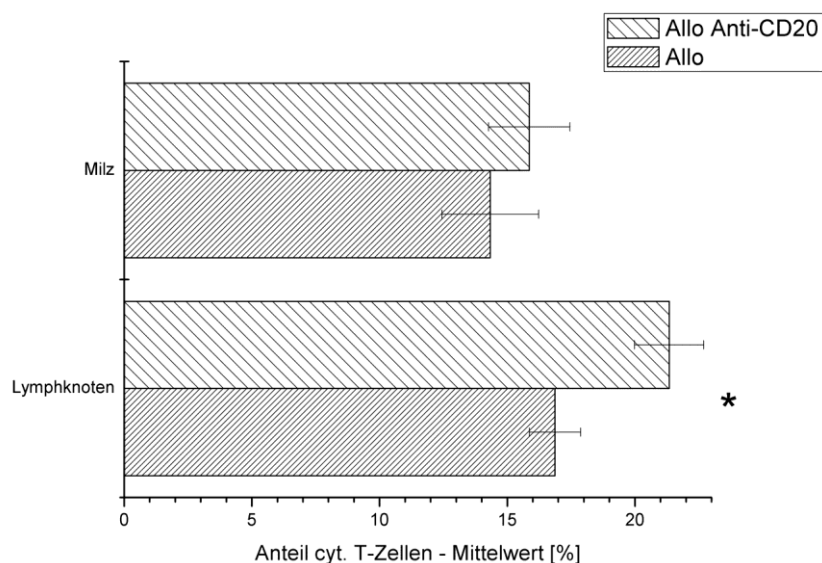


Abbildung 42: Anteil der cytotoxischen T-Zellen in den Lymphknoten und der Milz. Dargestellt ist der gemittelte Anteil der cytotoxischen T-Zellen der gesamten Lymphozytenpopulation in Prozent in den Lymphknoten und in der Milz in Woche 4 nach Versuchsende. Vergleich der Gruppen „Allo“ (n=3), die in Woche 1 nach der Nierentransplantation eine NaCl-Injektion erfahren haben, und „Allo Anti-CD20“ (n=5), die in Woche 1 den Antikörper Anti-CD20 zur Depletion der B-Zellen injiziert bekommen haben. In den Lymphknoten unterscheiden sich die Anteile beider Gruppen signifikant.

3.6.4. Natural Killer-Zellen – CD3⁻CD161^{high}

Die Definition der Natural Killer-Zellen (NK) erfolgt durch die Marker CD3 und CD161. Diese Zellen verfügen eine besonders hohe CD161-Expression und sind für CD3 negativ. Eine entsprechende Färbung der Zellen ist in Abbildung 43 zu sehen. Die relevante Population ist im Kasten im Quadrat 1 zu sehen und hat einen Anteil an der gesamten Lymphozytenzahl von 6,20 %. Neben den NK-Zellen sind dort auch NKT-Zellen charakterisiert worden. Die Beschreibung dieser Zellgruppe erfolgt im nächsten Kapitel.

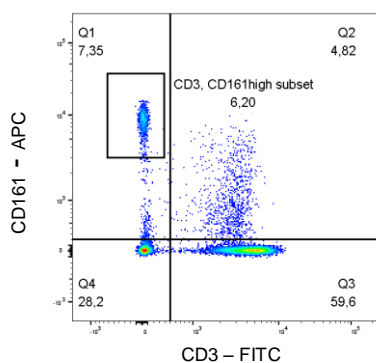


Abbildung 43: Charakteristische Färbung der NK- & NKT-Zellen. Dargestellt ist die Färbung der Marker CD3-FITC (x-Achse) und CD161-APC (y-Achse). Gezeigt ist ein repräsentatives Tier in Woche 0. NK-Zellen sind durch die Population CD3⁻CD161^{high} (Kasten in Q1) definiert, während NKT-Zellen für beide Marker positiv sind (Q2).

In Abbildung 44 ist der absolute Wert der NK-Zellen in Mrd. Zellen/L über den gesamten Versuchsverlauf im peripheren Blut dargestellt. Die Zellzahlen beider Gruppen scheinen sich nicht deutlich zu unterscheiden. Nach der Transplantation steigen die absoluten Werte fast um das 10-fache an und erreichen 2,06 Mrd. Zellen/L (Allo) und 1,70 Mrd. Zellen/L (Allo Anti-CD20). In den folgenden Analysen sind die Werte wieder deutlich gesunken, erreichen aber auch am Versuchsende in Woche 4 noch nicht wieder einen anfänglichen Wert von 0,23 Mrd Zellen/L in der Allo-Gruppe beziehungsweise 0,25 Mrd. Zellen in der Gruppe der B-Zell-depletierten Tiere.

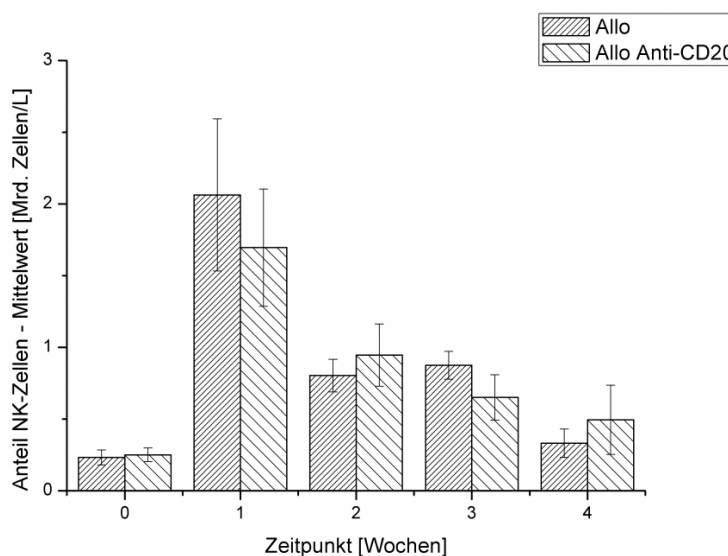


Abbildung 44: Anteil der Natural Killer Zellen (NK) im peripheren Blut. Dargestellt ist der wöchentlich analysierte gemittelte Anteil der NK-Zellen der gesamten Lymphozytenpopulation in absoluten Zahlen in Mrd. Zellen/L im peripheren Blut. Vergleich der Gruppen „Allo“ (n=3), die in Woche 1 nach der Nierentransplantation eine NaCl-Injektion erfahren haben, und „Allo Anti-CD20“ (n=5), die in Woche 1 den Antikörper Anti-CD20 zur Depletion der B-Zellen injiziert bekommen haben.

Eine Analyse der Organe zeigt einen deutlichen Unterschied der Verteilung von Natural Killer-Zellen im Vergleich von Milz und Lymphknoten (vgl. Abbildung 45). Während sich in den Lymphknoten nur etwa 0,2 % - 0,3 % NK-Zellen befinden, konnten in der Milz 1,84 % (Allo) und 3,14 % (Allo Anti-CD20) nachgewiesen werden. Der Unterschied zwischen den Allo- und den Allo Anti-CD20-Tieren ist vermutlich wieder auf die fehlenden B-Zellen zurückzuführen, die aufgrund der Depletion die prozentuale Verteilung dieser Population beeinflussen.

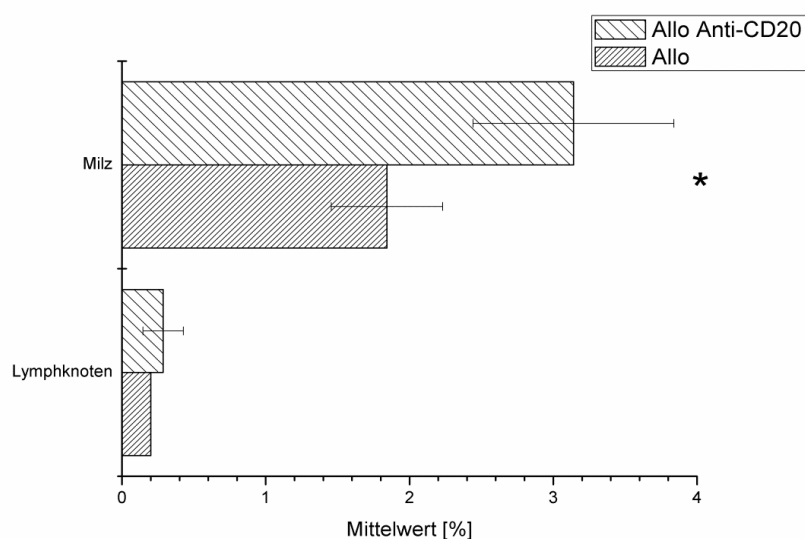


Abbildung 45: Anteil der Natural Killer Zellen (NK) in den Lymphknoten und in der Milz. Dargestellt ist der gemittelte Anteil der NK-Zellen der gesamten Lymphozytenpopulation in Prozent in den Lymphknoten und in der Milz in Woche 4 nach Versuchsende. Vergleich der Gruppen „Allo“ (n=3), die in Woche 1 nach der Nierentransplantation eine NaCl-Injektion erfahren haben, und „Allo Anti-CD20“ (n=5), die in Woche 1 den Antikörper Anti-CD20 zur Depletion der B-Zellen injiziert bekommen haben. Die Anteile beider Gruppen in der Milz unterscheiden sich signifikant.

3.6.5. Natural Killer T-Zellen – CD3⁺CD161⁺

Eine typische FACS-Färbung für die Marker CD3 und CD161, über die Natural Killer T-Zellen definiert werden, ist bereits im vorherigen Kapitel gezeigt worden. Die Ergebnisse dieser Analyse sind in Abbildung 46 gezeigt. Dargestellt sind die absoluten Zahlen der NKT-Zellen in Mrd. Zellen/L pro Woche. Ein Einfluss der B-Zell-Depletion ist nicht zu erkennen, sodass kein Unterschied zwischen den beiden Versuchsgruppen festgestellt werden konnte. Ein deutlicher Anstieg der Zellzahlen ist nach der Transplantation von ca. 0,1 Mrd. Zellen/L in beiden Gruppen in Woche 0 auf etwa 0,9 Mrd. Zellen/L in Woche 1. In Woche 2 nimmt die Anzahl der NKT-Zellen deutlich ab und reduziert sich auf 0,3 Mrd. Zellen/L. Am Ende des Versuchs sind die Zellzahlen geringfügig höher als zu Beginn.

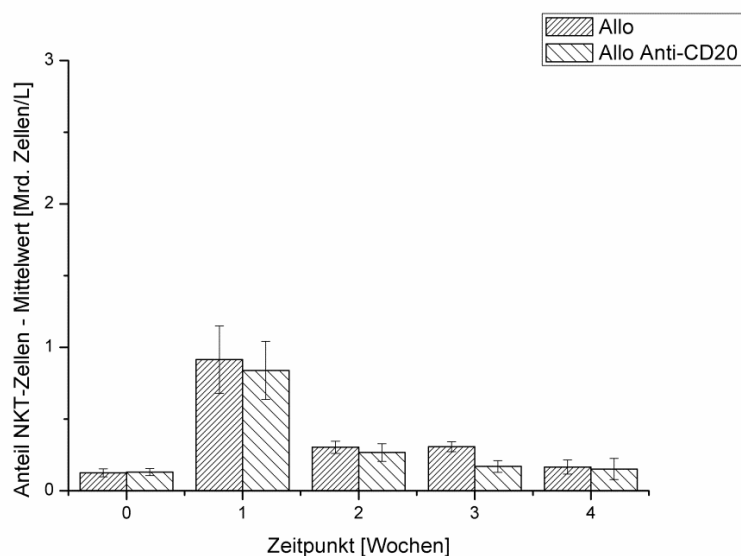


Abbildung 46: Anteil der Natural Killer T-Zellen (NKT) im peripheren Blut. Dargestellt ist der wöchentlich analysierte gemittelte Anteil der NK-Zellen der gesamten Lymphozytenpopulation in absoluten Zahlen (Mrd. Zellen/L) im peripheren Blut. Vergleich der Gruppen „Allo“ (n=3), die in Woche 1 nach der Nierentransplantation eine NaCl-Injektion erfahren haben, und „Allo Anti-CD20“ (n=5), die in Woche 1 den Antikörper Anti-CD20 zur Depletion der B-Zellen injiziert bekommen haben.

Ein Unterschied ist zwischen den Versuchsgruppen in der Organanalyse nicht zu erkennen. Da die NKT-Zellen nur so einen geringen Anteil der gesamten Lymphozytenpopulation ausmachen, ist der Einfluss der B-Zell-Depletion in der prozentualen Darstellung der Ergebnisse in Abbildung 47 vermutlich nicht relevant. Deutlich ist jedoch der Unterschied zwischen Lymphknoten und Milz zu erkennen. In den Lymphknoten sind die NKT-Zellen jeweils mit nur 1 % repräsentiert, während ihr Anteil in der Milz fast 4 % beträgt und damit fast der vierfache Wert erreicht wird.

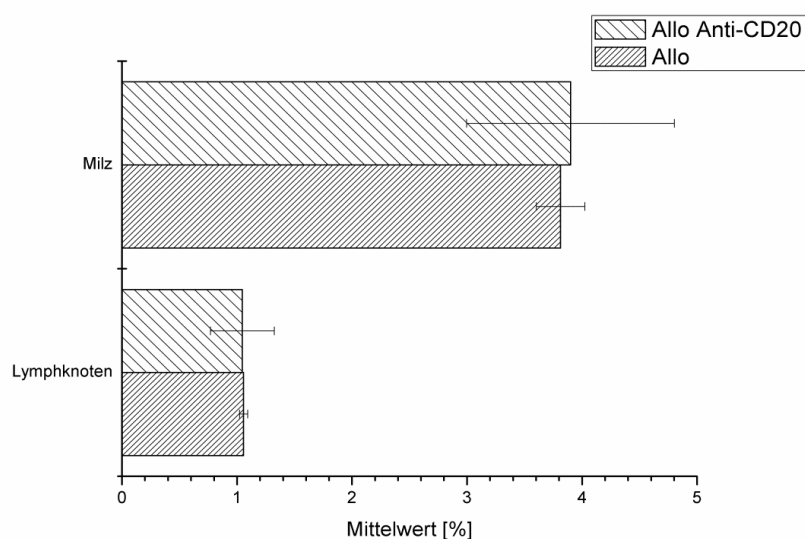


Abbildung 47: Anteil der Natural Killer T-Zellen (NKT) in den Lymphknoten und in der Milz. Dargestellt ist der gemittelte Anteil der NKT-Zellen der gesamten Lymphozytenpopulation in Prozent in den Lymphknoten und in der Milz in Woche 4 nach Versuchsende. Vergleich der Gruppen „Allo“ (n=3), die in Woche 1 nach der Nierentransplantation eine NaCl-Injektion erfahren haben, und „Allo Anti-CD20“ (n=5), die in Woche 1 den Antikörper Anti-CD20 zur Depletion der B-Zellen injiziert bekommen haben.

3.7. Immunhistologische Analyse der Zellinfiltrate

Die Ergebnisse der FACS-Analyse sollten mittels einer immunhistologischen Untersuchung der Zellinfiltrate in der Spender-Niere (NTX-Niere) bestätigt werden. Dazu sind neben Übersichtsfärbungen auf Basis der PAS-Färbung (Perjodacid-Schiffsche Reaktion) auch spezifische Färbungen zur Detektion von Makrophagen, NK-Zellen, B-Lymphozyten und T-Zellen durchgeführt worden. Die Ergebnisse der PAS-Färbung sind in Abbildung 48 dargestellt. Als Vergleich ist links ein isogen transplantiertes Tier gezeigt, das keine Abstoßung der Spender-Niere zeigt. In der Mitte ist das Tier LEW300 zu sehen, das allogren transplantiert wurde und eine B-Zell-Depletion erfahren hat und rechts ist das Tier LEW310 zu sehen, das ebenfalls allogren transplantiert wurde, allerdings nicht B-Zell-depletiert wurde. Auf der linken Abbildungen sind Glomerulum und Tubuli noch deutlich zu erkennen, während auf den anderen beiden Abbildungen nur noch jeweils die Umrisse eines Glomerulum, das aufgrund der Abstoßungsreaktion stark deformiert ist, zu erkennen sind. Es sind keine

histologischen Unterschiede zwischen der Niere des Tiers aus der Allo-Gruppe (LEW310) und der Niere des Tiers LEW300 aus der Gruppe „Allo Anti-CD20“ zu erkennen. Die Nierengewebe weisen in beiden Fällen deutliche Zeichen von Abstoßungsreaktionen auf und ein Großteil des Gewebes scheint bereits tot zu sein.

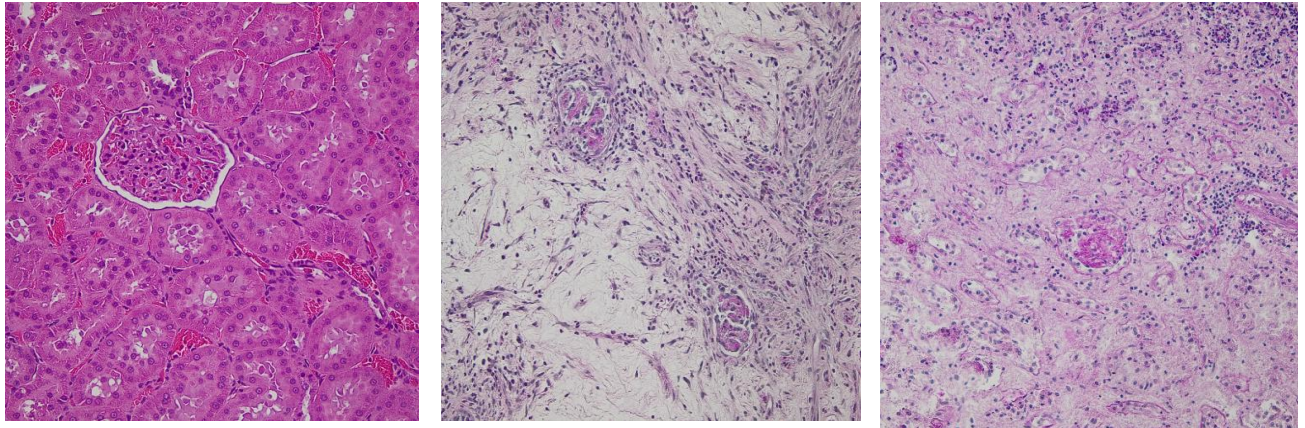


Abbildung 48: Vergleich der NTX-Niere in einem isogen transplantierten Tier (links), einem allogenen transplantierten Tier mit B-Zell-Depletion (Mitte) und einem allogenen transplantierten Tier ohne B-Zell-Depletion (rechts). Dargestellt sind 5 µm Paraffin-Schnitte der Tiere 300 (Mitte) und 310 (rechts), sowie von einem Kontrolltier (links). Abgebildet ist jeweils die Nierenrinde, die im Fokus ein Glomerulum zeigt. Die Aufnahmen zeigen eine 200x Vergrößerung.

Die Antikörper-Färbungen gegen spezifische Epitope einzelner Zelltypen bestätigen die Resultate der Übersichtsfärbungen. Es sind vorwiegend Makrophage anhand des Markers ED1 nachgewiesen worden (vgl. Anhang Abbildung I), die eine fortgeschrittene Abstoßungsreaktion indizieren.

4. DISKUSSION

In Vorversuchen konnte gezeigt werden, dass der zur Verfügung stehende Anti-CD20-Antikörper in der Ratte eine B-Zell-Depletion im peripheren Blut für mindestens elf Wochen bewirkt (Hu, 2013). Um zu untersuchen, welchen Einfluss die B-Zell-Depletion auf die Transplantatabstoßung hat, wurde ein MHC congenes Rattenmodell ohne weitere Immunsuppression verwendet (Pöhnert et al., 2010). In diesem Modell wurde der Antikörper am Tag 7 nach Transplantation eingesetzt, da zu diesem Zeitpunkt bereits eine signifikante B-Zell-Beteiligung an den Abstoßungsprozessen nachweisbar war (Lemke, et al., 2015). Ziel war es den Einfluss der B-Zell-Depletion auf den humoralen und zellulären Abstoßungsprozess zu untersuchen. Insbesondere waren die Rolle von regulatorischen T- und B-Zellen und ihre potentielle Interaktion interessant. Für diese Versuche wurden in der Versuchsgruppe „Allo“ drei Tiere generiert, in der Allo Anti-CD20-Gruppe, die zusätzlich eine Antikörperbehandlung erfuhr, fünf Tiere. Aus Vorversuchen ist bekannt, dass in der Allo-Gruppe die Tiere bei einer Eigennephrektomie signifikant höhere Kreatininwerte zeigen als Tiere, die isogen transplantiert wurden. Außerdem wurde erhöhte Albuminwerte im Urin detektiert, die auf eine Beeinträchtigung der Niere schließen lassen. Ein Teil der Tiere musste deshalb vor Ablauf von 4 Wochen aufgrund der schlechten Nierenfunktion getötet werden (Lemke, et al., 2015). Da hier insbesondere die Analysen der peripheren Lymphozyten über 4 Wochen verfolgt werden sollten, wurde entschieden, in diesen Versuchsgruppen keine Eigennephrektomie vorzunehmen, um das Überleben der Tiere bis Tag 30 unabhängig von der Transplantatfunktion zu gewährleisten. Wie zuvor beschrieben, zeigten die Tiere nach der Transplantation eine Gewichtsabnahme, welche auf den operativen Eingriff zurückzuführen ist. Nach der Transplantation erholten sich alle Tiere und konnten nach der ersten Woche wieder an Gewicht zunehmen.

Die allogene Transplantation führt zu einer Immunreaktion in den Tieren und damit zu einer vermehrten Nachweis von Lymphozyten im peripheren Blut. Nach der Transplantation steigen neben den Switched B-Zellen auch T- und

NK-Zellen. Signifikant ist dabei vor allem der Anstieg der NK sowie NKT-Zellen. Im weiteren Versuchsverlauf sinken die absoluten Werte im peripheren Blut wieder, was unter anderem daran liegen könnte, dass die Zellen das betroffene Gewebe infiltrieren und demnach im peripheren Blut nicht mehr detektierbar sind. Alternativ könnte auch die abklingende akute Entzündung die abnehmende Lymphozytenpopulation verursachen.

Zum Zeitpunkt der geplanten Injektion des Antikörpers bestand kein Unterschied zwischen den Gruppen. Die Injektion des Anti-CD20-Antikörpers führte fast zur vollständigen Depletion der CD45RA⁺IgG⁺ B-Zellen in Woche 2 im peripheren Blut (vgl. Abbildung 12) und verlief damit erfolgreich. CD45RA ist in Ratten spezifisch für B-Lymphozyten, wie Woollett bereits 1985 beschrieb (Woollett et al., 1985). Da die Injektion des Antikörpers in Woche 1 nach der Transplantation erfolgte, ist der maximale Effekt der Depletion erst in Woche 2 sichtbar. Am Ende des Versuches konnte die anfängliche Populationsgröße noch nicht wieder erreicht werden. Vorversuche im identischen Rattentransplantationsmodell und unter Verwendung des gleichen Antikörpers haben bereits gezeigt, dass eine Depletion der B-Lymphozyten auch nach elf Wochen den Ausgangswert des Prä-Depletionswertes noch nicht vollständig erreicht hat (Hu, 2013). In Woche 4 wurde im Rahmen dieser Versuche im Schnitt ein Wert von etwa 40 % der Population aus Woche 0 erlangt.

Die Untersuchung der Organe erfolgte ausschließlich in Woche 4 nach Versuchsende, sodass kein Verlauf der verschiedenen Populationen über mehrere Zeitpunkte vorliegt, sondern ausschließlich die Daten nach vier Wochen. Die Depletion der B-Lymphozyten in den Organen Milz und Lymphknoten erwies sich vermutlich als weniger effizient. So zeigten die Werte der Tiere der Allo Anti-CD20-Gruppe in der Milz nur geringe Unterschiede zu denen der nicht depletierten Tiere. In den Lymphknoten scheint es teilweise zur Depletion zu kommen. Demnach erreicht der Anti-CD20-Antikörper die B-Lymphozyten, die sich in den Organen befinden, nicht, oder nur in geringem Maße. Diese sind vermutlich weitgehend geschützt vor einer B-Zell-depletierenden Behandlung. Ähnliches ist auch in der Literatur zu finden. Hier

wurde an Menschen untersucht, inwieweit eine B-Zell-Depletion gegen CD20 in den sekundären lymphatischen Organen wirksam ist. Dabei zeigte sich auch in humanen Lymphknoten eine geringere Wirkung als im peripheren Blut (Kamburova et al., 2013; Thauinat et al., 2008). In der Milz erfolgt die Depletion ebenfalls in deutlich geringerem Maße (Audia et al., 2011). Des Weiteren hat sich auch die Population der B-Lymphozyten in der Allo-Gruppe reduziert und ist erst in Woche 4 wieder gestiegen. Dies ist auch bei Patienten zu beobachten, die nach mehreren Jahren eine Abstoßung ihres Transplantats zeigen (Van der Berg et al., 2012; Daniel et al., 2010). Demnach zeigen diese Depletionsversuche vergleichbare Ergebnisse wie sie auch in Patienten bei einer Anwendung von Rituximab zu beobachten sind.

Die Etablierung der B-Lymphozyten-Marker IgM und IgD erfolgte an Normaltieren, die B-Zell-depletiert wurden. Die Ergebnisse der Etablierung sollen als Vergleich für die folgenden Versuche dienen und zeigen, wie eine B-Zell-Verteilung in nicht transplantierten Tieren üblicherweise vorkommt. Zur Etablierung der Marker IgM und IgD ist sich an der Publikation von Le Berre et al., 2014 orientiert worden, bei dem ein ähnlicher Versuch an Ratten durchgeführt wurde. Die definierten Subpopulationen bilden die Grundlage für das Monitoring der B-Zell-Entwicklung in den allogenen transplantierten Tieren.

Zur näheren Charakterisierung der regulatorischen B-Zellen erfolgte die Etablierung von Interleukin 10 (IL-10). Die Recherche ergab potenziell verschiedenste Möglichkeiten, um regulatorische B-Zellen zu definieren. IL-10 schien in Kombination mit CD45RA bisher als signifikanter Marker für regulatorische B-Zellen zu gelten, weshalb sich für diese Färbung entschieden wurde (Goode et al., 2014). Im Rahmen dieser Arbeit wurden IL-10⁺ B-Zellen erstmalig in Ratten untersucht. Die Werte sind geringer als die der transplantierten Tiere. Dies würde mit den Erwartungen übereinstimmen, dass in gesunden Normaltieren keine Immunreaktion stattfindet und deshalb auch keine erhöhte IL-10-Aktivität detektierbar ist.

Die Reduktion der B-Lymphozyten in der Allo-Gruppe ist vornehmlich auf die Reduktion der Naiven Mature B-Zellen zurückzuführen, die im Vergleich zur Gesamtlmphozytenpopulation am stärksten reduziert wurden. Dieses Ergebnis korreliert mit den Ergebnissen von Van der Berg et al., 2012, die die Reduktion der B-Lymphozyten in Patienten untersucht haben. Der Anteil der T1 und T2 B-Zellen nimmt ebenfalls ab, wobei deren Prozentsatz an der gesamten Population so gering ist, dass deren Abnahme nicht maßgebend ist. Die Population der Switched B-Zellen in der Allo-Gruppe erhöht sich nach der Transplantation. Grund hierfür sind vermutlich die Memory B-Zellen, die sich vermehrt zu Switched B-Zellen entwickeln und Indikator für eine beginnende Abstoßung des Transplantats sein könnten (Crespo et al., 2015). Eine steigende Population der Memory B-Zellen bei Ratten, nach einer Transplantatabstoßung, ist auch von Thauinat et al., 2005 nachgewiesen worden (Thauinat et al., 2005). Diese Entwicklung könnte also auch zu einem steigenden IgM-Switch führen und der Anteil der Switched B-Zellen würde an Bedeutung gewinnen. In Woche 2 hat sich dieser Effekt bereits verringert und die Subpopulation nimmt ein wenig ab. Allerdings ist die Standardabweichung in Woche 2 sehr hoch, sodass dies auch zu einem verfälschten Bild führen könnte. Bis zum Ende der Versuchsreihe ist der Anteil der Switched B-Zellen im Vergleich zum Beginn deutlich höher. Eine wachsende Memory und Switched B-Zell-Population im Vergleich zum Prä-Transplantationswert ist auch human nachgewiesen worden (Kamburova et al., 2014). Dies scheint ein Hinweis auf die Abstoßung des Transplantats zu sein, wie Studien an Ratten (Le Texier et al., 2011) und Menschen (Thauinat et al., 2008) zeigen.

Die Depletion der B-Lymphozyten in allen vier Subpopulationen war erfolgreich, allerdings ist ihr Grad der Depletion abhängig von der IgM-Expression (vgl. Tabelle 4). Die Definition der einzelnen B-Zell-Subpopulationen beruht auf der Publikation von Le Berre (Le Berre et al., 2014). Demnach sind Switched B-Zellen IgM-negativ. Dies konnte auch in den Ergebnissen bestätigt werden, da dort die geringste Depletion erreicht wurde. Gefolgt von T1 B-Zellen, die IgM durchschnittlich exprimieren. Da sich der Depletionserfolg zwischen Naiven Mature B-Zellen und T2 B-Zellen nur marginal unterscheidet (99,6 % der

Naiven Mature B-Zellen und 99,7 % der T2 B-Zellen), bleibt zu klären, ob dies der geringen Anzahl der Versuchstiere und der teilweise beachtlichen Standardabweichung geschuldet ist oder ob die Definition der IgM-Expression, die den Subtypen zugeordnet wurde, möglicherweise modifiziert werden sollte. Vergleicht man die Zellverteilung der FACS-Analyse (vgl. Abbildung 10), so wird offensichtlich, dass die Zellen, die als charakteristisch für Naive Mature B-Zellen determiniert wurden, räumlich dicht an der definierten Population der T2 B-Zellen liegt. Deshalb bleibt zu klären, ob die Definition für Naive Mature B-Zellen gegebenenfalls eher einer IgM^{high}-Expression entspricht oder die Expression der T2 B-Zellen eventuell als IgM^{medium} deklariert werden sollte. Dass der Depletionserfolg des Anti-CD20-Behandlung von dem Anteil der IgM-Expression auf den B-Lymphozyten abhängig ist, wurde schon im humanen Kontext vermutet (Kamburova et al., 2013). Dieser Zusammenhang ist bisher jedoch nicht in Ratten dokumentiert worden. Die aktuellen Ergebnisse lassen zumindest auf ein ähnliches Verhalten bezüglich des Depletionserfolgs in Abhängigkeit zum IgM-Anteil im Menschen, wie auch in der Ratte, schließen. Die Beschreibung der B-Zell-Depletion in Abhängigkeit von der IgM-Expression der Subpopulationen ist in dieser Arbeit erstmalig an Ratten beschrieben worden.

Ein Vergleich der Ergebnisse in Woche 4 der verschiedenen Zellpopulationen im peripheren Blut und in den Organen zeigt, dass sich die Populationen im peripheren Blut geringer sind als die Populationen in den Organen. Daraus könnte geschlossen werden, dass die Depletion in den Organen weniger erfolgreich verlief, als im peripheren Blut, jedoch muss dabei berücksichtigt werden, dass eine Untersuchung der Organe ausschließlich am Ende des Versuches in Woche 4 erfolgte und demnach Daten nur zu diesem Zeitpunkt vorhanden waren. Während die Entwicklung der Populationen im peripheren Blut wöchentlich im gesamten Zeitraum des Versuches stattfanden.

In der Milz ist nach vier Wochen ein maximaler Depletionseffekt von 30 % erreicht worden, während die erfolgreichste Depletion in Lymphknoten bei 50 % lag (in Naiven Mature und Switched B-Zellen). In einigen Subtypen zeigte der

Antikörper bereits in Woche 4 keine Wirkung mehr oder hat diese Population nicht depletiert. Die Untersuchung der Organe erfolgte erst am Ende des Versuches in Woche 4. Der Höhepunkt der Depletion war in Woche 2 zu erwarten, sodass Daten zu diesem Zeitpunkt aus den Organen fehlen. Dennoch zeigt ein Vergleich mit der Depletion der Lymphozyten im peripheren Blut auch in Woche 4 einen höheren Effekt als in den Organen. Daraus könnte geschlossen werden, dass der Effekt des Antikörpers in Woche 2 ebenfalls geringer war. Eine Anti-CD20-Depletion führte in Patienten zu verschiedenen Ergebnissen. Nach einer Nierentransplantation detektierten Kamburova et al. keine Veränderung der B-Lymphozytenpopulation in den Lymphknoten (Kamburova et al., 2013), während andere zumindest eine Reduktion der Lymphozyten in sekundären lymphatischen Organen registrieren konnten (Thaunat et al., 2008). Genberg und Kollegen wiesen dagegen ebenfalls eine Reduktion in Lymphknoten von ungefähr 50 % nach (Genberg et al., 2006). Eine Erklärung für die Abweichungen in der B-Zell-Depletion könnten auch verschiedene Konzentrationen der eingesetzten Antikörper, sowie der Einfluss anderer Medikamente sein.

Ein Vergleich der Entwicklung der B-Subpopulationen, anteilig an den B-Lymphozyten, zeigt evidente Unterschiede zwischen der Verteilung in der Gruppe der Allo-Tiere und der B-Zell-depletierten Tiere. In Woche 2, zum Zeitpunkt des maximalen Depletionseffekts, zeigen die Tiere der Allo Anti-CD20-Gruppe eine deutliche Veränderung in ihrer Zusammensetzung. Dies liegt zum einen an der Wirkungsweise des Anti-CD20-Antikörpers, der vorwiegend IgM⁺ Populationen depletiert. Zum anderen beeinflussen auch die Memory B-Zellen die Zusammensetzung. Da Memory B-Zellen CD20 negativ sind (Zarkhin & Sarwel, 2012), werden sie nicht depletiert. Dadurch können sie sich zu Switched B-Zellen entwickeln. Sie sind aber ebenfalls CD45RA⁺, sodass sie ebenfalls in der definierten B-Lymphozytenpopulation wieder zu finden sind. Eine mögliche These wäre, dass Switched B-Zellen während der Depletion eine Interim-Funktion übernehmen und die fehlenden Subtypen funktionell ersetzen. Dies könnte eine Erklärung dafür sein, weshalb der Anteil der Switched B-Zellen in Woche 2 extrem gestiegen ist. Die Expansion der T1 B-Zellen könnte

zum Teil ebenfalls auf die geringere Wirkung des Antikörpers aufgrund der geringen IgM-Expression zurückzuführen sein. Des Weiteren ist es naheliegend, dass nach einer Depletion der B-Lymphozytenpopulation wieder vermehrt B-Lymphozyten gebildet werden. Dies hätte zur Folge, dass zu Anfang vorwiegend T1 B-Zellen existieren würden, da diese den Anfang in der Entwicklung der untersuchten Subtypen bilden und die ersten Zellen sind, die das Knochenmark verlassen (Le Bien & Tedder, 2008). Im Anschluss differenzieren sie sich zu T2 B-Zellen. Transitional B-Zellen sind sehr kurzlebig und differenzieren sich schnell (Crespo et al., 2015). Dies würde erklären, weshalb die T2 B-Zellen-Population bereits in Woche 3 den anfänglichen Wert wieder erreicht haben. In Woche 3 adaptieren sich die Subtypen langsam an die ursprünglichen Verteilungen. Wie zuvor erwähnt, erreichten die T2 B-Zellen äquivalente Werte zu den Prä-Depletionsanteilen. Die Naiven Mature B-Zellen liegen zwar deutlich unter den Initialwerten, sind im Vergleich zu Woche 2 aber deutlich gestiegen. Dies ist vermutlich darauf zurückzuführen, dass die große Anzahl an T1 B-Zellen, welche sich in Woche 2 neu entwickelt haben, sich unverzüglich zu T2 und anschließend zu Naiven Mature B-Zellen differenziert haben, sodass sie innerhalb einer Woche anteilig deutlich gestiegen sind. Der vergleichsweise immer noch große Anteil der T1 B-Zellen signalisiert die erhöhte B-Zell-Produktion, die auch in Woche 4 noch erhalten bleibt. Die Population der Switched B-Zellen stabilisiert sich ebenfalls in Woche 3 wieder. Demnach scheint ihr Anteil mit steigender Anzahl der Naiven Mature B-Zellen wieder zu sinken und sie vermutlich in diesem Maße nicht mehr benötigt werden. Ähnlich verhält sich die Verteilung nach einer einmaligen Anti-CD20-Behandlung im Menschen. Kamburova und Kollegen zeigten, dass Patienten nach einer Nierentransplantation eine steigende Transitional und Switched B-Zell-Population aufwiesen. Außerdem wurde auch ein Anstieg der Memory B-Zellen gezeigt (Kamburova et al., 2014).

Da die Ergebnisse bereits in Woche 3 langsam an die Prä-Depletionsverteilung adaptieren, ist davon auszugehen, dass die Entwicklung der B-Zellen bei einem längerem Versuchszeitraum die ursprüngliche Verteilung erreicht hätte. Patienten zeigen nach einer B-Zell-Depletion gegen das Epitop CD20 ebenfalls

veränderte Zusammensetzungen in den B-Zell-Populationen. Sie erreichen nach einem Jahr post Transplantation die anfängliche Populationsverteilung bei einer Therapie mit Rituximab (Zarkhin & Sarwel, 2012). Diese Ergebnisse zeigen bereits in Woche 4 Verteilungen, die sich der Verteilung in Woche 0 wieder stark angeglichen haben. Demnach ist zu erwarten, dass die ursprüngliche Verteilung zeitlich eher erreicht wird als beim Menschen. Dies ist vermutlich darauf zurückzuführen, dass der verwendete Anti-CD-20-Antikörper aus der Maus stammt und vom Immunsystem der Ratte als fremd erkannt wird. Dadurch kommt es zu einer stärkeren Immunreaktion als bei der Verwendung von Rituximab, das zur Anti-CD20-Depletion im Menschen eingesetzt wird. Es handelt sich hierbei um einen chimären Antikörper dessen Fc-Teil human ist. Dadurch wird die Immunreaktion im Patienten geringer ausfallen und die Wirkung der Anti-CD20-Depletion hält länger an, als der hier verwendete Anti-CD20-Antikörper in den Rattenexperimenten. Es dauert länger bis die anfängliche Verteilung der B-Zell-Subtypen wieder hergestellt ist. Insgesamt bestätigen die Ergebnisse die anfängliche Hypothese, der zufolge die Behandlung mit dem Anti-CD20-Antikörper zu einer veränderten B-Zell-Zusammensetzung führt.

Eine Depletion von regulatorischen B-Zellen (Bregs), die IL-10 sekretieren, kann im Kontext der Transplantationsimmunologie schwerwiegende Folgen für einen Patienten haben. Bregs agieren einerseits auf dem Antigen-spezifischen Level und regulieren die T-Zell-Immunantwort (Candando et al., 2014; Chesneau et al., 2013), andererseits fehlt der Einfluss auf die Initiierung der regulatorischen FoxP3⁺ T-Zell-Differenzierung zur Induktion der Transplantattoleranz (Berthelot et al., 2013; Clatworthy, 2014). Eine Depletion der IL-10⁺ regulatorischen B-Zellen durch die Behandlung mit dem Anti-CD20-Antikörper zeigen auch diese Ergebnisse (vgl. Abbildung 24, Abbildung 26). Wie die Analyse der B-Zell-Subtypen bereits ergab, ist der Erfolg der Depletion abhängig vom Anteil der IgM-Expression. Eine hohe Expression von IgM zeigen auch regulatorische B-Zellen in der Maus (Mauri & Bosma, 2012) und im Menschen (Khoder et al., 2014), wodurch diese ebenfalls besonders stark von einer Behandlung mit dem Antikörper Anti-CD20 betroffen wären. Die Existenz

der ursprünglich vermuteten klassischen IL-10⁺ regulatorischen B-Zell-Population ist aber fraglich. Im Menschen sind die so genannten B10-Zellen über die Marker CD5, CD1d, CD38, CD24, IgM und IL-10 charakterisiert (Clatworthy, 2014). Die Ergebnisse der Literaturrecherche lassen allerdings Zweifel aufkommen, da zunehmend verschiedene B-Zell-Populationen nachgewiesen werden, die abhängig von ihrer immunologischen Funktion in unterschiedlichen Situationen IL-10 sekretieren (Ray et al., 2015; Zarkhin & Sarwel, 2012; Sicard et al., 2015). Demnach ist zu vermuten, dass die Sekretion von IL-10 auf komplexen Interaktionen von B- und T-Lymphozyten basiert und keine definierte Subpopulation für die Sekretion zuständig ist. Dies erklärt auch, weshalb es nicht zur vollständigen Depletion von IL-10⁺ B-Zellen kam und die maximale IL-10-Sekretion der B-Zell-depletierten Tiere in Woche 2 und 3 erfolgte (vgl. Abbildung 26). Es könnte sich dabei um eine Population handeln, die IgM⁻ oder nur gering positiv für IgM ist. Khoder und Kollegen haben IL-10 sekretierende Memory B-Zellen im Menschen nachweisen können. Sollten diese auch in Ratten IL-10 sekretieren, würde es sich um eine CD20-negative Population handeln, die von der Depletion ebenfalls nicht betroffen wäre (Khoder et al., 2014). Die Population, die nicht von der B-Zell-Depletion dezimiert wird, scheint dadurch vermehrt IL-10 zu produzieren, als vergleichsweise in der Allo-Gruppe. Die Definition von der zu Anfang vermuteten Bregs-Population stellt sich auch als schwierig heraus. Deshalb sollte, anstatt von regulatorischen, eher von IL-10⁺ oder IL-10⁻ Populationen die Rede sein, da vermutlich verschiedene IL-10⁺ Populationen regulatorische Fähigkeiten besitzen und diese vermutlich bei verschiedenen Impulsen Wirkung zeigen könnten.

Die genaue Funktion von IL-10 in der Transplantatimmunologie ist noch nicht lückenlos entschlüsselt. Eine Verbindung zwischen der Initiierung der FoxP3⁺ positiven regulatorischen T-Zellen und IL-10⁺ B-Zellen ist aber wahrscheinlich (Reichardt et al., 2007; Singh, 2001; Cobbold et al., 2006; Shimabukuro-Vornhagen et al., 2009; Berthelot et al., 2013). Ein Blick auf die Ergebnisse der FoxP3⁺ Tregs-Analyse lässt auch hier einen Zusammenhang vermuten (vgl. Abbildung 30). IL-10⁺ B-Zellen induzieren die Differenzierung von FoxP3⁺

regulatorischen T-Zellen sowie deren Aktivierung, die dadurch die betroffenen Gewebe infiltrieren (Mauri & Bosma, 2012) und zur Toleranzinduktion beitragen (Berthelot et al., 2013). Bisher gibt es hierzu keine Publikationen, die dies an Ratten untersucht haben. Diese Daten lassen aber vermuten, dass das Zusammenspiel zwischen IL-10⁺ B-Zellen und FoxP3⁺ T-Zellen ähnlich funktioniert. Die IL-10-Sekretion steigt nach der Transplantation sowohl in der Allo- als auch in der Allo Anti-CD20-Gruppe. Um etwa eine Woche versetzt, fängt auch die jeweilige Tregs-Population an zu steigen. In der Allo-Gruppe nimmt die IL-10-Sekretion bis zum Ende des Versuchs in Woche 4 zu. Dies zeigt sich auch in der Tregs-Analyse. Den Höhepunkt der IL-10-Sekretion der B-Zellen in der Gruppe „Allo Anti-CD20“ ist in Woche 2 und 3 erreicht und sinkt danach wieder. Der Einfluss der B-Zell-Depletion wirkt sich auf die Tregs-Population in Woche 4 aus. Die wenigen nicht depletierten regulatorische B-Zellen produzieren zwar vermehrt IL-10, aber dies reicht nicht aus, um weiterhin so viele Tregs zu aktivieren. Deshalb wirkt sich die Depletion auf die Treg-Population erst in Woche 4 aus. Da die Aktivierung der Tregs zeitlich leicht versetzt beginnt, scheinen sich auch die Folgen der Depletion verspätet bemerkbar zu machen. Ein Unterschied zwischen der Allo- und Allo Anti-CD20-Gruppe zeigt sich erst in Woche 4. Nach der Aktivierung der Tregs nimmt die Aktivität der IL-10⁺ B-Zellen ab (Berthelot et al., 2013), sodass es in Woche 4 zu einer Regression beider Populationen der B-Zell-depletierten Tiere kommt. Die Tiere der Allo-Gruppe erfahren eine Abstoßung des Transplantats (vgl. Kapitel 3.7), da die Tiere in dieser Gruppe keine Behandlung mit dem Anti-CD20-Antikörper erhalten. Dadurch kommt es zu keiner Depletion der regulatorischen B-Zellen und einer zu Versuchsende noch ansteigenden IL-10-Sekretion, da das Transplantat auch nach vier Wochen zu einer verstärkten Alloreaktivität führt. Dies deckt sich auch mit der Analyse der FoxP3⁺ regulatorischen T-Zell-Population, die auch in Woche 4 noch durch IL-10⁺ B-Zellen aktiviert wird und Toleranzinduzierend wirkt. Die Auswertung der Daten bestätigt die Hypothese, dass sich IL-10⁺ B-Zellen und FoxP3⁺ regulatorische T-Zellen auch in Ratten ähnlich verhalten und die Populationen in der Allo-Gruppe stärker zunehmen als in der Gruppe, die eine Anti-CD20-Behandlung erfahren haben. Hier führte der Anti-CD20-Antikörper auch zur Depletion von IL-10⁺ B-Zellen. Dies hat auch

eine fehlende Interaktion mit den Tregs zur Folge, wodurch sich diese Population ebenfalls verringert. Dadurch könnte das Transplantatüberleben negativ beeinflusst werden.

Die Untersuchung von IL-10⁺ Lymphozyten mittels einer FACS-Analyse erfolgte im Rahmen dieser Arbeit zum ersten Mal in einem Rattentransplantationsmodell. Ähnliche Untersuchungen gibt es bisher nur im Menschen (Kamburova et al., 2014)(Ray et al., 2015) und in der Maus (Mauri & Bosma, 2012).

Die Untersuchung der IL-10⁺ sekretierenden T-Zellen ergab einen ähnlichen Verlauf der MFI im Vergleich zu der IL-10⁺ B-Zell-Population. Die MFI der T-Zellen ist ein wenig höher. Die ursprüngliche Vermutung, dass es sich bei den CD45RA negativen Zellen, die IL-10 produzieren, zwangsläufig um T-Zellen handeln muss, ist zweifelhaft. Neben T-Zellen könnten sich vermutlich auch NK-Zellen in der Gruppe der IL-10 sekretierenden Zellen befinden (Sabat et al., 2010; Saraiva & O'Garra, 2010; Wood et al., 2012). NK-Zellen ergeben einen Anteil der gesamten Lymphozytenpopulation von 2 % bis maximal 12%. Ein noch geringerer Anteil dieser NK-Subpopulationen sekretiert IL-10, sodass es sich vermutlich um einen sehr geringen Anteil von Zellen handelt, die in dieser Auswertung fälschlicherweise als IL-10⁺ regulatorische T-Zelle definiert wurden. Weitaus weniger kalkulierbar ist der Einfluss der T-Zellen, die kein IL-10 sekretieren, aber über den IL-10-Rezeptor (Sabat et al., 2010) IL-10 gebunden haben und deshalb eine erhöhte MFI zeigen. Dies könnte ein Grund dafür sein, weshalb die Kurven nahezu identisch verlaufen, nur die der vermeintlichen T-Zellen eine höhere MFI zeigen als die der B-Zellen.

Die T-Zellen, die IL-10 sekretieren, haben im Rahmen der Transplantationsimmunologie, wie auch die IL-10⁺ B-Zellen, eine immunsuppressive Wirkung und hemmen die Aktivität von Antigen-präsentierenden Zellen (APC: *Antigen Presenting Cells*) (Wood et al., 2012). FoxP3⁺ regulatorische T-Zellen sekretieren nach aller Wahrscheinlichkeit kein IL-10. Dies belegten bereits mehrere Arbeitsgruppen in verschiedenen pathologischen Zusammenhängen (Vieira et al., 2004; Rubtsov et al., 2008;

Chaudry et al., 2011). Demnach handelt es sich also bei den FoxP3⁺ regulatorischen T-Zellen und IL-10⁺ T-Zellen nicht um dieselbe Population. Beide Populationen der T-Zellen exprimieren hohe Anteile des Aktivierungsmarkers CD25. Inwiefern beide Populationen miteinander interagieren, ist noch nicht vollständig geklärt (Vieira et al., 2004; Sabat et al., 2010). IL-10⁺ T-Zellen spielen wahrscheinlich eine Rolle in der Aktivierung der angeborenen Immunantwort und können die T-Zell-Proliferation hemmen (Wood et al., 2012; Vieira et al., 2004). Demnach würden sie auch toleranzinduzierend wirken. Da sich der Verlauf der MFI zwischen der Gruppe „Allo“ und „Allo Anti-CD20“ unterscheidet, ist es naheliegend, dass auch eine Interaktion zwischen IL-10 sekretierenden T-Zellen und IL-10⁺ B-Zellen besteht. Diese sind von der Antikörper-Behandlung betroffen, wodurch sich der Unterschied zwischen beiden Versuchsgruppen erklären würde. Inwiefern diese Zellgruppen miteinander interagieren, ist allerdings unklar. Die Interpretation der aktuellen Datenlage ist komplex und deshalb kritisch zu betrachten.

Es konnten keine regulatorischen B-Zellen, die FoxP3 exprimieren, detektiert werden (vgl. Abbildung 27). Bisher sind FoxP3⁺ regulatorische B-Zellen nur von zwei Arbeitsgruppen im Zusammenhang mit Allergien und der Autoimmunkrankheit IPEX-Syndrom im Menschen nachgewiesen worden (Lee & Noh, 2011; Noh et al., 2010; Zennaro & Pomponi, 2012). Brisslert und Kollegen gelang es dagegen ebenfalls nicht FoxP3⁺ B-Zellen im Menschen nachzuweisen (Brisslert et al., 2006). Demnach ist davon auszugehen, dass auch in Ratten FoxP3⁺ B-Zellen im Kontext der Transplantationsimmunologie keine Rolle spielen.

Eine Betrachtung der gesamten T-Zellpopulation zeigt deutlich, dass die absolute Zahl aller T-Lymphozyten in Woche 1 in beiden Versuchsgruppen unmittelbar nach der Transplantation steigt. Ab Woche 2 erreichen die Werte wieder das Ausgangsniveau. Der Anteil der T-Helfer-Zellen verändert sich im Verlauf des Versuchs nur marginal in Woche 1 und schwankt im restlichen Versuchsverlauf um etwa 4 Mrd Zellen/L. In den Organen ist der relative Anteil der T-Helfer-Zellen der B-Zell-depletierten Tiere ein wenig höher. Dies ist auf

die fehlenden B-Lymphozyten zurückzuführen. Es ist allerdings davon auszugehen, dass sich die Werte beider Gruppen nicht signifikant voneinander abheben. Der Unterschied in den absoluten Zahlen der gesamten T-Lymphozytenpopulation ist demnach neben T_H-Zellen auch auf den Anstieg der cytotoxischen T-Zellen, NK-Zellen und der NKT-Zellen zurückzuführen. Diese Populationen zeigen alle in Woche 1 ein signifikantes Wachstum im Vergleich zu Woche 0. Beide Gruppen unterscheiden sich allerdings nicht und sind durch die B-Zell-Depletion nicht beeinflusst. Dies konnte im ähnlichen Kontext auch im Menschen nachgewiesen werden. Dort zeigte eine Behandlung mit einem Anti-CD20-Antikörper nach einer Nierentransplantation ebenfalls keine Veränderung der T-Lymphozytenzahlen (Kamburova et al., 2014). Nach Woche 1 sinken die absoluten Zellzahlen wieder und erreichen ihr Normalniveau von vor der Transplantation. Es ist bekannt, dass cytotoxische T-Zellen zu den ersten Zellen gehören, die zu Beginn von Immunreaktionen aktiviert werden und die entsprechenden Gewebe früh infiltrieren (Willcox et al., 2009; Wong et al., 2011), sodass cytotoxische T-Zellen vermutlich auch in der transplantierten Niere einen erhöhten Anteil zu Beginn der Versuchsreihe ausmachen. Die Ergebnisse zeigen, dass cytotoxische T-Zellen auch im peripheren Blut unmittelbar nach der Transplantation steigen und neben NK- und NKT-Zellen aktiviert werden. Cytotoxische T-Zellen werden unter anderem von IL-10⁺ B-Zellen gehemmt, was eine Erklärung für die Abnahme der Population der CD8⁺ T-Lymphozyten ab Woche 2 sein könnte.

Natural Killer-Zellen sind ebenfalls in Woche 1 deutlich erhöht. Dies ist darauf zurückzuführen, dass NK-Zellen bei Immunreaktionen schnell aktiviert werden und bereits innerhalb von 12 h das betroffene Gewebe infiltrieren (Hsieh et al., 2002). Welche Funktion NK-Zellen in der Transplantationsimmunologie genau einnehmen, ist nicht endgültig geklärt. So sekretieren sie einerseits Cytokine, die das Transplantat infiltrieren und zur Abstoßung beitragen (Vivier et al., 2011). Andererseits sind ihnen auch regulatorische Funktionen nachgewiesen worden. Die Sekretion von immunregulierenden Cytokinen kann zur Zerstörung der APC führen (Yu et al., 2006). Regulatorische Funktionen werden auch den NKT-Zellen zugeschrieben. Diese Population kann ebenfalls zur Rejektion, wie

auch zur Toleranz von Transplantaten beitragen (Jukes et al., 2007). Demnach tragen sie durch die Produktion von pro-entzündlichen Cytokinen zur Abstoßung bei (Wood et al., 2012), während sie auch die Proliferation von FoxP3⁺ regulatorischen T-Zellen unterstützen können (Pillai et al., 2009). Wie bereits bei den cytotoxischen T-Zellen erwähnt, sinken auch die Subpopulationen der NK- und NKT-Zellen nach der ersten Woche wieder und sind im Vergleich zu ihrem Ausgangsniveau nur noch leicht erhöht. Ein Unterschied der beiden Versuchsgruppen ist nicht zu erkennen, sodass eine Anti-CD20-Behandlung keinen Einfluss auf die Entwicklung dieser Zelltypen im peripheren Blut oder den Organen hat.

Vier Wochen post Transplantation zeigen alle NTX-Nieren der Tiere, unabhängig von der Versuchsgruppe, Vergrößerungen, die auf eine Abstoßung des Organs hindeuten. Dies bestätigte sich auch in den Übersichtsfärbungen und den Färbungen der Zellinfiltrate. Da vorwiegend Makrophagen nachgewiesen wurden, ist die Abstoßungsreaktion bereits weit fortgeschritten und das Gewebe der transplantierten Niere entsprechend geschädigt. Da sowohl in der Allo- als auch in der Allo-Anti-CD20-Gruppe die NTX-Nieren starke Gewebeschäden aufweisen, ist in beiden Gruppen kein Unterschied im Zustand der Transplantate feststellbar gewesen. Folglich ist histologisch kein Unterschied in den beiden Versuchsgruppen zu sehen.

Da in den Zellinfiltraten im Transplantat vorwiegend Makrophagen anhand des Markers ED1 nachgewiesen werden konnten, ist davon auszugehen, dass sich das Transplantat bereits in der Spätphase der Abstoßung befindet. Zu Beginn einer akuten Abstoßung wird das Transplantat vorwiegend von T-Lymphozyten infiltriert (MacPherson & Christmans, 2001). Erst später steigt der Anteil der Makrophagen. In der Spätphase nimmt der Anteil der T-Zellen wieder ab und es sind vorwiegend Makrophagen und Monozyten nachweisebar (Grau et al., 1998). Um einen Unterschied der beiden Versuchsgruppen ermitteln zu können, hätte die immunhistologische Untersuchung vermutlich schon in Woche 2 oder 3 post Transplantation stattfinden müssen. Zu diesem Zeitpunkt erreichten die IL-10⁺ B-Lymphozyten ihre maximale MFI und bewirkten die Aktivierung von

toleranzinduzierenden FoxP3⁺ Tregs. Diese wären zu dem Zeitpunkt vermehrt im Gewebe erwartet worden. Da sich die Population der Tregs in Woche 2 und 3 in beiden Versuchsgruppen nicht deutlich unterscheidet, scheint es auch keinen Einfluss auf verschieden stark ausgeprägter Toleranz im Transplantat zu geben. Sicard und Kollegen stellten bereits fest, dass Tregs zwar Toleranz induzieren können, aber dies nicht langfristig stattfindet, sondern es sich dabei um einen kurzzeitigen Effekt handelt (Sicard et al., 2015). Da in Woche 4 kein Unterschied im Zustand des Gewebes nachgewiesen wurde, scheinen auch in diesem experimentellen Kontext die Tregs vier Wochen nach der Transplantation keinen signifikanten Einfluss auf das Transplantatüberleben zu haben.

Die Meinungen, inwiefern verschiedene B-Zell-Subtypen Einfluss auf das Überleben des Transplantats haben, divergieren bisher stark (Crespo et al., 2015; Nouel et al., 2014). Interessanterweise konnte im Rattenmodell nachgewiesen werden, dass steigende Level von Switched B-Zellen im Transplantat die Wahrscheinlichkeit einer Abstoßung erhöhen (Le Texier et al., 2011). Im humanen Kontext ist ebenfalls ein höherer Anteil an Switched B-Zellen in abgestoßenen Transplantaten nachgewiesen worden (Thaunat et al., 2005; Thaunat et al., 2008). Ein Vergleich mit den hier ermittelten Daten zeigt, sowohl im peripheren Blut als auch in den Organen Milz und Lymphknoten, eine zunehmende Switched B-Zell-Populationen. Erst in Woche 4, als das Transplantat bereits zum größten Teil abgestorben war, sinkt die Population wieder. Sodass die These in diesem Zusammenhang ebenfalls Anwendung findet. Demnach wäre der Einfluss der B-Zell-Depletion allerdings kontraproduktiv, da vornehmlich B-Lymphozyten depletiert werden, die IgM⁺ sind. Folglich würden Switched B-Zellen weniger erfolgreich depletiert. Clatworthy und Kollegen heben einen weiteren interessanten Punkt hervor. Demzufolge ist das Timing der B-Zell-Depletion entscheidend, um zu beeinflussen, welche B-Lymphozytensubpopulationen vorwiegend depletiert werden. Abhängig vom Zeitpunkt werden entweder regulatorische oder andere B-Lymphozyten primär depletiert (Clatworthy, 2014). Die immunhistologische Analyse ergab keine Unterschiede in den verschiedenen Versuchsgruppen, da

der entscheidende Zeitpunkt vermutlich verpasst wurde. Die aktuelle Literaturrecherche lässt jedoch vermuten, dass durch die Anti-CD20-Behandlung für das Transplantatüberleben wichtige IL-10⁺ B-Lymphozyten depletiert werden, während vor allem Switched B-Zellen, die einen negativen Einfluss auf die Akzeptanz des Transplantats zu scheinen haben, von der Depletion nicht betroffen sind.

Da die einzelnen Gruppen nur aus einer geringen Anzahl an Tieren bestanden, war eine statistische Auswertung nur zum Teil sinnvoll. Die Aussagekraft aller Ergebnisse ist somit differenziert zu betrachten und müsste durch weitere Versuche validiert werden. Die Etablierung erfolgte ebenfalls nur an zwei Tieren. Dies schmälert vor allem die Aussagekraft zur Charakterisierung der Transitional B-Zellen, da beide Tiere vor der B-Zell-Depletion erhebliche Abweichungen voneinander zeigen, sodass unklar ist, ob es grundsätzlich starke Schwankungen in diesen Populationen gibt oder ob eines der beiden Tiere untypische Verteilungen aufweist. In den folgenden Zeitpunkten sind die Standardabweichungen deutlich geringer, was auf eine höhere Zuverlässigkeit der Datenlage hindeutet, eine Validierung aber trotzdem nötig macht. Trotz der standardisierten Bedingungen und die damit einhergehenden Vorteile gegenüber Untersuchungen am Patienten, muss berücksichtigt werden, dass es sich hier um Versuche am Lebewesen handelt, sodass Schwankungen im gewissen Rahmen normal sind. Ein Grund für extreme Abweichungen in einzelne Datenpunkte könnte auch darauf hindeuten, dass ein Tier eventuell unter weiteren Erkrankungen, wie beispielsweise einer Infektion, leidet.

Welche B-Zell-Populationen zu den IL-10-sekretierenden Zellen gehören, konnte im Rahmen dieser Arbeit noch nicht eindeutig geklärt werden. Es wäre also interessant IL-10-Färbungen in Kombination mit entsprechenden Markern durchzuführen, um diese Populationen identifizieren zu können. Dadurch könnte auch festgestellt werden, welche dieser Populationen primär Einfluss in der Transplantationsimmunologie hat und ob diese Population toleranzinduzierend wirkt. So wäre es auch möglich die Funktion und ihre regulatorische Fähigkeiten in unterschiedlichen Kontexten zu erforschen.

Da diese Ergebnisse zur Analyse der potenziellen IL-10⁺ regulatorischen T-Lymphozyten noch viele Ungereimtheiten aufweisen, müssten diese modifiziert werden. Weitere Färbungen mit spezifischen Markern wären nötig, um die Zellpopulationen sicher voneinander differenzieren zu können. Darüber hinaus muss sichergestellt sein, dass kein IL-10 freigesetzt wird und die Färbung ausschließlich intrazellulär stattfindet.

Zur Begutachtung der relevanten Zellinfiltrate müsste die Untersuchung eines Transplantats deutlich früher erfolgen, da die Abstoßung nach vier Wochen schon weit fortgeschritten und das Gewebe größtenteils abgestorben ist. Dadurch konnten vorwiegend nur noch Makrophagen detektiert werden. Es wäre interessant die relevanten regulatorischen Populationen sowie vor allem auch Switched B-Zellen aus dem peripheren Blut immunhistologisch nachzuweisen und ihren Einfluss im Transplantat sowie den Einfluss der B-Zell-Depletion untersuchen zu können. Dazu bedarf es einer Etablierung entsprechender Marker.

Ein Vergleich der Ergebnisse mit der Literatur zeigt, dass sich die verschiedenen Zellpopulationen nach einer Rituximab-Behandlung in Folge einer Transplantation im Menschen ähnlich verhalten, wie die Populationen im Rattentransplantationsmodell nach der Anti-CD20-Behandlung. Dies impliziert, dass das Modell in diesem Kontext geeignet ist, um Vorhersagen zu relevanten Fragestellungen in der Transplantationsimmunologie zu erforschen und Rückschlüsse auf das Verhalten im menschlichen Körper zu erhalten.

Insgesamt konnten mit dieser Arbeit interessante Ergebnisse zur Charakterisierung von B-Lymphozyten erreicht werden, die als Basis zur Weiterentwicklung von spezifischeren Immunsuppressiva genutzt werden könnten. Da Rituximab vorwiegend IgM⁺ B-Zellen depletiert, werden vermutlich auch im Menschen die nützlichen toleranzinduzierenden B-Zellen depletiert. Switched B-Zellen hingegen, werden aufgrund der fehlenden IgM-Expression im geringeren Maße depletiert. Diese Zellen scheinen in Patienten, wie auch in

den Ratten, einen erhöhten Anteil zu repräsentieren, wenn das Transplantat abgestoßen wird. Dies könnte darauf hindeuten, dass eine B-Zell-Depletion gegen das Epitop CD20 in der Transplantationsmedizin eine ungünstige Wirkung hat. Für die Zukunft wäre demnach eine Entwicklung neuer Antikörper, die B-Lymphozyten spezifischer depletieren, eine Möglichkeit das Überleben von Transplantaten zu verlängern. Würden nur bestimmte B-Subpopulationen depletiert werden, so könnte es auch dazu führen, dass die Funktionsfähigkeit des Immunsystems erhöht würde, sodass die Patienten über ein weniger labiles Immunsystem verfügen und Krankheitserregern gegenüber widerstandfähiger wären. Es bedarf allerdings noch weiterer Forschung, um die Einflüsse der B-Zell-Depletion in der Transplantationsmedizin genauer zu verstehen und diese als Grundlage zur Entwicklung neuer Immunsuppressiva verwenden zu können.

5. LITERATURVERZEICHNIS

Abbas, A., Murphy, K. & Sher, A., 1996. Functional Diversity of helper T lymphocytes. *Nature*, Vol. 383, pp. 787-793.

Aderem, A. & Ulevitch, R., 2000. Toll-like receptors in the induction of the innate immune response. *Nature*, Vol. 406, pp. 783-787.

Aderem, A. & Underhill, D., 1999. Mechanism of Phagocytosis in Macrophages. *Annual Review of Immunology*, Vol. 17, pp. 593-623.

Asokan, R. et al., 2013. Human complement receptor 2 (CR2/CD21) as a receptor for DNA: implications for its roles in the immune response and the pathogenesis of systemic lupus erythematosus (SLE). *Molecular Immunology*, Vol. 53, pp. 99-110.

Audia, S., Samson, M. & Guy, J., 2011. Immunological effect of Rituximab on the human spleen in immune thrombocytes. *Blood*, Vol. 118, pp. 4394-4400.

Baker, R. et al., 2001. Comparison of the direct and indirect pathways of allorecognition in chronic allograft failure. *Transplant Proceedings*, Vol. 33, pp. 449-456.

Banchereau, J. et al., 2000. Immunobiology of dendritic cells. *Annual review of Immunology*, Vol. 18, pp. 767-811.

Banchereau, J. et al., 1991. Long-term human B cell lines dependent on interleukin-4 and antibody to CD40. *Science*, Vol. 251, pp. 70-72.

Barnett, A., Hadjinastassiou, V. & Mamode, N., 2013. Rituximab in renal transplantation. *Transplant International*, Vol. 26, pp. 563-575.

Barr, T. et al., 2007. TLR-mediated stimulation of APC: Distinct cytokine responses of B cells and dendritic cells. *European Journal of Immunology*, Vol. 37, pp. 3040-3044.

Berthelot, J. et al., 2013. Regulatory B cells play a key role in immune system balance. *Joint Bone Spine*, Vol. 80, pp. 18-22.

Biron, C. et al., 1999. Natural Killer Cells in Antiviral Defense: Function and Regulation by Innate Cytokines. *Annual Reviews of Immunology*, pp. 189-200.

Blair, P. et al., 2009. Selective targeting of B cells with agonistic anti-CD40 is an efficacious strategy for the generation of induced regulatory T2-like B cells and for the suppression of lupus in MRL/lpr mice. *Journal of Immunology*, Vol. 182, pp. 3492-3502.

Bouaziz, J. et al., 2010. IL-10 produced by activated human B cells regulates CD4(+) T-cell activation in vitro. *European Journal of Immunology*, Vol. 40, pp. 2686-2691.

Boye, J., Elter, T. & Engert, A., 2003. An overview of the current clinical use of the anti-CD20 monoclonal antibody rituximab. *Annals of Oncology*, Vol.14, pp. 520-535.

Brisslert, M., Bokarewa, M. & Larsson, P., 2006. Phenotypic and functional characterization of human CD25+ B cells. *Immunology*, Vol. 117, pp. 548-557.

Candando, K., Lykken, J. & Tedder, T., 2014. B10 cell regulation of health and disease. *Immunological Reviews*, Vol. 259, pp. 259-272.

Careno, B. & Collins, M., 2002. The B7 family of ligands and its receptors: new pathways for costimulation and inhibition of immune responses. *Annual Review of Immunology*, Vol. 20, pp. 29-53.

Carter, N. et al., 2011. Mice lacking endogenous IL-10-producing regulatory B cells develop exacerbated disease and present with an increased frequency of Th1/Th17 but a decrease in regulatory T cells. *Journal of Immunology*, Vol. 186, pp. 5569-5579.

Carvalho, H., Pereira da Silva, J. & Souto-Carneiro, M., 2013. Potential roles for CD8+ T cells in rheumatoid arthritis. *Autoimmunity Reviews*, Vol. 12, pp. 401-409.

Chapman, J., 2013. What are the key challenges we face in kidney transplantation today. *Transplantation Research, Vol. 2*, pp. 67-74.

Chaudry, A. et al., 2011. Interleukin-10 Signaling in Regulatory T Cells is required for suppression of th17 cell-mediated Inflammation. *Immunity, Vol. 34*, pp. 566-578.

Chen, Z. & O'Shea, J., 2008. Th17 cells: a new fate for differentiating helper T cells. *Immunological Research, Vol. 41*, pp. 87-102.

Chesneau, M., Michel, L., Degauque, N. & Brouard, S., 2013. Regulatory B cells and tolerance in transplantation: from animal models to human. *Frontiers in Immunology, Vol. 4*, pp. 1-8.

Chinen, J. & Buckley, R., 2010. Transplantation immunology: solid organ and bone marrow. *Journal of Allergy and Clinical Immunology, Vol. 125*, pp. 324-335.

Chung, J., Silverman, M. & Monroe, J., 2003. Transitional B cells: step by step towards immune competence. *Trends in Immunology, vol. 24*, pp. 343-349.

Clatworthy, M., 2014. B-cell regulation and its application to transplantation. *Transplant International, Vol. 27*, pp. 117-128.

Cobbold, S. et al., 2006. Immune privilege induced by regulatory T cell in transplantation tolerance. *Immunological Reviews, Vol. 213*, pp. 239-255.

Colvin-Adams, M. & Agnihotri, A., 2011. Cardiac allograft vasculopathy: current knowledge and future direction. *Clinical Transplantation, Vol. 25*, pp. 175-184.

Cooper, M., Peterson, R. & Good, R., 1965. Delineation of the thymic and bursal lymphoid systems in the chicken. *Nature, Vol. 205*, pp. 143-146.

Cragg, M., Walshe, C. & Ivanov, A., 2005. The biology of CD20 and its potential as target for mAb therapy. *Current Directions in Autoimmunology, Vol. 8*, pp. 140-174.

Crespo, M., Heidt, S., Redondo, D. & Pascual, J., 2015. Monitoring B cell subsets and alloreactivity in kidney transplantation. *Transplantation Reviews*, Vol. 29 (2), pp. 45-62.

Curotto de Lafaille, M. & Lafaille, J., 2009. Natural and adaptive fox3+ regulatory T cells: more of the same or a division of labor?. *Immunity*, Vol. 30, pp. 626-635.

Dalwadi, H. et al., 2004. B cell developmental requirement for the Gai2 gene. *Journal of Immunology*, Vol. 170, pp. 1707-1715.

Daniel, V. et al., 2010. Association of high IFN- γ plasma levels with low B-cell counts in renal transplant recipients with stable long-term graft function. *Clinical Transplantation*, Vol. 24, pp. 281-289.

De la Rosa, M., Rutz, S., Dorninger, H. & Scheffold, A., 2010. Interleukin-2 is essential for CD4+ CD25high regulatory T cell function. *European Journal of Immunology*, Vol. 34, pp. 2480-2488.

Di Gaetano, N. et al., 2003. Complement activation determines the therapeutic activity of rituximab in vivo. *Journal of Immunology*, Vol. 171, pp. 1581-1587.

DiLillo, D., Matsushita, T. & Tedder, T., 2010. B10 cells and regulatory B cells balance immune responses during inflammation, autoimmunity, and cancer. *Annals of the New York Academy of Sciences*, Vol. 1183, pp. 38-57.

Ding, Q. et al., 2011. Regulatory B cells are identified by expression of TIM-1 and can be induced through TIM-1 ligation to promote tolerance in mice. *Journal of Clinical Investigations*, Vol. 121, pp. 3645-3656.

Dressel, R., Walter, L. & Günther, E., 2002. Genomic and functional aspects of the rat MHC, the RT1 complex. *Immunological Reviews*, Vol. 184, pp. 82-95.

EU, 2014. *Organ Donation and Transplantation - Recent Facts & Figures*. Brüssel: European Commission.

Evans, J. et al., 2007. Novel suppressive function of transitional 2 B cells in experimental arthritis. *Journal of Immunology*, Vol. 178, pp. 7868-7878.

Fillatreau, S., Gray, D. & Anderton, S., 2008. Not always the bad guys: B cells as regulators of autoimmune pathology. *Nature Reviews Immunology*, Vol. 8, pp. 391-397.

Fillatreau, S. et al., 2002. B cells regulate autoimmunity by provision of IL-10. *Nature Immunology*, Vol. 3, pp. 944-950.

Finkel, T. et al., 1989. The Thymus has two functionally distinct populations of immature alpha beta+ T cells: one population is deleted by ligation of alpha beta TCR. *Cell*, pp. 1047-1054.

Garin, M. et al., 2007. Galectin-1: a key effector of regulation mediated by CD4+CD25+ T cells. *Blood*, Vol. 109, pp. 2058-2065.

Genberg, H. et al., 2006. Pharmacodynamics of rituximab in kidney allotransplantation. *American Journal of Transplantation*, Vol.6, pp. 2418-2428.

Gershon, R. & Kondo, K., 1971. Infectious immunological tolerance. *Immunology*, Vol. 21, pp. 903-914.

Gondek, D. et al., 2008. Transplantation survival is maintained by granzyme B+ regulatory cells and adaptive regulatorx T cells. *Journal of Immunology*, Vol. 181, pp. 4752-4760.

Goode, I., Xu, H. & Ildstad, S., 2014. Regulatory B Cells: The New "It" Cell. *Transplantation Proceedings*, Vol. 46, pp. 3-8.

Grau, V., Herbst, B. & Steiniger, B., 1998. Dynamics of monocytes/macrophages and T lymphocytes in acutely rejecting rat renal allografts. *Cell Tissue Research*, Vol. 291 (1), pp. 117-126.

Gravano, D. & Vignali, D., 2012. The battle against immunopathology: infectious tolerance mediated by regulatory T cells. *Cellular Molecular Life Science*, Vol. 69, pp. 1997-2008.

Grossmann, W. et al., 2004. Human T regulatory cells can use the perforin pathway to cause autologous target cell death. *Immunity*, pp. 589-601.

Haas, M. et al., 2014. Banff 2013 Meeting Report: Inclusion of C4d-Negative Antibody-Mediated Rejection and Antibody-Associated Arterial Lesions. *American Journal of Transplantation*, Vol. 14, pp. 272-283.

Harrington, L. et al., 2005. Interleukin 17-producing CD4+ effector T cells develop via a lineage distinct from the T helper type 1 and 2 lineages. *Nature*, Vol. 6, pp. 1123-1132.

Heidelberg, U., 2013. CTS - Collaborative Transplant Study. [Online] Available at: <http://www.ctstransplant.org/public/graphics/sample.shtml> [Zugriff am September 2015].

Hong, Y. et al., 2012. Effectiveness of rituximab and intravenous immunoglobulin therapy in renal transplant recipients with chronic active antibody-mediated rejection. *Transplantation Proceedings*, Vol. 44, pp. 182-184.

Hsieh, C. et al., 2002. NK cells and transplantation. *Transplant Immunology*, Vol. 9 (2), pp. 111-114.

Hu, X., 2013. *Auswirkung von in vivo B-Zell-Depletion auf die Alloreaktivität im MHC-disparaten Rattentransplantationsmodell*, Hamburg: nicht veröffentlicht.

Iwata, Y. et al., 2011. Characterization of a rare IL-10-competent B-cell subset in humans that parallels mouse regulatory B10 cells. *Blood*, Vol. 117, pp. 530-541.

Izcue, A., coombes, J. & Powrie, F., 2009. Regulatory Lymphocytes and intestinal inflammation. *Annual Review of Immunology*, Vol. 27, pp. 313-338.

Jacob, J., Kelsoe, G., Rajewsky, K. & Weiss, U., 1991. Intracloonal generation of antibody mutants in germinal centers. *Nature*, Vol. 354, pp. 389-392.

Jukes, J., Wood, K. & Jones, N., 2007. Natural Killer T cells: a bridge to tolerance or a pathway to rejection?. *Transplantation*, Vol. 84, pp. 679-681.

Kaji, T. et al., 2012. Distinct cellular pathways select germline-encoded and somatically mutated antibodies into immunological memory. *Journal of Experimental medicine*, Vol. 209, pp. 2079-2097.

Kamburova, E. et al., 2013. A Single Dose of Rituximab Does Not Deplete B cells in Secondary Lymphoid Organs but alters Phenotype and Function. *American Journal of Transplantation*, Vol. 13, pp. 1503-1511.

Kamburova, E. et al., 2014. Longitudinal Analysis of T and B Cell Phenotype and Function in Renal Transplant Recipients with or without Rituximab Induction Therapy. *PLoS ONE*, Vol. 9 (11), p. e112658.

Karre.K., 2003. NK Cells, MHC Class I Molecules and the Missing Self. *Scandinavian Journal of Immunology*, Vol. 55, pp. 221-228.

Katz, S., parker, D. & Turk, J., 1974. B-cell suppression of delayed hypersensitivity reactions. *Nature*, Vol. 251, pp. 550-556.

Kawai, T. & Akira, S., 2007. TLR signaling. *Seminars in immunology*, Vol. 19 (1), pp. 24-32.

Kawai, T. & Akira, S., 2010. The role of pattern-recognition receptors in innate immunity: update on Toll-like receptors. *Nature Immunology*, Vol. 11 , pp. 373-384.

Kehry, M., 1996. CD40-mediated signaling in B cells. Balancing cell survival, growth, and death. *Journal of Immunology*, Vol. 156, pp. 2345-2348.

Khoder, A., Sarvaria, A. & Rezvani, K., 2014. Regulatory B cells are enriched within the IgM memory and transitional subsets in healthy donors but are deficient in chronic GVHD. *Blood*, Vol.124 (13), pp. 2034-2043.

Kurosaki, T., Kometani, K. & Ise, W., 2015. Memory B cells. *Nature Reviews Immunology*, Vol. 15, pp. 149-159.

Kwan, D. & Norman, A., 1974. Identification of two populations of human lymphocytes. *Acta Cytology*, Vol. 18, pp. 189-191.

Lampropoulou, V. et al., 2010. Suppressive functions of activated B cells in autoimmune diseases reveal the dual roles of Toll-like receptors in immunity. *Immunological Reviews*, Vol. 233, pp. 146-161.

Lampropoulou, V. et al., 2008. TLR-activated B cells suppress T cell-mediated autoimmunity. *Journal of Immunology*, Vol. 180, pp. 4763-4773.

Le Berre, L., Tilly, G. & Dantal, J., 2014. Is there B cell involvement in a rat model of spontaneous idiopathic nephrotic syndrome treated with LF15-0195?. *Journal of Nephrology*, Vol 27 (3), pp. 265-273.

Le Bien, T. & Tedder, T., 2008. B lymphocytes: how they develop and function. *Blood*, Vol. 112 (5), pp. 1570-1580.

Le Texier, L. et al., 2011. Long-Term Allograft Tolerance Is Characterized by the Accumulation of B cell Exhibiting an inhibited Profile. *American Journal of Transplantation*, Vol. 11, pp. 429-438.

Lee, J. & Noh, J., 2011. Allergen-specific transforming growth factor-beta-producing CD19+CD5+ regulatory B cell responses in human late eczematous allergic reaction to cows milk. *Journal of Interferon Cytokine Research*, Vol. 31, pp. 441-449.

Lee, K. et al., 2012. Anti-CD45RB/anti-TIM-1-induced tolerance requires regulatory B cells. *American Journal of Transplant*, Vol. 12, pp. 2072-2078.

Lemke, A. et al., 2015. Rat renal transplant model for mixed acute humoral and cellular rejection: Weak correlation of serum cytokines/chemokines with intragraft changes. *Transplant Immunology*

Lemoine, S., Morva, A., Youinou, P. & Jamin, C., 2009. Regulatory B cells in autoimmune diseases: how do they work?. *Annals of New York Academic Sciences*, Vol. 1173, pp. 260-267.

Lenschow, D., Walunas, T. & Bluestone, J., 1996. CD28/B7 System of T cell costimulation. *Annual Review of Immunology*, Vol. 14, pp. 233-258.

Li, M., Sanjabi, S. & Flavell, R., 2006. Transforming Growth factor-beta controls development, homeostasis and tolerance of t cells by regulatory T cell-dependent and independent mechanism. *Immunity*, Vol. 25, pp. 455-471.

Lindner, S. et al., 2013. Interleukin 21-Induced Granzyme B-Expressing B Cells Infiltrate Tumors and Regulate T Cells. *Cancer Research*, Vol. 73, pp. 2468-2479.

Liu, Y., 1996. Within germinal centers, isotype switching of Immunoglobulin genes occurs after the onset of somatic mutation. *Immunity*, Vol. 4, pp. 241-250.

Liu, Y.-J. et al., 1991. Sites of specific B cell activation in primary and secondary responses to T cell-dependent and T cell-independent antigens. *European Journal of Immunology*, Vol.21 (12), pp. 2951-2962.

MacLeod, M. et al., 2011. Memory CD4 T cells that express CXCR5 provide accelerated help to B cells. *The Journal of Immunology*, Vol. 186, pp. 2889-2896.

MacPherson, G. & Christmans, S., 2001. The role of the macrophage in cardiac allograft rejection in the rat. *Immunology Reviews*, Vol. 77, pp. 143-166.

Magee, C. & Pascual, M., 2008. Update in Renal Transplantation. *JAMA Internal Medicine*, Vol. 164, pp. 1373-1388.

Magnani, C. et al., 2011. Killing of myeloid APCs via HLA class I, CD2 and CD226 defines a novel mechanism of suppression by human TR1 cells. *European Journal of Immunology*, Vol. 41, pp. 1652-1662.

Mann, M. et al., 2007. B cell regulation of CD4+CD25+ T regulatory cells and IL-10 via B7 is essential for recovery from experimental autoimmune encephalomyelitis. *Journal of Immunology*, Vol. 178, pp. 3447-3456.

Markasz, L. et al., 2009. NK cell-mediated lysis is essential to kill Epstein-Barr virus transformed lymphoblastoid B cells when using rituximab. *Biomedical Pharmacology*, Vol. 63, pp. 413-420.

Marodi, L. & Notarangelo, L., 2007. Immunological and genetic bases of new primary immunodeficiencies. *Nature Immunology Reviews*, Vol.7, pp. 851-861.

Mauri, C. & Bosma, A., 2012. Immune Regulatory Function of B Cells. *Annual Review of Immunology*, Vol. 30, pp. 221-241.

Mauri, C., Gray, D., Mushtaq, N. & Londei, M., 2003. Novel suppressive function of transitional 2 B cells in experimental arthritis. *The Journal of Experimental Medicine*, Vol. 197, pp. 34-40.

Medzhitov, R. & Janeway, C. A., 1997. Innate immunity: impact on the adaptive immune response. *Current Opinion in Immunology*, Vol. 9 (1), pp. 4-9.

Mizoguchi, A. et al., 2002. Chronic intestinal inflammatory condition generates IL-10-producing regulatory B cell subset characterized by CD1d upregulation. *Immunity*, Vol. 16, pp. 219-230.

Mosmann, T. & Coffman, R., 1998. TH1 and TH2 cells: different patterns of lymphokine secretion lead to different functional properties. *Annual Reviews of Immunology*, Vol. 7, pp. 145-173.

Mosmann, T., Li, L. & Sad, S., 1997. Functions of CD8 T-cell subsets secreting different cytokine patterns. *Seminars in Immunology*, Vol. 9 (2), pp. 87-92.

Nemazee, D., 2000. Receptor Selection in B and T Lymphocytes. *Annual Review of Immunology*, pp. 19-51.

Newell, K. et al., 2010. Identification of a B cell signature associated with renal transplant tolerance after kidney transplantation. *Journal of Clinical Investigations*, Vol. 120, pp. 1836-1847.

Nimi, M. et al., 1998. The role of CD40 pathway in alloantigen-induced hyporesponsiveness in vivo. *Journal of Immunology*, Vol. 161, pp. 5331-5337.

Noh, J., Choi, W. & Noh, S., 2010. Presence of FoxP3-expressing CD19+CD5+ B cells in human peripheral blood mononuclear cells: human CD19+CD5+FoxP3+ regulatory B cells. *Immune Network*, Vol. 10, pp. 247-249.

Nouel, A. et al., 2014. Regulatory B cells: an exciting target for future therapeutics in transplantation. *Frontiers in Immunology*, Vol. 5, pp. 1-8.

Oracki, S. et al., 2010. Plasma cell development and survival. *Immunology Reviews*, Vol. 237, pp. 140-159.

Pallier, A. et al., 2010. Patients with drug-free long-term graft function display increased numbers of peripheral b cells with memory and inhibitory phenotype. *Kidney International*, Vol. 78, pp. 503-513.

Parker, D. et al., 1995. Survival of mouse pancreatic islet allografts in recipients treated with allogeneic small lymphocytes and antibody to CD40 ligand. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, Vol. 92, pp. 9560-9564.

Pestka, S. et al., 2004. Interleukin-10 and related cytokines and receptors. *Annual Review of Immunology*, Vol. 22, pp. 929-939.

Pieper, K., Grimbacher, B. & Eibel, K., 2013. B-cell biology and development. *Allergy Clinical Immunology*, Vol. 131, pp. 959-971.

Pillai, A., George, T., Dutt, S. & Strober, S., 2009. Host natural killer T cells induce interleukin-4-dependent expansion of donor CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺ T regulatory cells that protects against GVHD. *Blood*, Vol. 113, pp. 4458-4467.

Podolsky, D., 1999. Mucosal immunity and inflammation.V. Innate mechanism of mucosal defense and repair: the best offense is a good defense. *American Journal of Physiology*, Vol. 277 (3), pp. 495-499.

Poehnert, D. et al., 2010. Induction of chronic renal allograft dysfunction in a rat model with complete and exclusive MHC incompatibility. *Transplant Immunology*, Vol. 22, pp. 137-143.

Qin, Q. et al., 2011. TACI-Ig induces immune balance of Th cells in MLN via BLYS/APRIL-receptors signaling in rats with adjuvant-induced arthritis. *International Immunopharmacology*, Vol. 11, pp. 2167-2175.

Ray, A., Wang, L. & Dittel, B., 2015. IL-10-independent regulatory B cell subsets and mechanism of action. *International Immunology Advances*, pp. 3-26.

Reichardt, P. et al., 2007. Naive B cells generate regulatory T cells in the presence of mature immunologic synapse. *Blood*, Vol. 110 (5), pp. 1519-1529.

Rubtsov, Y. et al., 2008. Regulatory T Cell-Derived Interleukin-10 Limits Inflammation at environmental Interfaces. *Immunity*, Vol. 28, pp. 546-558.

Sabat, R. et al., 2010. Biology of Interleukin-10. *Cytokine & Growth Factor Reviews*, Vol. 21, pp. 331-344.

Sack, U., Tarnok, A. & Rothe, G., 2006. *Zelluläre Diagnostik*. Freiburg: Karger-Verlag.

Sakaguchi, S., 2011. Regulatory T cells: history and perspective. *Methods in molecular biology*, Vol. 707, pp. 3-17.

Sakaguchi, S. et al., 1995. Immunologic self-tolerance maintained by activated T cells expressing IL-2 receptor alpha-chains (CD25). Breakdown of a single mechanism of self-tolerance cause various autoimmune diseases. *Journal of Immunology*, Vol. 155, pp. 1151-1164.

Salisbury, E., Game, D. & Lechler, R., 2014. Transplantation tolerance. *Pediatr Nephrology*, Vol. 29, pp. 2263-2272.

Samstein, R. J. S., Arvey, A., Treuting, P. & Rudensky, A., 2013. Extrathymic generation of regulatory T cells in placental mammals mitigates maternal-fetal conflict. *Cell*, Vol. 150, pp. 29-38.

Saraiva, M. & O'Garra, A., 2010. The regulation of IL-10 production by immune cells. *Nature Review Immunology*, Vol. 10, pp. 170-181.

Shen, P. et al., 2015. B Cells as Regulators. *Molecular Biology of Cells*, pp. 215-225.

Shimabukuro-Vornhagen, A., Hallek, M., Storb, R. & von Bergwelt-Baildon, M., 2009. The role of B cells in the pathogenesis of graft-versus-host disease. *Blood*, Vol. 114 (24), pp. 4919-4927.

Sicard, A. et al., 2015. Cell therapy to induce allograft tolerance: time to switch to plan B?. *Frontiers in Immunology*, Vol. 6.

Sila, H. et al., 2012. Preserving the B-Cell Compartment Favors Operational Tolerance in Human Renal Transplantation. *Molecular Medicine*, Vol. 18, pp. 733-743.

Silverman, G. J. & Goodyear, C. S., 2006. Confounding B-cell defences: lessons from a staphylococcal superantigen. *Nature Reviews*, Vol. 6, pp. 465-475.

Singh, B., 2001. Control of intestinal inflammation by regulatory T cells. *Immunological Review*, Vol. 182, pp. 190-200.

Solez, K. et al., 1993. International standardization of criteria for the histologic diagnosis of renal allograft rejection: the Banff working classification of kidney transplant pathology. *Kidney International*, Vol. 44, pp. 411-422.

Su, T., Guo, B., Braun, J. & Rawlings, D., 2003. Signaling in transitional type 2 B cells is critical for peripheral B-cell development. *Immunology Reviews*, Vol. 197, pp. 161-178.

Suzuki, Y., Orellana, M., Schreiber, R. & Remington, J., 1988. Interferon-gamma: the major mediator of resistance against *Toxoplasma gondii*. *Science*, Vol. 240, pp. 516-518.

Takagi, T. et al., 2010. Evaluation of low-dose rituximab induction therapy in living related kidney transplantation. *Transplantation*, Vol. 89, pp. 1466-1470.

Tedder, T. & Engel, P., 1994. CD20: a regulator of cell-cycle progression of B lymphocytes. *Immunology Today*, Vol. 15, pp. 450-454.

Teh, H. et al., 1988. Thymic major histocompatibility complex antigens and the $\alpha\beta$ T-cell receptor determine the CD4/CD8 phenotype of T cells. *Nature*, Vol.335, pp. 229-233.

Tesch, G. et al., 2001. LF15-0195 prevents the induction and inhibits the progression of rat anti-GBM disease. *Kidney International*, Vol. 60 (4), pp. 1354-1365.

Thaunat, O. et al., 2005. Lymphoid neogenesis in chronic rejection: Evidence for a local humoral alloimmune response. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, Vol. 102 (41), pp. 14723-14728.

Thaunat, O. et al., 2008. B cell survival in intragraft Tertiary lymphoid organs after Rituximab Therapy. *Transplantation*; Vol. 85 (11), pp. 1648-1653.

Van der Berg, P. et al., 2012. Circulating lymphocyte subsets in different clinical situations after renal transplantation. *Immunology*, Vol. 136, pp. 198-207.

Vieira, P. et al., 2004. IL-10-Secreting Regulatory T Cells Do Not Express FoxP3 but have comparable regulatory Function to naturally occurring CD4+ CD25+ T cells. *Journal of Immunology*, Vol. 172, pp. 5986-5993.

Vignali, D., Collison, L. & Workman, C., 2008. How regulatory T cells work. *Nature Review Immunology*, Vol. 8, pp. 523-532.

Vivier, E. et al., 2011. Innate or Adaptive Immunity? The Example of Natural Killer Cells. *Science*, Vol. 331, pp. 44-49.

Vo, A. et al., 2008. Rituximab and intravenous immune globulin for desensitization during renal transplantation. *New England Journal of Medicine*, Vol. 359, pp. 242-251.

Weaver, C. et al., 2006. Th17: an effector CD4 T cell lineage with regulatory cell ties. *Immunity*, Vol. 24, pp. 677-688.

Wherry, E. & Ahmed, R., 2004. Memory CD8 T-Cell Differentiation during Viral Infection. *Journal of Virology*, Vol. 78 (11), pp. 5535-5545.

Willcox, A. et al., 2009. Analysis of islet inflammation in human type 1 diabetes. *Clinical and Experimental Immunology*, Vol. 155, pp. 173-181.

Wolf, S., Ditel, B., Hardardottir, F. & Janeway, C., 1996. Experimental autoimmune encephalomyelitis induction in genetically B cell-deficient mice. *Journal of Experimental Medicine*, Vol. 184, pp. 2271-2279.

Wong, C. et al., 2011. Identical beta cell-specific CD8+ T cell clonotypes typically reside in both peripheral blood lymphocytes and pancreatic islets. *Journal of Immunology*, Vol. 178, pp. 1388-1395.

Wong, P. & Pamer, E., 2004. CD8 T Cell Responses to infectious pathogens. *Annual Reviews of Immunology*, Vol. 21, pp. 29-70.

Wood, K., Bushell, A. & Hester, J., 2012. Regulatory Immune cells in transplantation. *Nature Review Immunology*, pp. 417-430.

Woollett, G., Barclay, A., Puklavec, M. & Williams, A., 1985. Molecular Heterogeneity of the Rat Leukocyte-Common Antigen from Thymocytes and T and B Lymphocytes. *European Journal of Immunology*, Vol. 15 (2), pp. 168-173.

Yu, G. et al., 2006. NK cells promote transplant tolerance by killing donor antigen-presenting cells. *Journal Experimental Medicine*, Vol. 203 (8), pp. 1851-1858.

Zarkhin, V. & Sarwel, M., 2012. The coin toss of B cell in rejection and tolerance: Danger versus defense. *Seminars in Immunology*, Vol. 24, pp. 86-91.

Zaza, G. et al., 2014. Monoclonal Antibody Therapy and Renal Transplantation: focus on Adverse Effects. *Toxins*, Vol. 6, pp. 869-891.

Zennaro, D. S. E. & Pomponi, D., 2012. Proteomics plus genomics approaches in primary immunodeficiency: the case of immune dysregulation, polyendocrineopathy, enteropathy, X-linked syndrome. *Clinical Experimental Immunology*, pp. 120-128.

Zhou, L. et al., 2007. IL-6 programs T(H)-17 cell differentiation by promoting sequential engagement of IL-21 and IL-32 pathways. *Nature of Immunology*, Vol. 8, pp. 967-974.

Zhu, J. & Paul, E., 2008. CD4 T cells: fates, functions, and faults. *Blood Journal*, Vol. 112, pp. 1557-1569.

Zhu, J. & Paul, W., 2010. Heterogeneity and plasticity of t helper cells. *Cell research*, Vol. 20 (1), pp. 4-12.

DANKSAGUNG

Zunächst bedanke ich mich bei Frau Prof. Dr. Martina Koch für die Möglichkeit meine Masterarbeit in der Abteilung für Hepatobiliäre Chirurgie und Transplantationschirurgie des Universitätsklinikums Hamburg-Eppendorf schreiben zu dürfen. Ganz besonders danke ich ihr für diverse Denkanstöße, Diskussionen, Korrekturen und die außerordentliche Unterstützung während der Arbeit.

Meinem ersten Gutachter Herrn Prof. Dr. Jörg Andrä danke ich für die Korrekturen und die Betreuung während der Arbeit.

Ich danke Herrn Dr. Hansjörg Thude und Petra Tiede für das angenehme Arbeitsklima und die Hilfsbereitschaft im Labor. Claudia Gossler und Sabrina Christiansen danke ich für die Unterstützung bei den Versuchsdurchführungen.

Ein ganz besonderer Dank gilt meinen Eltern, die mir das Studium ermöglicht haben und immer ein offenes Ohr für mich hatten.

EIDESSTATTLICHE ERKLÄRUNG

Ich versichere hiermit, dass ich die vorliegende Master Thesis ohne fremde Hilfe selbständig verfasst und nur die angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet habe. Wörtlich oder dem Sinn nach aus anderen Werken entnommene Stellen sind unter Angabe der Quellen kenntlich gemacht.

Hamburg, 24.09.2015