

**Wirksamkeitsprüfung von
Anti-T-Lymphozyten-Globulinen:**
Entwicklung und Validierung von in vitro Methoden
als Ersatz des Affenhaut-Transplantationstests

Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Naturwissenschaften

vorgelegt beim Fachbereich Biowissenschaften
der Johann Wolfgang Goethe-Universität
in Frankfurt am Main

von
Christoph Conrad
aus Mainz

Frankfurt am Main, 2007

D 30

vom Fachbereich Biowissenschaften (FB 15) der
Johann Wolfgang Goethe-Universität als Dissertation angenommen

Dekan: Prof. Dr. Volker Müller

Gutachter: Prof. Dr. Roland Prinzinger
Prof. Dr. Dieter Kabelitz

Datum der Disputation: 11.07.2008

INHALTSVERZEICHNIS

Inhaltsverzeichnis	i
Verzeichnis der Abbildungen und Tabellen	iv
I Einleitung	1
1 Antilymphozyten-Seren	1
2 Abstoßungsreaktionen nach Organtransplantation	3
3 Die Immunantwort nach Transplantation	4
3.1 Angeborene Immunität und Transplantatabstoßung	5
3.2 Chemokine in der Transplantatabstoßung	6
3.3 Der MHC (major histocompatibility complex)	7
3.4 Die Antigenpräsentation durch MHC-Moleküle	8
3.5 Die Antigenerkennung durch T-Zellen	9
3.6 Die Antigenerkennung in der Transplantation	11
3.7 Die Aktivierung von T-Zellen und deren Effektorfunktionen	12
4 Immunregulation	13
4.1 Toleranz	13
4.2 Die Rolle der T-Zell-Apoptose in der Transplantation	15
4.3 Wirkmechanismen der ATG	18
5 Testsysteme zur Prüfung der biologischen Wirksamkeit von ATG	19
II Zielsetzung	21
III Material und Methoden	22
1 Material	22
1.1 Zellen	22
1.2 Medien	22
1.3 Zytokine und Faktoren	23
1.4 Puffer und Lösungen	23
1.5 Radioaktive Reagenzien	26
1.6 Protein-Molekulargewichts-Standards	26
1.7 Antikörper und Antiseren	26
1.8 Inhibitoren	27
1.9 Test-Kits	28
1.10 Membranen und Filter	28
1.11 Sonstiges	28
1.12 Geräte	28
2 Methoden	30

2.1	Zelluläre Methoden	30
2.1.1	Isolierung mononukleärer Zellen aus peripherem Blut.....	30
2.1.2	Bestimmung der Zellzahl und Zellvitalität	30
2.1.3	Trennung von Monozyten und Lymphozyten mittels Adhärenz.....	30
2.1.4	Trennung von T- und B-Zellen.....	30
2.1.5	Herstellung von Neuraminidase behandelten Schafererythrozyten.....	30
2.1.6	Durchführung der Rosettierung	31
2.1.7	Kryokonservierung von Zellen.....	31
2.1.8	Proliferationstest (³ H-Thymidin-Einbau).....	31
2.2	Methoden zur Durchflusszytometrie	32
2.2.1	Ein- bzw. Zweifarben-Immunfluoreszenz.....	32
2.2.2	Kompetitive Immunfluoreszenz	33
2.2.3	Propidiumiodid-Färbung (PI)	33
2.2.4	SCDA (standard cell dilution analysis).....	33
2.2.5	DNA-Analyse (Methanol-Fixierung).....	34
2.2.6	FITC-Markierung	34
2.3	Proteinbiochemische Methoden	35
2.3.1	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE).....	35
2.3.2	Färbung von Proteinen in Polyacrylamidgelen	35
2.3.3	Western-Blot-Analyse	36
2.3.4	Biotinylierung von Zelloberflächenmolekülen.....	37
2.3.5	Immunpräzipitation.....	37
2.3.6	Kinase-Assay	38
IV	Ergebnisse	39
1	Zellbiologische Charakterisierung von ATG.....	39
1.1	Die Bindung von ATG an humane Lymphozyten	39
1.2	Komplement-abhängige Zytotoxizität von ATG.....	40
1.3	T-Zell-Aktivierung	43
1.4	Protein-Tyrosin-Phosphorylierung	45
1.5	Einfluss von ATG auf die gemischte Lymphozyten-Kultur	46
1.6	Antigen-Spezifitäten in ATG	47
2	Komplement-unabhängiger Zelltod.....	49
2.1	Komplement-unabhängiger Zelltod in frisch isolierten mononukleären Zellen des peripheren Blutes (PBMC)	50
2.2	Komplement-unabhängiger Zelltod in T-Zell-Linien und T-Zell-Klonen	52
2.3	Induktion von Apoptose durch ATG.....	54
2.4	Die Rolle der Caspasen im ATG induzierten Zelltod.....	56

3	Biochemische Charakterisierung.....	60
3.1	Spezifität der ATG im Kinase-Assay.....	60
3.2	Spezifische Bindung der ATG an Zelloberflächenmoleküle	63
V	Diskussion.....	66
1	Die unterschiedlichen Spezifitäten der ATG	66
2	Die Wirkmechanismen der ATG	68
2.1	Lymphozytopenie	68
2.2	T-Zell-Aktivierung	70
2.3	Programmierter Zelltod.....	73
3	Selektivität (Anergie/Toleranz)	76
4	Wirksamkeitsprüfung von Anti-T-Lymphozyten-Globulinen.....	77
VI	Zusammenfassung.....	82
VII	Literaturverzeichnis	84
	Danksagung	99
	Lebenslauf	100

VERZEICHNIS DER ABBILDUNGEN UND TABELLEN

Abb. 1: Modell zu den möglichen Wirkmechanismen der ATG.....	19
Abb. 2: Indirekte Immunfluoreszenz.....	40
Abb. 3: Komplement-abhängige Zytotoxizität gemessen mit frisch isolierten PBMC	41
Abb. 4: Komplement-abhängige Zytotoxizität gemessen mit der T-Zell-Linie Jurkat.....	42
Abb. 5: Proliferation von PBMC nach ATG-Stimulation	43
Abb. 6: Proliferation gereinigter T-Lymphozyten nach ATG-Stimulation	44
Abb. 7: Tyrosin-Phosphorylierung nach ATG-Stimulation	46
Abb. 8: ATG in der gemischten Lymphozyten-Kultur.....	47
Abb. 9: Kompetitive Immunfluoreszenz.....	48
Abb. 10: Komplement-unabhängiger Zelltod in PBMC	51
Abb. 11: Vergleich Fas-sensitive versus -resistente Subklone der T-Zell-Linie Jurkat	53
Abb. 12: Vergleich AICD-sensitive versus resistente T-Zell-Klone	54
Abb. 13: Einfluss des Fas-neutralisierenden mAk ZB4 auf den Zelltod nach ATG-Inkubation	55
Abb. 14: Einfluss des mAk ZB4 auf die DNA-Fragmentierung nach ATG-Inkubation	56
Abb. 15: Caspase-1 (ICE).....	57
Abb. 16: Caspase-9 (ICH-LAP6, APAF-3, Mch6).....	58
Abb. 17: Caspasen-3 (CPP32, Apopain, Yama) & -6 (Mch2)	59
Abb. 18: Kinase-Assay.....	61
Abb. 19: Peptide Map	62
Abb. 20: Biotinylierung	63
Abb. 21: Biotinylierung (2).....	64
Tab. 1: Oberflächenexpression der verwendeten Zellen	22
Tab. 2: Mono- und polyklonale Antikörper.....	26
Tab. 3: Inhibitoren.....	27
Tab. 4: Relative Bindungsstärke von Immunglobulinen an Protein A und Protein G.....	37
Tab. 5: Spezifitäten der ATG.....	49

I EINLEITUNG

1 Antilymphozyten-Seren

Antilymphozyten-Seren (ALS) zählen zu den wirksamsten Immunsuppressiva in der klinischen Transplantationsmedizin. Es handelt sich um Seren, die Antikörper gegen Lymphozyten einer anderen Spezies enthalten. Hierfür werden xenogene Lymphozyten (z. B. die von Menschen oder Mäusen) in Tiere inokuliert, die als gute Produzenten von Antikörpern gelten, wie etwa Kaninchen oder Pferde. Wendet man diese Seren in der Spezies an, aus der die immunogenen Lymphozyten stammen, so beobachtet man einen starken Abfall der Lymphozyten im peripheren Blut und eine dramatische Beeinträchtigung des Immunsystems. Entsprechend dem verabreichten Antigen und der anschließenden Aufreinigung des erhaltenen Serums spricht man von Antilymphozyten- oder Antithymozyten-Seren bzw. -Globuline* (Brent L, 1997).

Die biologische Wirkung von Antiseren gegen Leukozyten ist bereits seit dem Beginn des letzten Jahrhunderts bekannt. Antileukozyten-Seren wurden von E. Metchnikoff, M. Funck, S. Flexner und C.H. Bunting hergestellt und deren entzündungshemmenden sowie zytotoxischen Effekte in verschiedenen Tiermodellen beschrieben und diskutiert. Ihr enorm immunsuppressives Potenzial wurde jedoch noch nicht erkannt (Metchnikoff E, 1899; Chew WB, 1936; Brent L, 1997).

Erst in den frühen 60er Jahren wurde von mehreren Arbeitsgruppen gezeigt, dass ALS die Abstoßung von Hauttransplantationen bei Nagetieren unterdrücken (Waksman BH et al., 1961; Woodruff MFA & Anderson NF, 1963 & 1964; Gray JG et al., 1964; Sacks JH et al., 1964). Unter Zusatz von Adjuvantien hergestellte ALS waren sogar in der Lage, die Abstoßung von primären, sekundären und sogar xenogenen Transplantaten zu verlängern (Gray JG et al., 1964 & 1966; Monaco AP et al., 1966). Breite Anwendung fanden ALS in der klinischen Transplantation, als gezeigt wurde, dass ALS die allergische Spätreaktion (delayed hypersensitivity reaction) und die Abstoßung von Hauttransplantaten, auch im Menschen, unterdrücken (Monaco AP et al., 1967).

* Im Folgenden werden die in dieser Arbeit untersuchten Immunglobuline einheitlich als Anti-T-Lymphozyten-Globuline (ATG) bezeichnet. Es soll damit eine der Haupteigenschaften dieser Globuline verdeutlicht werden, nämlich die Bindung an humane T-Lymphozyten. Liegt keine Aufreinigung der Immunglobulinfraktion vor, oder ist sie, wie häufig in älteren Publikationen, nicht ersichtlich, werden diese als Antilymphozyten-Seren (ALS) bezeichnet, um so einen Unterschied zu den aktuell untersuchten und kommerziell erhältlichen Produkten deutlich zu machen.

Mittlerweile existiert eine fast 40 Jahre lange Erfahrung mit ALS/ATG in der klinischen Anwendung bei Organtransplantationen, Knochenmarktransplantationen und zur Behandlung einzelner Autoimmunerkrankungen, wie z. B. der Aplastischen Anämie. Zu den heute noch aktuellen Indikationen zählen die sog. Induktionstherapie zur Prävention von Abstoßungsreaktionen v. a. bei Risikopatienten (vorangegangene Sensibilisierung, z. B. durch eine Schwangerschaft oder aufgrund einer Retransplantation) und die Behandlung von akuten Abstoßungskrisen, insbesondere der steroidresistenten Abstoßung. Bei verzögerter Nierenfunktion werden ATG eingesetzt, um die nephrotoxische Wirkung von Cyclosporin A (CsA) zu reduzieren, sowie in der Knochenmarktransplantation zur Therapie der Transplantat-gegen-Wirt-Krankheit (GvHD, Graft vs. Host Disease) (Pescovitz MD, 1999; Monaco AP, 1999; Fachinformationen).

Trotz des großen Erfolges von Cyclosporin A (CsA) und des Einsatzes moderner Immunsuppressiva, wie Mycophenolat oder Tracolimus (FK506), weisen gerade auch neuere Studien auf die Vorteile einer Induktionstherapie mit ATG hin (Szczuch LA et al., 1997; Beiras-Fernandez A et al., 2003). Sowohl bei Risiko- wie Nichtrisikopatienten erhöht eine Induktionstherapie mit ATG deutlich die Langzeitüberlebensrate (1-3 Jahre) der Transplantate, auch die Häufigkeit akuter Abstoßungskrisen fällt geringer aus (Cardella CJ et al., 1997; Thibaudin D et al., 1998; Brennan DC et al., 2006; Carrier M et al., 2007). Eine Studie von L. S. Florence et al. (1997) demonstriert diesen positiven Effekt einer Induktionstherapie mit ATG auf die Reduktion akuter Abstoßungskrisen in Kombination mit dem modernen Immunsuppressivum Mycophenolat als Bestandteil einer Triple-Therapie mit CsA und Prednisolon.

Neben der Rolle der ATG im Vergleich zu chemischen Immunsuppressiva gilt es auch, die Bedeutung neuer monoklonaler Antikörper zu beurteilen. Im Vergleich mit dem schon seit längerem entwickelten monoklonalen anti-T-Zell Antikörper OKT3, der eine den ATG vergleichbare Indikation besitzt, lassen sich je nach Situation und Behandlungsprotokoll Vorteile sowohl für ATG als auch für OKT3 in den verschiedenen veröffentlichten Studien erkennen (Burk ML & Matuszewski KA, 1997). Neuere monoklonale Antikörper, wie etwa der anti-IL-2 Rezeptor Antikörper (Basiliximab), zeigen, im Vergleich zur Standardmedikation, in der Induktionstherapie eine signifikante Verringerung der akuten Abstoßungskrisen, und sind v. a. auch wegen ihrer geringen Toxizität und des kaum auftretenden Zytokin-Syndroms vielversprechend (Vincenti F et al., 1998; Chapman TM & Keating GM 2003).

In vergleichenden Studien an Risikopatienten und zur Behandlung akuter Abstoßungskrisen zeigen ATG einen signifikanten Vorteil gegenüber Basiliximab. Die Häufigkeit und Schwere akuter Abstoßungskrisen bei Hochrisikopatienten ist nach Behandlung mit ATG geringer (Brennan DC et al., 2006). Auch in der Induktionstherapie zur Prophylaxe akuter

Abstoßungskrisen nach Herztransplantation zeigte sich die Behandlung mit Basiliximab der mit ATG unterlegen (Carrier M et al., 2007).

In diesem Zusammenhang wird deutlich, dass die bereits vielseitig eingesetzten Anti-T-Lymphozyten-Präparate, besonders die sehr potenten Kaninchen-ATG, eine Art Standard darstellen, an dem sich alle neueren Entwicklungen messen lassen sollten. Ein Vorteil der ATG könnte gerade in ihrer Zusammensetzung mit Antikörper-Spezifitäten, die überwiegend gegen T-Lymphozyten gerichtet sind, liegen.

2 Abstoßungsreaktionen nach Organtransplantation

Im Rahmen einer allogenen Transplantation lassen sich unabhängig von der Art des übertragenen Gewebes drei verschiedene Abstoßungsreaktionen unterscheiden. Es handelt sich hierbei um die hyperakute, die akute und die chronische Abstoßung.

Hyperakute Abstoßungen treten unmittelbar nach dem Anschluss des transplantierten Organs an den Blutkreislauf des Empfängers auf. Innerhalb von Minuten bilden sich Blutgerinnsel, die eine reguläre Blut- und Sauerstoffversorgung des Transplantates verhindern; das Organ verfärbt sich dunkel und stirbt schließlich ab. Verantwortlich hierfür sind bereits im Blutkreislauf des Empfängers zirkulierende Antikörper gegen HLA- (human leukocyte antigen, humanes Leukozytenantigen) Merkmale des Spenders. Es kommt zu einer Komplement vermittelten Schädigung der Gefäßinnenwand; die so entstandene „rauhe“ Oberfläche stimuliert das Gerinnungssystem und die Bildung schnell wachsender Blutgerinnsel führt schließlich zu einer ischämischen Nekrose des Transplantates. Gegen die hyperakute Abstoßung gibt es keine Therapie. Zur Vorbeugung werden Transplantatempfänger mit Hilfe von Crossmatch-Tests auf Alloantikörper untersucht. Wiederholte Bluttransfusionen, Schwangerschaften oder eine bereits durchgeführte Transplantation konfrontieren den Organismus mit fremden HLA-Merkmalen und induzieren so die Bildung von Alloantikörpern. Auch eine Blutgruppenunverträglichkeit zwischen Spender und Empfänger kann zu einer hyperakuten Abstoßung führen, da sich die Blutgruppenmerkmale auch auf der Oberfläche von Zellen solider Organe befinden (Löw-Friedrich I & Schoeppe W, 1996).

Akute Abstoßungsreaktionen treten v. a. in der Frühphase, z. T. auch noch im späteren Verlauf nach der Transplantation auf. Die Symptomatik der akuten Abstoßung ist durch den Funktionsverlust des übertragenen Organs gekennzeichnet. Histologische Kennzeichen sind eine Entzündung mit starker Infiltration von mononukleären Zellen und die Zerstörung des Gewebes durch Zell-Lyse. Die grundlegenden immunologischen Abläufe sind dabei unabhängig vom übertragenen Gewebe. Fremde Spenderantigene werden auf direktem oder indirektem Weg von Leukozyten des Empfängers erkannt und es kommt zur Aktivierung von T-Zellen (die Antigenerkennung wird ausführlich in den Kapiteln 3.5 „Die Antigenerkennung

durch T-Zellen“ und 3.6 „Die Antigenerkennung in der Transplantation“ besprochen). Im Rahmen einer allgemeinen Entzündungsreaktion werden Zytokine, wie Interleukin-1 und -6, TNF- α und TGF- β , ausgeschüttet. Die freigesetzten Zytokine und die Ausschüttung von Entzündungsmediatoren locken ihrerseits weitere Leukozyten an. Dieser Teufelskreis verursacht irreversible vaskuläre Schäden bis hin zu Thrombosen, die letztlich zur Nekrose von Spendergewebe führen können (Löw-Friedrich I & Schoeppe W, 1996; Häyry P, 1998; Suthanthiran M & Strom TB, 1998).

Das *chronische Transplantatversagen* ist ein multifaktorielles Geschehen, zu dem nichtimmunologische und immunologische Faktoren beitragen. Es ist klinisch definiert als eine nicht mehr immunsuppressiv zu beeinflussende, langsam fortschreitende Funktionsverschlechterung. Die Länge der Ischämiezeit, das Alter des Spenders, Hypertonie, Hyperlipidämie und möglicherweise Zytomegalievirusinfektionen sowie die Hyperfiltration des Einzelneurons (Nierentransplantation) beeinflussen das Langzeitüberleben des Transplantates. Allgemeine Entzündungsreaktionen führen zur Ausschüttung von Zytokinen, wie weiter oben bereits erwähnt wurde. Neben dieser unspezifischen Reaktion des Immunsystems ist der Einfluss spezifischer Alloantigen abhängiger, immunologischer Prozesse, die ebenfalls eine Zytokin-Ausschüttung bewirken, nicht klar bewiesen (Lemström K et al., 1995; Feucht H & Opelz G, 1996; Barth C et al., 1998). Sowohl die akute als auch die chronische Abstoßung sind histologisch durch Infiltrate von mononukleären Zellen gekennzeichnet (Kasiske BI et al., 1991; Barth C et al., 1998). Bei der akuten Abstoßung überwiegen T-Zell-Infiltrate, während bei der chronischen Abstoßung Monozyten und Makrophagen neben T-Zellen dominieren (Orosz CG, 1994).

3 Die Immunantwort nach Transplantation

Die Funktionen und Mechanismen des Immunsystems in sog. normalen Situationen, wie der Abwehr von Krankheitserregern (Antigenerkennung) und der Überwachung der Gewebshomeostase, bilden die Grundlage für das Verständnis des Immunsystems. Umgekehrt lassen sich aber auch gerade aufgrund der Ausnahmesituation, die eine Transplantation darstellt, wichtige Erkenntnisse über die Funktionsweise unseres Immunsystems erkennen. Als Beispiel sei hier der MHC- (major histocompatibility complex, Haupthistokompatibilitäts-Komplex) oder HLA-Komplex zu nennen; seine Eigenschaften wurden zunächst in Zusammenhang mit der Gewebsverträglichkeit untersucht. Erst später erkannte man seine grundlegende Bedeutung für die Antigenerkennung der adaptiven Immunität. Diese Fähigkeit zur adaptiven Immunantwort stellt eine Besonderheit des Immunsystems der Säugetiere und Vögel dar. Sie ist durch Antigenrezeptoren gekennzeichnet, die mittels genetischer Rekombination und somatischer Mutation in der Lage sind, spezifisch auf ein Antigen zu reagieren. Ein weiteres Merkmal der adaptiven

Immunantwort ist das immunologische Gedächtnis. Nach wiederholtem Kontakt mit dem gleichen Antigen ist die Reaktionszeit des Immunsystems auf dieses Antigen stark verkürzt. Dem gegenüber- oder besser vorangestellt unterscheidet man die Mechanismen der angeborenen Immunität. Sie sind bereits in der Keimbahn festgelegt und besitzen keine Fähigkeit zur Adaption an dem jeweiligen Krankheitserreger. Das angeborene Immunsystem besteht aus verschiedenen Komponenten; hierzu zählt zunächst die Barrierefunktion der Epithelien. Wenn diese jedoch durchbrochen wird, sind Zellen und Moleküle an der Reihe, eine Infektion einzudämmen oder zu zerstören. In der Regel steht das angeborene Immunsystem am Anfang einer Immunantwort und bereitet dem adaptiven Immunsystem den Weg, wenn es ersterem nicht gelingt, eine Infektion zu verhindern. Dabei spielen Chemokine (chemotaktische Cytokine) eine entscheidende Rolle (Janeway CA et al., 2005; Kabelitz D & Medzhitov R, 2007).

3.1 Angeborene Immunität und Transplantatabstoßung

Das angeborene Immunsystem mit seinen natürlichen Barrieren (z. B. Haut und Schleimhäute), dem Komplementsystem, den Monozyten, Makrophagen, Granulozyten, Mastzellen und natürlichen Killerzellen (NK-Zellen) stellt die erste Front in der Verteidigung des Organismus gegen Fremdeinwirkung dar. Das wesentliche Prinzip dieser ersten Immunantwort ist die Erkennung von Pathogenen anhand funktioneller und damit häufig auch konservierter Strukturen, über die meist eine ganze Gruppe von Krankheitserregern charakterisiert ist. Dazu gehören z. B. die Lipopolysaccharide (LPS) gramnegativer Bakterien oder die Teichonsäure (teichoic acid) sowie saure Polysaccharide, die häufig in der Zellwand grampositiver Bakterien verankert sind. Man spricht in diesem Zusammenhang von pathogenassoziierten molekularen Mustern (pathogen associated molecular patterns, PAMPs), die von Mustererkennungsrezeptoren des angeborenen Immunsystems erkannt werden. Dieses Erkennungs- und Signalsystem wurde ursprünglich aufgrund seiner Funktion in der Embryonalentwicklung von *Drosophila melanogaster* entdeckt. Den Rezeptor bei *Drosophila* bezeichnet man als „Toll“, die homologen Proteine der Säuger als Toll-ähnliche (*Toll-like*) Rezeptoren (TLRs). Sie sind zwischen den verschiedenen Spezies stark konserviert und dienen zur Aktivierung der Immunabwehr über einen Signalübertragungsweg, der bei den meisten vielzelligen Organismen vorhanden ist (Medzhitov R & Janeway CA, 1997). Die Funktionen dieser TLRs sind verschieden. Häufig stimulieren sie die Aufnahme von Pathogenen, induzieren Effektormoleküle, oder üben eine chemotaktische Funktion aus. Einige TLRs werden aber auch von Zellen des adaptiven Immunsystems, z. B. von T-Lymphozyten, exprimiert. Hier üben sie entweder direkt einen co-stimulatorischen Effekt aus oder sind an der Modulation von T-Zell-Funktionen beteiligt. In diesem Zusammenhang unterscheiden sich die entsprechenden TLRs von der Funktion der

angeborenen Immunität, nämlich unmittelbar auf einen Krankheitserreger/Antigen zu reagieren (Kabelitz D, 2007).

Die Bedeutung des angeborenen Immunsystems in der Transplantation sah man zunächst auf die Reaktion gegenüber der entstandenen Wunde beschränkt, bei der es u. a. zu einer Akkumulation von Neutrophilen kommt (Medzhitov R & Janeway CA, 1997). Mittlerweile gibt es Hinweise, dass die Reaktion des angeborenen Immunsystems eine wichtige Rolle in der Organtransplantation spielt (Land WG, 2005). In einem intraperitonealen Transplantationsmodell an der Maus konnte gezeigt werden, dass Neutrophile und Monozyten auf xenogene, aber auch allogene Zellen reagieren (Fox A & Harrison LC, 2000). Diese Immunantwort ist T-Zell unabhängig, was anhand der Reaktion in SCID Mäusen (severe immunodeficiency disease mice) dargestellt werden konnte. Ebenso ist keine oder kaum eine Reaktion der Neutrophilen und Monozyten nach Injektion von syngenen Zellen zu beobachten (Fox A et al., 2001). Welche Signale und Ereignisse die Reaktion der Neutrophilen und Monozyten auf xenogene und allogene Zellen auslösen, ist noch unklar, aber es ist anzunehmen, dass sie mittels Zytokine und Chemokine die T-Zell-Infiltration beeinflussen und einen stimulierenden Effekt auf die Abstoßungsreaktionen ausüben (Fox A & Harrison LC, 2000). In verschiedenen Tiermodellen konnte gezeigt werden, dass ein Zusammenhang zwischen der Produktion von Chemokinen und der Infiltration des Transplantates mit Leukozyten besteht (Hall BM, 1991; Rosenberg AS, 1993; el-Sawy T et al., 2002).

3.2 Chemokine in der Transplantatabstoßung

Chemokine sind chemotaktische Cytokine mit einem Molekulargewicht von 8-11 kDa. Die etwa 60 Mitglieder dieser Familie lassen sich entsprechend ihren aminoterminalen Cystein-Motiven in die Subfamilien C, CC, CXC und CX₃C unterteilen. In Bezug auf ihre biologischen Funktionen, die nicht in Zusammenhang mit der Unterteilung in Subfamilien stehen, lassen sich Chemokine anhand ihrer Beteiligung an entzündlichen Prozessen oder ihrer Rolle in der Gewebsentwicklung und -homeostase unterscheiden. Chemokinrezeptoren gehören zu den G-Protein-gekoppelten Rezeptoren, deren einzige Polypeptidkette die Lipid-Doppelschicht der Zellmembran 7fach durchspannt (Janeway CA et al., 2005).

Nach der Organtransplantation kann man zwei zeitlich aufeinander folgende Chemokin-Kaskaden beobachten: eine frühe, nach etwa 3-72 Std und eine späte, nach 48-72 (+) Std. Die frühen Chemokine treten nach der Transplantation von allogenen wie isogenem (autologem) Gewebe auf, die späten hingegen nur nach der Allotransplantation. Zu dieser späten Kaskade gehören im Wesentlichen die Chemokine MIG (CXCL9), IP-10 (CXCL10) und i-TAG (CXCL11); sie wirken chemotaktisch auf Antigen spezifische T-Zellen, die den Chemokinrezeptor CXCR₃ exprimieren. Mit Ausnahme von IP-10 sind diese Chemokine von

einer lokalen INF- γ Produktion abhängig. Welche Mechanismen dazu führen, dass MIG und IP-10 in Allotransplantaten produziert werden, ist noch unklar. Es gibt jedoch Hinweise dafür, dass zirkulierende CD8⁺ Gedächtniszellen, die noch nicht von Alloantigenen aktiviert wurden, Entzündungsherde, sog. Entzündungs-Foci, im Gefäßsystem infiltrieren und dort alloreaktive (gegen MHC I) T-Zellen stimuliert werden, INF- γ zu produzieren. INF- γ wiederum aktiviert Endothelzellen zur Produktion von MIG (el-Sawy T et al., 2002).

Chemokine sind die entscheidenden Faktoren, Effektorzellen des Immunsystems an den Ort des Geschehens, in der Regel den Entzündungsherd, zu leiten. Sie stellen über diese Funktion eine Verbindung von den Mechanismen der angeborenen Immunität hin zur adaptiven Immunantwort dar (Luster AD, 2002).

3.3 Der MHC (major histocompatibility complex)

Der bisher wohl bedeutendste Beitrag der Transplantationsimmunologie zur Grundlagenforschung in der Immunologie dürfte die Entdeckung der Haupthistokompatibilitätsantigene sein. P. A. Gorer (1936 & 1937) und G. D. Snell (1948), ursprünglich interessiert an Tumorphathogenese, identifizierten die Antigene und den Genlocus, der für die Immunantwort gegen Tumortransplantate im Mausmodell verantwortlich war. Dieser wurde später als Histokompatibilitäts-Komplex 2 (H-2-Komplex) der Maus bekannt und war der erste Histokompatibilitäts-Komplex, der identifiziert wurde (Brent L, 1997). Dieser Haupthistokompatibilitäts-Komplex (major histocompatibility complex, MHC) codiert eine Reihe von Histokompatibilitätsantigenen. Nahezu alle Genloci des MHC befinden sich auf einer einzigen chromosomalen Region; die Gene sind hoch polymorph und ihre Produkte werden auf der Oberfläche einer Reihe von Zellen exprimiert. Bei der Maus liegt der MHC auf Chromosom 17 und beim Menschen auf Chromosom 6 (Janeway CA et al., 2005).

Parallel zur Erforschung des H-2-Komplexes in der Maus machten auch die Arbeiten zur Gewebetypisierung mit Hilfe von Seren schwangerer Frauen, die Alloantikörper-Spezifitäten gegen väterliche Histokompatibilitätsantigene enthalten, große Fortschritte. Es dauerte jedoch noch eine Weile, bis die biochemische Verwandtschaft des humanen Leukozyten-Antigens (human leukocyte antigens, HLA) und dem H-2 System der Maus erkannt wurden (Brent L, 1997; Strominger JL, 2002).

Nachdem die Transplantationsantigene, wie die Histokompatibilitätsantigene auch genannt wurden, und ihre Genloci sowohl in der Maus als auch im Menschen beschrieben worden waren, erschien es naheliegend, dass hinter dieser Komplexität eine grundlegendere biologische Funktion stehen muss als die bloße Antigenwirkung, die zur Abstoßung von Allotransplantaten führt.

R. M. Zinkernagel und P. C. Doherty (1974) beschrieben als erste *in vitro* die MHC-Restriktion von zytotoxischen T-Zellen gegenüber virusinfizierten Fibroblasten. T-Zellen

wurden zunächst *in vivo* mit dem Lymphozytären-Choriomeningitis-Virus (LCV) sensibilisiert. Bei der anschließenden Inkubation der Lymphozyten mit LCV infizierten Fibroblasten konnte eine starke zytotoxische Reaktion nur beobachtet werden, wenn Lymphozyten und infizierte Fibroblasten in mindestens einem H-2 Haplotypen identisch waren. Diese Restriktion war jedoch nicht zu beobachten, wenn die Lymphozyten gegen Alloantigene sensibilisiert waren. Die MHC-Restriktion ist auf die sog. minor Antigene (auch *minor* Histokompatibilitätsantigene) beschränkt, die viralen Ursprungs sein können oder von polymorphen Proteinen stammen, von denen unterschiedliche Peptide in verschiedenen Individuen einer Spezies produziert werden (Cerrottini JC et al., 1970).

3.4 Die Antigenpräsentation durch MHC-Moleküle

Nach einem Vorschlag, der auf J. Klein (1977 & 1979) zurückgeht, unterteilte man den MHC zunächst in zwei Klassen. Klasse I kommt auf fast allen Arten von Körperzellen vor, Klasse II dagegen nur auf Immunzellen, wie Makrophagen, B-Zellen und Dendritische Zellen, die man auch als professionelle Antigen präsentierende Zellen bezeichnet (antigen presenting cells, APC). Mittlerweile ist die räumliche Struktur beider Klassen bekannt, und obwohl sie sich strukturell unterscheiden, haben sie gefaltet eine sehr ähnliche Gestalt. Das Auffallendste dabei ist eine tiefe Bindungsspalte für ein Peptid (Bjorkman PJ et al., 1987; Brown JH et al., 1993; Stern LJ & Wiley DC, 1994). Diese von beiden MHC-Klassen gebundenen Peptide entstehen in den Zellen an unterschiedlichen Orten.

Bei der Klasse I stammen sie aus Proteinen im Zytoplasma außerhalb der Zellorganellen. Die Proteine werden dort von der Zelle im Zuge der normalen Erneuerung ihrer Eiweißstoffe verdaut. Ein für die Degradation mit Ubiquitin markiertes Protein gelangt in ein Proteasom, um dort in Peptide mit einer Länge von etwa 15 Aminosäuren (AS) gespalten zu werden. Diese zytosolischen Peptide werden von einer Aminopeptidase weiter gespalten, wobei einige der 8-15 AS langen Peptide über ein Transportmolekül namens TAP-Protein (transporter associated with antigen processing) in das endoplasmatische Retikulum (ER) gelangen (Shepherd JC et al., 1993). Dort führt ein selektiver Prozess zur Assoziation des MHC I mit einem passenden Peptid. Infolgedessen faltet sich der MHC zusammen mit dem Peptid in seine für die Antigenerkennung endgültige Form. Über den Golgi-Apparat gelangt dieser Komplex an die Zelloberfläche und das Peptid wird zytotoxischen T-Zellen (CD8⁺ T-Zellen) präsentiert. Im ER werden die Peptide durch das Molekül ERAAP (ER Aminopeptidase assoziiert mit Antigenprozessierung) um einzelne AS abgebaut, und nur solche Peptide, die in Länge und AS-Sequenz am besten in die Peptid-Bindungsspalte des MHC passen, werden gebunden und so vor einem weiteren Abbau geschützt (Serwold T et al., 2002).

MHC-Moleküle der Klasse II besitzen, anders als die der Klasse I, schon vor der Assoziation des passenden Peptides ihre endgültige Gestalt. Eine spezielle, angelagerte Aminosäurekette verhindert solange die Bindung von Peptiden, bis das MHC-Molekül Vesikel erreicht hat, in denen sich Peptide befinden, die aus dem Verdau endozytotisch aufgenommener Organismen oder Fragmente bestehen (Chapman HA, 1998). Exogene Antigene, wie z. B. Bakterienproteine, werden nach Endozytose im sauren Milieu der Endosomen durch Proteasen fragmentiert, anschließend in Assoziation mit MHC-Klasse II-Molekülen in exozytotischen Vesikeln an die Zelloberfläche gebracht und T-Helfer Zellen (CD4⁺ Zellen) präsentiert (Lanzavecchia A et al., 1992).

Eine weitere Genregion, die so genannten Klasse III Gene, wurde später identifiziert; sie kodiert verschiedene Proteine mit Immunfunktionen. Hierzu zählen u. a. Proteine des Komplementsystems und Cytokine, wie z. B. der Tumornekrosefaktor- α (TNF- α) (Janeway CA et al., 2005).

3.5 Die Antigenerkennung durch T-Zellen

Die Antigenerkennung durch T-Zellen ist, wie weiter oben schon erwähnt, MHC-restringiert. Sowohl das MHC-Molekül als auch das von ihm präsentierte antigene Peptid werden vom T-Zell-Rezeptor (TCR) gemeinsam erkannt. Er wird auf allen reifen T-Zellen exprimiert und besteht aus zwei transmembranen Glykoproteinen. Der größte Teil der im peripheren Blut vorhandenen T-Zellen trägt einen Rezeptor aus einer α - und β -Kette (90-99 %), nur ein geringer Teil exprimiert den $\gamma\delta$ -T-Zell-Rezeptor (1-10 %) (Meuer SC et al., 1983). Jede Kette besitzt zwei extrazelluläre Domänen, die strukturelle Homologien mit den Fab-Fragmenten des B-Zell Antigen-Rezeptors aufweisen. Der TCR selbst besitzt nur einen sehr kleinen zytoplasmatischen Anteil ohne typische Sequenzen für die Signaltransduktion. Diese Funktion wird von dem assoziierten CD3-Molekül und der ζ -Kette übernommen, obwohl auch diese keine enzymatische Aktivität aufweisen. Die Signalweiterleitung über den TCR-Komplex erfolgt nach Rekrutierung von zytoplasmatischen Tyrosinkinase, die ihrerseits eine Reihe von Adaptormolekülen binden und so eine spezifische Weiterleitung der Antigenerkennung durch den TCR auslösen (Kane LP et al., 2000).

Eine entscheidende Rolle in der Antigenerkennung kommt den als Korezeptor bezeichneten Molekülen CD4 und CD8 zu. Sie sind jeweils für die MHC-Restriktion der T-Zellen verantwortlich. CD4⁺ T-Zellen sind MHC II restringiert und CD8⁺ T-Zellen MHC I.

CD4 ist ein einzelsträngiges Molekül aus vier Domänen (D₁-D₄), die man strukturell zur Immunglobulin-Familie zählt. Die Bindung an den MHC II erfolgt über einen ausgedehnten Bereich des CD4-Moleküls, den membranproximalen Domänen D₁ und D₂, an die Bindungsregionen der β_2 - und α_2 -Domänen (König R et al., 1996). Diese Regionen des

MHC-Moleküls liegen von den Bereichen der TCR/pMHC-Interaktion entfernt, sodass CD4 und der TCR gemeinsam den MHC binden können. Aus kürzlich gewonnenen Erkenntnissen der Strukturanalyse geht jedoch hervor, dass CD4 in einem nahezu 90° Winkel an den MHC bindet (Wang JH et al., 2001). Es scheint daher eher wahrscheinlich, dass mit dem TCR assoziierte CD4-Moleküle (Anderson P et al., 1988; Beyers AD et al., 1992) an ein benachbartes MHC-Molekül binden, wodurch sich sog. Pseudodimere bilden können. Schwache Bindungen von CD4 an benachbarte MHC-Moleküle würden somit schwache Bindungen zwischen TCR/pMHC stabilisieren (Irvine DJ et al., 2002). Zu dieser Modellvorstellung, einer frühen Phase der T-Zell-Aktivierung, passen Ergebnisse, wonach CD4 die Sensitivität des TCR um ein bis zwei Zehnerpotenzen steigern kann (Marrack P et al., 1983; Hampl J et al., 1997; Vidal K et al., 1999); außerdem konnte von D. J. Irvine et al. gezeigt werden, dass CD4⁺ T-Zellen auf ein einzelnes agonistisches pMHC-Molekül bereits mit einer transienten Kalziumausschüttung reagieren (Irvine DJ et al., 2002).

Über die membranproximale Domäne (D₄) können sich CD4-Moleküle zu Homodimeren anlagern, wobei die Region für die Bindung an den MHC II frei bleibt und es zu einer Vernetzung von MHC-Molekülen durch CD4-Homodimere kommen kann (Wu H et al., 1997); eine weitere Möglichkeit, benachbarte TCR/pMHC-Interaktionen zu stabilisieren. Die Anlagerung des CD4-Moleküls an den TCR/pMHC-Komplex, als Voraussetzung für die oben beschriebene Funktion des CD4-Moleküls, scheint von der Stabilität (Halbwertszeit) des TCR/pMHC-Komplexes abhängig zu sein (Hampl J et al., 1997; Madrenas J et al., 1997; Vidal K et al., 1999; König R, 2002;). Agonisten, jedoch keine Antagonisten, sind in der Lage, diese Anlagerung zu unterstützen. Dieser Mechanismus steht in Einklang mit der Ausbildung und Stabilisierung einer immunologischen Synapse (IS), ein supramolekularer und hoch organisierter Bereich in der Kontaktregion zwischen T-Zelle und APC, der eine entscheidende Rolle in der T-Zell-Aktivierung spielt (Paul WE & Seder RA, 1994; Krümmel MF & Davis MM, 2002). Es sind etwa 10 TCR-Agonisten (pMHC) an der Kontaktstelle von T-Zelle und APC nötig, damit die charakteristische Struktur einer IS ausgebildet wird (Irvine DJ et al., 2002). Zu Beginn der Ausbildung einer IS finden sich CD4 und CD3ζ gemeinsam im Zentrum, jedoch wandert mit zunehmender „Reifung“ der IS CD4 an die Peripherie. Die Bedeutung dieser Umverteilung ist noch nicht bekannt, aber sie deckt sich mit der Beobachtung, dass die Intensität der Signale des TCR im Verlauf der Synapsenbildung abnimmt (Krümmel MF et al., 2000). In der zentralen Region einer „reifen“ IS (central supramolecular activation cluster, c-SMAC) befinden sich hauptsächlich kleine Zelloberflächenmoleküle wie der TCR/CD3-Komplex, CD2 und CD28 sowie assoziierte Signalmoleküle. Diese Region ist von einem peripheren Ring (peripheral supramolecular activation cluster, p-SMAC) umgeben, in dem sich überwiegend große Adhäsionsmoleküle finden, wie das LFA-1 und das Zytoskelettmolekül Talin.

Für das Korezeptormolekül CD8 kann eine ähnliche Funktion angenommen werden. CD8 ist ein Heterodimer: Zwei immunglobulinartige Domänen (α und β) sind über eine Disulfidbrücke miteinander verbunden und über eine lange, stark glykosylierte Polypeptidkette in der Membran verankert. Nicht gebundene, in löslicher Form vorliegende CD8- α -Ketten-Homodimere ((s)CD8 $\alpha\alpha$) unterbinden die Aktivierung von CD8-abhängigen zytotoxischen T-Zellen, außerdem wirkt sich (s)CD8 auf die Protein-Phosphorylierung in T-Zellen aus (Sewell AK et al., 1999). Zusammenfassend lässt sich die These aufstellen, dass es bei TCR/pMHC-Interaktionen ohne Beteiligung der Korezeptoren (CD4 oder CD8) nicht zu einem agonistischen Signal kommt, sondern eine entsprechende T-Zell-Aktivierung eher unterbunden wird (König R, 2002).

3.6 Die Antigenerkennung in der Transplantation

Ein Hauptproblem in der klinischen Transplantation ist, neben der akuten Abstoßung, nach wie vor die chronische Abstoßung, eine langsame, aber progressive Verschlechterung der Organfunktion. Im Gegensatz zur akuten Abstoßung, der sich mit immer effektiveren immunsuppressiven Therapien begegnen ließ, konnte bisher noch kein Ansatz gefunden werden, um den Verlauf einer chronischen Abstoßung aufzuhalten oder gar umzukehren. T-Zellen spielen sowohl in der akuten als auch in der chronischen Abstoßungsreaktion eine entscheidende Rolle und der erste Schritt einer spezifischen Immunantwort gegen Alloantigen ist das Erkennen der Transplantationsantigene durch T-Zellen (Krensky A et al., 1990; Sayegh MH & Turka LA, 1998).

Wie im vorangegangenen Kapitel deutlich wurde, unterscheidet man zwei Typen von spezifischer Antigenerkennung durch T-Zellen: Zum einen die Präsentation endogener, in der Regel viraler Antigene über das MHC I-Molekül, welches von jeder kernhaltigen Zelle im Körper exprimiert wird; zum anderen die Präsentation exogener Antigene, die nur durch professionelle APC den T-Zellen dargestellt werden können. In Bezug auf die APC unterscheidet sich die Immunantwort gegenüber einem Transplantat grundlegend, da es hier zwei Populationen von APC gibt: die des Empfängers und die des Spenders. Die physiologisch nicht typische Stimulation von T-Zellen durch APC des Spenders bezeichnet man als direkte Antigenerkennung (direct recognition), wohingegen die physiologisch normale Situation, die Präsentation des Antigens durch APC des Empfängers, als indirekt (indirect recognition) bezeichnet wird (Gould DS & Auchincloss H Jr, 1999).

Die Bedeutung der direkten Antigenerkennung für die Transplantatabstoßung stützt sich im Wesentlichen auf drei grundlegende Beobachtungen. Erstens zeigt eine primär allogene gemischte Lymphozyten-Kultur einen deutlichen Anstieg der Proliferation als Reaktion auf die Stimulation der T-Zellen. Diese Stimulation wird kaum durch die APC der Responder-

Population beeinflusst, jedoch verringert sich die Proliferation deutlich nach einer Depletion der APC in der stimulierenden Population. Zweitens konnte K J Lafferty et al. (1976) bei der Transplantation allogener Schilddrüsenzellen, die in Kultur gehalten wurden und damit frei von APC sind, eine Verlängerung der Transplantatakzeptanz ohne Immunsuppression erreichen (Lafferty KJ et al., 1976). Drittens wird die Überlebensrate der Transplantate wesentlich durch eine gute Übereinstimmung in den Gewebemerkmalen, insbesondere im MHC, verbessert. Wie der Name schon sagt, wurde der MHC ursprünglich aufgrund dieser Eigenschaft identifiziert (Pescovitz MD et al., 1984).

Für die indirekte Antigenerkennung sind polymorphe Peptide aus Nebenhistokompatibilitätsantigenen und Peptide aus den MHC-Molekülen des Spenders entscheidend. Sie alleine können bereits eine Transplantatabstoßung auslösen. Hauttransplantate, denen das MHC II-Antigen fehlt, werden sehr schnell abgestoßen (Chitilian HV & Auchincloss H Jr, 1997); in einigen Fällen wurde außerdem beobachtet, dass Abstoßungsreaktionen, die primär von einer indirekten Antigenerkennung abhängen, mitunter schneller ablaufen als Abstoßungsreaktionen, an denen eine direkte Antigenerkennung beteiligt ist (Lee RS et al., 1997; Koulmanda M et al., 2004). Für die Bedeutung der indirekten Antigenerkennung spricht auch, dass mit der Applikation von Peptiden und nicht von intakten Molekülen des Spender MHC-Antigens eine erhebliche Verbesserung der Transplantatakzeptanz erreicht werden konnte. Diese Peptide können nur Einfluss auf die indirekte Antigenerkennung ausüben, nicht auf die direkte (Sayegh MH & Krensky AM, 1996).

3.7 Die Aktivierung von T-Zellen und deren Effektorfunktionen

T- und B-Lymphozyten sind die Protagonisten der adaptiven Immunantwort, dessen Strategie auf der Anpassung ihrer Reaktivität an ein pathogenes Agens beruht. Dieser Anpassung liegt im Wesentlichen das zentrale Prinzip der klonalen Selektion zugrunde (Burnet FM, 1959).

Die adaptive Immunantwort kann in eine humorale, von B-Zellen vermittelte und eine zelluläre, von T-Zellen eingeleitete Immunantwort unterteilt werden. T-Lymphozyten haben neben ihrer zytotoxischen Wirkung, vermittelt über CD8⁺ T-Zellen, auch eine zentrale Rolle in der Regulation der Immunantwort. B-Zellen sezernieren Antikörper und lösen damit die humorale Immunantwort aus. Diese erworbene spezifische Immunität hält häufig ein Leben lang an.

Für eine gezielte adaptive Immunantwort ist eine spezifische Antigenerkennung durch T-Lymphozyten notwendig, die von der Präsentation antigener Strukturen durch professionelle Antigen präsentierende Zellen (APC) abhängt. Fremdartigen wird von diesen Zellen, den APC (dendritische Zellen, Makrophagen, B-Zellen), prozessiert und den T-Zellen

präsentiert. Hier spielt, wie im vorangegangenen Abschnitt erörtert, der MHC eine entscheidende Rolle (Janeway CA et al., 2005).

Naive CD4⁺ T-Zellen differenzieren nach ihrer Aktivierung zunächst zu unreifen Effektorzellen, den s. g. Th₀-Zellen; diese differenzieren sich weiter und können aufgrund ihres Zytokin-Spektrums unterteilt werden. Inflammatorische T-Zellen (Th₁-Zellen) können durch Sekretion von Interferon- γ (INF- γ) infizierte Makrophagen anregen, Tuberkulose-Erreger in ihren Vesikeln zu töten. Der Verlust dieser Sorte von CD4⁺ T-Zellen im Falle von AIDS macht Betroffene so anfällig für Erkrankungen, wie z. B. Tuberkulose.

Eine andere Untergruppe von T-Helferzellen, die Th₂-Zellen, produzieren u. a. Interleukin-4 (IL-4), IL-5 und IL-10 sowie den transformierenden Wachstumsfaktor- β (TGF- β) und steuern die Aktivität von B-Zellen. Ein fremdes Protein (Antigen), das vom B-Zell-Rezeptor erkannt und gebunden wird, gelangt nach innen in Vesikel und wird, wie bereits beschrieben, zusammen mit dem MHC II-Molekül auf der Zelloberfläche präsentiert. Wenn T-Helferzellen den Komplex erkennen, schütten sie Botenstoffe aus, welche die Antigen stimulierten B-Zellen veranlassen, Antikörper herzustellen (Murphy KM & Reiner SL, 2002).

4 Immunregulation

Welche Mechanismen liegen der Induktion von Toleranz zu Grunde? Eine Antwort auf diese Frage darf wohl als das größte Ziel der Transplantationsimmunologie gelten. Die Entschlüsselung von Strategien zur Induktion von Toleranz ist nicht nur für die Transplantation von Bedeutung, sondern auch für die Behandlung von Autoimmunerkrankungen und Allergien. Wenn auch die Mechanismen im Einzelnen noch nicht genau bekannt sind, so ist es doch eindeutig, dass die grundlegende Toleranz des Immunsystems gegenüber Selbstantigenen auf der Reifung von T-Lymphozyten im Thymus beruht (Brent L, 1997; Janeway CA et al., 2005).

Die Toleranzinduktion gegen transplantiertes Gewebe ist bisher nur in Tiermodellen möglich (Fändrich F et al., 2002). Nur eine allgemeine Immunsuppression mit all ihren Nachteilen ist bisher in der Lage, die Abstoßung von fremdem Gewebe in der klinischen Transplantation zu unterdrücken. Der Einsatz von ATG verbindet Immunsuppression mit einer Reihe von immunregulatorischen Mechanismen (Müller TF et al., 1997; Oertel M et al., 2002).

4.1 Toleranz

Mit Toleranz bezeichnet man die Nichtreaktivität des Immunsystems gegenüber eigenem oder fremdem Antigen. Die Selbst-Toleranz beruht im Wesentlichen auf zwei Mechanismen: Die klonale Deletion durch ubiquitäre Selbst-Antigene und die klonale Inaktivierung durch

gewebespezifische Antigene, die in Abwesenheit costimulierender Signale präsentiert werden.

Antigene, die in großer Zahl auf körpereigenen Zellen in der Pheripherie exprimiert werden, führen zur Anergie oder einer lokalen Deletion der Lymphozyten, die diese Antigene erkennen. In Tiermodellen zur Transplantation konnte eine spezifische Anergie von T-Zellen des Empfängertieres gegenüber dem Spendergewebe erzeugt werden, in dem man das Immunsystem vorab mit Zellen, die den MHC II des Spenders exprimierten, konfrontierte (Billingham RE et al., 1953; Braun MY et al., 1993).

Eine klonale Expansion von T-Zellen kann nur durch professionelle APC ausgelöst werden, da nur von ihnen die notwendigen costimulierenden Signale exprimiert werden. Die Charakterisierung der auf T-Zellen exprimierten Rezeptoren CD28 und CTLA4 mit ihren korrespondierenden Liganden B7.1 (CD80)/B7.2 (CD86) auf Antigen präsentierenden Zellen führte zur Identifikation des zweiten, für die effektive Aktivierung von T-Zellen notwendigen Signals. Eine Blockade dieses „zweiten Signals“ stellt eine attraktive Möglichkeit dar, die T-Zell-Aktivierung zu verhindern, um so möglicherweise Toleranz gegenüber Transplantaten zu induzieren. In verschiedenen Transplantationsmodellen, wie z. B. der Herz- oder Nierentransplantation, wurde dieser Ansatz bereits erfolgreich umgesetzt (Lenschow DJ et al., 1995; Guérette B et al., 1996; Larsen CP et al., 1996).

Ein anderer Mechanismus der Immunmodulation, der geeignet scheint, Toleranz zu induzieren, ist die Beeinflussung der Zytokin-Expression. Eine Verschiebung des Verhältnisses von Th₁-Zellen zu Th₂-Zellen kann sich auf die Induktion von Toleranz günstig auswirken. Bei einer Reihe von Immunsuppressiva lässt sich eine solche Beeinflussung der Zytokin-Expression beobachten, zu ihnen gehören CTLA4-Ig (Sayegh MH et al., 1995), Rapamycin (Ferrareso M et al., 1994) sowie komplexe Protokolle aus Spender spezifischer Bluttransfusion, anti-CD4 Antikörper und Cyclosporin A. Eine Reihe von Ergebnissen zeigen jedoch auch, dass die von T-Lymphozyten freigesetzten Cytokinmuster sehr komplex sind und die Einteilung in Th₁- und Th₂-Zellen eine starke Vereinfachung darstellt (Fukaura H et al., 1996; Levings MK & Roncarolo MG, 2000).

Eine für die Immunhomöostase und Selbsttoleranz wichtige Subpopulation der T-Zellen sind die regulatorischen T-Zellen (Tregs). Diese Gruppe von T-Zellen ist in sich heterogen und kann weiter unterteilt werden: in sog. natürliche Tregs, wie den CD25⁺CD4⁺ Tregs oder den Tr1- und Th3-Zellen u. a., und Populationen von Tregs, die durch ein bestimmtes Milieu von Zytokinen induziert werden (Sakaguchi S, 2006). Tregs sind in der Lage die Aktivierung, Proliferation oder Effektorfunktion von T-Zellen zu unterdrücken (Davies JD et al., 1996; Marshall SE et al., 1996; Lin CY et al., 2002).

4.2 Die Rolle der T-Zell-Apoptose in der Transplantation

Es ist offensichtlich, dass Apoptose in der T-Zell-Entwicklung innerhalb des Thymus eine entscheidende Rolle spielt; aber auch in der Peripherie kann der programmierte Zelltod in reifen und aktivierten T-Zellen, jedoch nicht in ruhenden, induziert werden (Kabelitz D et al., 1993). Wie im vorangegangenen Kapitel bereits erwähnt, ist die Induktion von Toleranz in der Peripherie ein von verschiedenen Faktoren abhängiger Prozess. Suppression, Anergie, die Regulation der TCR-Expression und die Deletion reaktiver T-Zellen durch Apoptose spielen hierbei eine Rolle.

In abgestoßenem Gewebe findet man eine Vielzahl apoptierter Zellen und in einigen Transplantationsmodellen lässt sich beobachten, dass die Expression des Fas-Liganden durch Zellen des Transplantates mit dessen Überleben korreliert. Darüber hinaus scheinen einige der neu entwickelten Immunsuppressiva, die zurzeit in klinischen Studien untersucht werden, mit ihren Wirkmechanismen Einfluss auf die Signalwege der Apoptose zu besitzen. Die insgesamt vorhandenen Daten lassen also den Schluss zu, dass Apoptose sowohl bei der Abstoßung wie auch der Toleranz von transplantiertem Gewebe eine Rolle spielt (Kabelitz D, 1998).

Im Gegensatz zur Nekrose handelt es sich bei der Apoptose, dem programmierten Zelltod, um einen aktiven Prozess, der von spezifischen Signalen abhängig und durch typische morphologische Veränderungen sowie biochemische Vorgänge charakterisiert ist (Cohen JJ et al., 1992). In den meisten Fällen lässt sich eine Zellschrumpfung, die Verdichtung des Zytoplasmas, die Abschnürung von Membran umschlossenen Vesikeln, den sog. apoptotischen Körperchen, und eine Kondensation des Kernchromatins beobachten. In der Regel wird die zelluläre DNA durch zelleigene Endonukleasen in Fragmente mit einer Länge von etwa 180 Basenpaaren (bp) zerteilt. Diese Fragmentierung der DNA kann mit unterschiedlichen Methoden nachgewiesen werden. Mittels Elektrophorese im Agarosegel lässt sich die fragmentierte DNA als typische DNA-Leiter (DNA-ladder) darstellen, alternativ können apoptotische Zellen mithilfe der sog. TUNEL-Färbung nachgewiesen werden. Bei diesem Verfahren werden die 3'-Enden von DNA-Fragmenten, die in apoptotischen Zellen entstehen, durch die Reaktion der terminalen Desoxynucleotidyltransferase (TdT) mit biotinyliertem Uridin markiert. Die Biotinmarkierung lässt sich dann mithilfe von Enzym gekoppeltem oder Fluoreszenz markiertem Streptavidin sichtbar machen. Die TUNEL-Färbung kann in der Durchflusszytometrie (FACS) oder immunzytologisch eingesetzt werden (Gorczyca W et al., 1993; Kabelitz D et al., 1993).

Eine weitere Methode, DNA-Fragmente mittels FACS-Analyse nachzuweisen, ist die Färbung isolierter Zellkerne apoptierender Zellen mit Propidiumjodid. Dieser Farbstoff interkaliert nur bei doppelsträngiger DNA zwischen den in der Doppelhelix aufeinanderfolgenden Basenpaaren und fluoresziert erst dann mit einer bestimmten

Wellenlänge, sodass Zellkerne mit intakter DNA ein stärkeres Fluoreszenzsignal zeigen als Zellkerne, deren DNA teilweise in Fragmenten und/oder einzelsträngig vorliegt. Da es sich bei der Apoptose um einen morphologisch definierten Zelltod handelt, ist die Darstellung typischer morphologischer Veränderungen der Zelle mittels Elektronenmikroskopie der letztlich entscheidende Nachweis von Apoptose (Cohen JJ et al., 1992).

Aktivierungsinduzierter Zelltod (AICD)

Im Gegensatz zu ruhenden T-Lymphozyten der Peripherie lässt sich bei aktivierten T-Zellen durch Stimulation des TCR/CD3-Komplexes, z. B. mittels Antikörper oder Superantigenen, Apoptose induzieren. Ausgelöst wird dieser aktivierungsinduzierte Zelltod (AICD) durch die Interaktion von Fas (CD95, Apo-1) mit seinem Liganden, Fas-Ligand (Fas-L). Fas zählt zur Tumornekrosefaktor- (TNF-) Rezeptorfamilie und wird auf vielen verschiedenen Zellen, einschließlich T-Lymphozyten, exprimiert. Fas-L gehört dagegen zur TNF-Familie, seine Expression auf Lymphozyten ist jedoch streng reguliert. Sie wird im Zuge der T-Zell-Aktivierung induziert; die Interaktion von Membran- gebundenem oder löslichem Fas-L mit seinem Rezeptor Fas induziert den programmierten Zelltod in der Fas-exprimierenden Zelle. TNF und sein Rezeptor TNFR-1 können ähnlich wie der Fas-L und Fas agieren, tun dies aber in sehr viel geringerem Ausmaß und mit einer verzögerten Kinetik (Zheng L et al., 1995; Nagata S, 1997; Orlinick JR & Chao MV, 1998).

Alle Signalübertragungswege, die den programmierten Zelltod auslösen, involvieren Cysteinproteasen, die Proteinketten hinter Asparaginsäureresten spalten, und deshalb auch als Caspasen bezeichnet werden. Bei den aktivierten Lymphozyten wird der programmierte Zelltod durch Stimulation der Rezeptoren Fas oder TNFR-1 ausgelöst. Die Liganden dieser Rezeptoren induzieren nach der Bindung eine Trimerisierung des Rezeptors. Die zytoplasmatischen Enden dieser Rezeptoren haben alle ein gemeinsames Motiv, die sog. Todesdomänen (death domains, DD) für Protein-Protein-Wechselwirkungen. Die Adaptorproteine, die mit den Todesdomänen in den zytoplasmatischen Schwänzen von Fas und TNFR-1 interagieren, nennt man FADD bzw. TRADD. Rezeptor und Adaptorproteine bilden zusammen den Todes-Komplex (death inducing signaling complex, DISC). FADD und TRADD wiederum treten über eine zweite Todesdomäne (death effector domain, DED) mit dem Protein FLICE (Caspase-8) in Wechselwirkung, dessen carboxyterminale Domäne eine Procaspase ist, d. h. die inaktive Form einer Caspase. Die Bindung aktiviert die enzymatische Aktivität von FLICE und führt zu einer Proteasekaskade, in der aktivierte Caspasen eine Abfolge von nachgeschalteten Caspasen spalten und aktivieren. Diese Caspase-Kaskade führt letztlich zur Spaltung (Proteolyse) der Lamine, Actin, poly(ADP)ribose Polymerase (PARP), sowie zur Aktivierung der caspaseaktivierten DNase (CAD); sie gelangt in den Zellkern und spaltet die DNA.

Aus diesen Schritten resultieren die für apoptotische Zellen charakteristischen morphologischen Veränderungen. Zu ihnen zählen das Schrumpfen der Zelle an sich, die Auflösung der Kernmembran, das Kondensieren des Chromatins und die Bildung von DNA-Fragmenten. Die Zellmembran einer apoptierenden Zelle bleibt jedoch weitgehend intakt, sodass kein intrazelluläres Material nach außen gelangt und so eine Entzündungsreaktion auslösen kann (Krammer PH, 1999; Screaton G & Xu XN, 2000).

Weitere Rezeptoren, mit der für Fas und TNFR typischen Todesdomäne, wurden identifiziert; sie zählen ebenfalls zur TNFR-Familie: die Todesrezeptoren (death receptor) DR3 (TRAMP) und DR4, auch als TRAIL-Rezeptor bezeichnet (TNF-related apoptosis-inducing ligand). Neben DR4 wurden noch weitere TRAIL-Rezeptoren beschrieben, die jedoch keine Todesdomäne besitzen. Ob und, wenn ja, welche Rolle sie in der Regulation oder dem Auslösen von Apoptose spielen, bleibt fraglich. Ihre Rolle einschließlich der Rezeptoren DR3 und DR4 innerhalb der Transplantation ist ebenfalls noch unklar (Chinnaiyan AM et al., 1996; Bodmer J-L et al., 1997; Pan G et al., 1997).

Die Regulation des AICD

In ruhenden T-Zellen lässt sich der AICD nicht auslösen. Damit wird sicher gestellt, dass reife, aber naive T-Zellen nach Antigenerkennung aktiviert und nicht in den Zelltod getrieben werden. Erst nach mehrmaligem Durchlaufen des Zellzyklus führt die Aktivierung über den TCR zum AICD. Dieser Mechanismus hilft, das Gleichgewicht der Zellpopulationen des Immunsystems aufrecht zu erhalten (Kabelitz D et al., 1993). Die Resistenz ruhender T-Zellen gegenüber dem AICD scheint darauf zu beruhen, dass die Caspase-8 nicht an den Todes-Komplex (death inducing signaling complex, DISC) bindet (Peter ME et al., 1997).

Darüber hinaus wird der AICD über eine Reihe von Oberflächenmolekülen und Cytokinen reguliert. Ein Beispiel ist CD28, der Rezeptor für die Liganden B7.1 (CD80) und B7.2 (CD86): In murinen T-Zellen konnte gezeigt werden, dass CD28 die Apoptose im Rahmen einer primären Immunantwort inhibiert. Dem gegenüber scheint die Bindung an CD4 vor der Aktivierung über den TCR/CD3-Komplex, T-Zellen für den AICD zu sensibilisieren. Im Gegensatz dazu hemmt die Bindung an CD4, z. B. durch mAk, den AICD in aktivierten T-Zellen. In diesem Fall wird die Expression des Fas-L durch die Bindung an CD4 in Reaktion auf die Stimulation des TCR/CD3-Komplexes inhibiert (Oberg HH et al., 1997 B).

Der Wachstumsfaktor für T-Zellen, Interleukin-2 (IL-2), führt T-Zellen u. a. in die S-Phase des Zellzyklus, in dem sie besonders sensibel auf die Induktion des AICD reagieren (Kabelitz D et al., 1993).

4.3 Wirkmechanismen der ATG

Nach wie vor ist die Beobachtung einer Lymphopenie und eine Verbesserung der klinischen Situation der zuverlässigste Parameter, um die immunsuppressive Wirkung der ATG zu kontrollieren. Dem entsprechend wird die Zytolyse aktivierter Lymphozyten als primärer Wirkmechanismus diskutiert, wobei man nicht weiß, ob dieser Effekt über die Bindung von Komplement oder aufgrund einer Blockade von Signaltransduktionswegen und/oder durch Opsonierung vermittelt wird (Leimenstoll G et al., 1991). Ursprünglich diskutierte man die selektive Depletion von Lymphozyten im peripheren Blut und im Gewebe aufgrund einer direkten Lymphozytotoxizität. Die Beobachtung einer anhaltenden Immunsuppression, auch nachdem sich die Anzahl der Lymphozyten im Blut wieder normalisiert hat, wies darauf hin, dass noch weitere oder gar andere Wirkmechanismen eine Rolle spielen müssen. In diesem Zusammenhang wurden bisher folgende Mechanismen diskutiert:

- blindfolding, ATG verhindern das Erkennen von Spenderantigenen;
- sterile activation, eine Aktivierung ohne vollständige Effektorfunktion der Lymphozyten;
- Toleranzinduktion, vergleichbar mit einer neonatalen Situation (immunologische Inkompetenz), aufgrund der breit ausgelösten Lymphopenie.

Außerdem ist es möglich, dass die Induktion von Apoptose und/oder Anergie ebenfalls eine Rolle spielen können (Monaco AP & Russel PS, 1966; Lance E & Medawar PB, 1969; Brent L, 1997).

Ausgehend von diesen Überlegungen sollen im Folgenden die primären Mechanismen, die von ATG aufgrund ihrer spezifischen Bindung an T-Lymphozyten ausgelöst werden können, zusammengefasst werden. Eine Übersicht dieser modellhaften Überlegungen ist in Abb. 1 gegeben.

Je nach Kompatibilität des F_c -Bereiches der ATG mit den F_c -Rezeptoren humaner B-Zellen, NK-Zellen, Monozyten und Makrophagen sowie den Granulozyten und dem Komplementsystem können ATG die jeweiligen über F_c -Rezeptoren induzierten zytotoxischen Mechanismen auslösen. Die Reaktivität des Komplementsystems sowie die Aktivierung zytotoxischer Zellen oder die Opsonierung mit anschließender Phagozytose stellen naheliegende Möglichkeiten dar, die in der Klinik zu beobachtende schnelle und selektive Depletion zirkulierender T-Lymphozyten nach Applikation von ATG zu erklären.

Eine systematische Analyse der ATG hat zur Identifizierung einer Reihe von Antikörpern gegen funktionelle Oberflächenmoleküle auf Lymphozyten geführt. T-Zellen können über eine direkte Bindung einzelner Spezifitäten von ATG an CD2 und/oder CD3 bzw. durch Kreuzvernetzung von CD3 aktiviert werden. Aber auch die Transplantation allogenen Gewebes an sich führt bereits zu einer Aktivierung alloreaktiver T-Zellen. In Folge dieser Aktivierung ist von einer Modulation einer ganzen Reihe von Funktionen wie Zytokin-

Ausstoß, Zell-Zell-Kommunikation und Zell-Matrix-Interaktion sowie von Apoptose auszugehen.

Eine weitere Möglichkeit, die oben genannten Funktionen zu modulieren, einschließlich der Aktivierung von T-Zellen, liegt in einer Art „Maskierung“ von Rezeptoren durch die Bindung von ATG.

Ebenfalls in Zusammenhang mit der Aktivierung von T-Lymphozyten ist die Induktion von Apoptose, z. B. über das System Fas/FasL oder die direkte Bindung von Fas durch ATG auf aktivierten Lymphozyten, zu sehen.

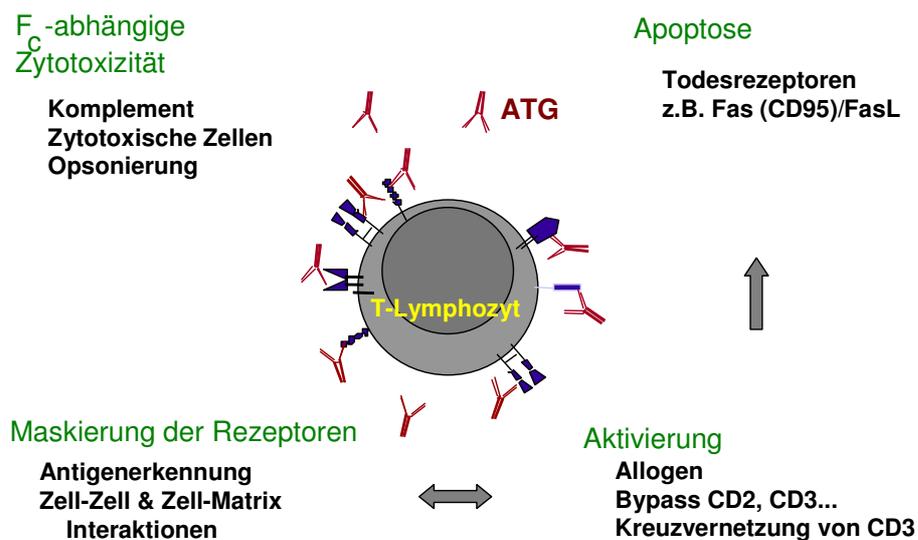


Abb. 1: Modell zu den möglichen Wirkmechanismen der ATG

Schematische Darstellung der Effekte, die durch ATG aufgrund ihrer spezifischen Bindung an T-Lymphozyten ausgelöst werden können.

5 Testsysteme zur Prüfung der biologischen Wirksamkeit von ATG

Antilymphozyten-Globuline werden im Rahmen der Zulassung und der Chargenprüfung im sog. Affenhaut-Transplantationstest auf ihre Wirksamkeit überprüft. Als *in vitro* Methoden wurden bisher der sog. Rosetten-Inhibitionstest sowie die komplement-abhängige Zytotoxizität mit Auszählung der toten Zellen nach Trypanblau-Färbung im Mikroskop angewendet.

Der Affenhaut-Transplantationstest wurde 1968 von H. Balner et al. für die Wertbemessung von ALS beschrieben und galt lange Zeit als Standard für die Wirksamkeitsprüfung von ATG. Ursprünglich wurden Schimpansen und Cynomolgen eingesetzt, wohingegen später neben Cynomolgen überwiegend Rhesusaffen (*Macacus cynomolgus*, *M. fascicularis*, *M. mulatta*) verwendet wurden. Den Test-Tieren wird in der Regel vor der Transplantation, entsprechend

einer Induktionstherapie, eine für das jeweilige Produkt festgelegte Dosis verabreicht. Jedes Tier erhält zwei Hauttransplantate von zwei verschiedenen Tieren der gleichen Spezies. Als Kontrolle dient ein Tier, das die Hauttransplantate ohne entsprechende ATG-Therapie bekommt. Die Wirksamkeit der ATG zeigt sich in der gegenüber dem Kontrolltier verzögerten Abstoßung der Hauttransplantate. Dieser Affenhaut-Transplantationstest ist der bisher einzige allgemein anerkannte Test zur funktionellen Bewertung von ATG.

In vitro erfolgte die Wirksamkeitsbewertung bisher v. a. mit dem E-Rosetten-Inhibitionstest. Schaferythrozyten binden an den Rezeptor CD2 menschlicher T-Lymphozyten und bilden sog. Rosetten. Da ATG u. a. Spezifitäten gegen das CD2-Antigen enthalten, können sie die Rosettenbildung zwischen T-Zellen und Schaferythrozyten dosisabhängig hemmen. Dieser Test unterliegt einer erheblichen Schwankungsbreite und ist nur schwer standardisierbar, da die Auswertung der Rosettenbildung im Mikroskop sehr subjektiv ist.

Ähnlich verhält es sich mit der zweiten *in vitro* Methode, der komplement-abhängigen Zytotoxizität. Nach Inkubation der Lymphozyten mit ATG in Gegenwart von Kaninchenkomplement werden die toten Zellen nach Färbung mit Tryphanblau im Mikroskop ausgezählt.

II ZIELSETZUNG

Der aufwendige Affenhaut-Transplantationstest zur Wirksamkeitsprüfung der ATG wird aus Kosten- bzw. Tierschutzgründen an maximal drei Tieren durchgeführt (ein Kontrolltier und ein oder zwei Versuchstiere), was seine statistische Aussagekraft stark begrenzt. Aber auch die Problematik, die Wirkmechanismen der ATG vom Affen auf den Menschen zu übertragen, macht es schwierig, die biologische Wirksamkeit der Seren im Tierversuch zu bewerten. Hier sei v. a. auf die etwa 10-fach höhere Tagesdosis pro kg Körpergewicht der ATG im Tierversuch gegenüber der Dosierung in der klinischen Anwendung hingewiesen (laut Testprotokoll zur Chargenprüfung vom Medical Primate Research Centre in Rijswijk, Niederlande).

Die bereits vorhandenen *in vitro* Methoden bieten, wie einleitend schon dargelegt, keine Alternative als Ersatz zu diesem Tierversuch. Abgesehen von den diskutierten methodischen Problemen wurden weder der Rosetten-Inhibitionstest noch der komplement-abhängige Zytotoxizitätstest als Ersatzmethode validiert.

Ziel dieser Arbeit ist es, einen umfangreichen Beitrag zur immunologischen Charakterisierung von ATG sowie zur immunologischen Spezifizierung unterschiedlicher ATG-Präparate und verschiedener Chargen zu erbringen. Dies ist eine wesentliche Voraussetzung dafür, dass die bisher verwendeten Methoden der Wirksamkeitsprüfung von ATG dem Stand der Wissenschaft entsprechend abgelöst und der Tierversuch ersetzt werden können.

Im Einzelnen werden folgende Ziele verfolgt:

- Identifizierung der wesentlichen Antikörper-Spezifitäten in ATG;
- Biochemische Charakterisierung von ATG, Darstellung von Produktunterschieden und Überprüfung der Chargenhomogenität;
- Charakterisierung der mitogenen bzw. inhibitorischen Aktivitäten von ATG auf die Lymphozyten-Aktivierung;
- Charakterisierung der Wirkung von ATG auf die Alloreaktivität von T-Lymphozyten in der gemischten Lymphozyten-Kultur (MLR);
- Charakterisierung der zytotoxischen Wirkung von ATG: Klärung der Frage, ob neben der komplement-abhängigen Lyse durch ATG auch Apoptose („aktiver Selbstmord“) in Zielzellen ausgelöst wird.

Aus den Erkenntnissen der Untersuchungen nach heutigem Stand der Wissenschaft wurden geeignete *in vitro* Methoden abgeleitet, die zum Ersatz des Affenhaut-Transplantationstests geeignet sind; darüber hinaus wurde der Entwurf einer europäischen Arzneibuch-Monografie für Antilymphozyten-Seren erarbeitet.

III MATERIAL UND METHODEN

1 Material

1.1 Zellen

Folgende Zellen wurden eingesetzt:

1. E-rosettierte (E⁺) oder PHA-expandierte, humane T-Zellen, aufgereinigt aus peripheren mononukleären Zellen aus dem Blut von Gesundspendern (PBMNZ); die Zellen wurden über die Blutbank Frankfurt/Main als Vollblut ohne Plasma (buffy coat) jeweils frisch bezogen. E-rosettierte Zellen wurden an Tag 1-3, PHA-Blasten an Tag 6-12 in Experimenten eingesetzt.
2. Derivate der Jurkat-Leukämie-T-Zell-Linie (JM, JM 301, JM 13.1, JM 319, JE 6.1), bezogen von ATCC (American Type Tissue collection) oder anderen Laboren.
3. Zellen des AICD-sensitiven, humanen T-Zell-Klons D894/25 und des AICD-resistenten, humanen T-Zell-Klons D566/4 (im eigenen Labor etabliert, s. Kabelitz D & Wesselborg S, 1992; Oberg HH et al., 1997 A); die Zellen wurden zur Expansion periodisch restimuliert und zwischen Tag 4 und 12 in den Experimenten eingesetzt.

Die Expression von charakteristischen Oberflächenrezeptoren wurde vor den Experimenten durchflusszytometrisch bestimmt (Tab. 1).

Tab. 1: Oberflächenexpression der verwendeten Zellen

	TZR $\alpha\beta$	CD3	CD2	CD8	CD4	CD5	CD25	CD95	CD28	HLA-DR
JM	+	+	+	-	+	+	+	+	+	-
JE 6.1	+	+	+	-	+	+	+	+	+	-
JM 13.1	-	-	+	-	+	+	+	+	+	-
JM 319	+	+	-	-	+	+	-	+	+	-
JM 301	+	+	-	-	+	+	+	+	+	-
D894/25	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+
E⁺Zellen:	85-90 % CD3 ⁺ /CD2 ⁺ , davon 70-80 % CD4 ⁺ und 20-30 % CD8 ⁺									
PHA-Blasten:	> 90 % CD3 ⁺ /CD2 ⁺ , davon 60-70 % CD4 ⁺ und 30-40 % CD8 ⁺									

1.2 Medien

Medienzusätze wurden sterilfiltriert, das jeweilige Medium bei 4 °C gelagert und innerhalb einer Woche verbraucht.

Zellkulturmedium 10 % (5 %) FKS

RPML-1640 Fertigmedium	400 ml	PEI (Paul-Ehrlich-Institut)
Hepes (N-2-Hydroxyethylpiperazin-N'-2-Ethansulfonsäure)	10 mM	PEI
L-Glutamin	2 mM	PEI
Streptomycin	100 µg/ml	PEI
Penicillin	100 U/ml	PEI
FKS	5 %/10 % (v/v)	Biochrom, Berlin

(FKS wurde auf Mykoplasmen getestet und 1 Std bei 56 °C hitzeinaktiviert.)

Einfriermedium

Zellkulturmedium mit 20 % FKS

Dimethylsulfoxid (DMSO)	10 % (v/v)	Merck, Darmstadt
-------------------------	------------	------------------

AB-Medium

Zellkulturmedium mit Zusatz von 10 % (v/v) AB-Serum anstelle von FKS

(hitzeinaktivierter Serumpool von männlichen Spendern der Blutgruppen A, B oder AB)

1.3 Zytokine und Faktoren

<i>Faktor</i>	<i>Einsatzkonzentration</i>	<i>Bezugsquelle</i>
rekombinantes Interleukin-2 (rIL-2)	15 U/ml (1/2000)	Proleukin, Chiron GmbH, Ratingen
Ionomycin	250 ng/ml	Calbiochem, Bad Soden
Phytohämagglutinin A (PHA)	0,5 µg/ml	Abbott, Wiesbaden
Staphylokokkus Enterotoxine	1 ng/ml	Serva, Heidelberg
Tetradecanylphorbolacetat (TPA)	10 ng/ml	Sigma, Heidelberg

1.4 Puffer und Lösungen

Alle hier aufgeführten Puffer und Lösungen wurden, soweit nicht anders vermerkt, bei 4 °C gelagert.

3-fach Proben-Puffer für SDS-PAGE (RT)

Natriumdodecylsulfat (SDS)	6 % (w/v)	Serva, Heidelberg
Glycerin	30 % (v/v)	Merck, Darmstadt
Tris-Puffer pH 6,8	125 mM	Merck, Darmstadt
Bromphenolblau	0,06 % (v/v)	Merck, Darmstadt
β2-Mercaptoethanol	2-5 % (v/v)	Merck, Darmstadt

Alsever-Lösung

(Fertiglösung)		Biochrom, Berlin
----------------	--	------------------

Blockierungslösung für Western-Blot

BSA	5 % (w/v)	Roth, Karlsruhe
NaN ₃	0,1 % (w/v)	Merck, Darmstadt

ECL-Stripping-Lösung für Western-Blot

Tris pH 6,8	62,5 mM	Merck, Darmstadt
β-Mercapthoethanol	100 mM	Merck, Darmstadt
SDS	2 % (v/v)	Merck, Darmstadt

Elektrophorese-Puffer für Western-Blot

Tris pH 8,0	25 mM	Merck, Darmstadt
Glycin	200 mM	Merck, Darmstadt
Methanol	20 % (v/v)	PEI
SDS	0,015 % (v/v)	Serva, Heidelberg
H ₂ O		PEI

Eosinlösung für Zellzahl-Bestimmung

Eosin	2 g	Merck, Darmstadt
NaN ₃	0,25 g	Merck, Darmstadt
NaCl-Lösung 0,9 %ig	450 ml	Merck, Darmstadt
FKS	50 ml	Biochrom, Berlin

Färbelösung für Proteine

Ponceau's Farbkonzentrat	10 % (v/v)	Sigma, Heidelberg
H ₂ O		PEI

Ficoll-Trennlösungen

Ficoll 1,077 g/ml		Seromed
(Bei 4 °C gelagert und vor Gebrauch auf Raumtemperatur erwärmt.)		

Heparin/Natrium

1 ml/100 ml Blut	Braun, Melsungen
------------------	------------------

HRP-Detektionsreagenz für Western-Blot

ECL-Fertiglösung 1 + 2	Amersham, Braunschweig
Die Lösungen wurden stets frisch angesetzt.	

Lyse-Puffer

Nonidet P40 (NP-40) od. Brij 96	1 % (v/v)	Fluka, Buchs (CH)
Tris pH 7,4	20 mM	Merck, Darmstadt
NaCl	0,15 M	Merck, Darmstadt
EDTA	5 mM	PEI
H ₂ O		PEI
Inhibitoren (SOV, SF, SPP, PMSF, APR, LEU) wie in der Tab. 3 angegeben.		

PBS (Phosphat- gepufferte Salzlösung) pH 7,0

NaCl	100 mM	Merck, Darmstadt
Na ₂ HPO ₄	80 mM	Merck, Darmstadt
KH ₂ PO ₄	20 mM	Merck, Darmstadt

Paraformaldehyd (PFA)-Puffer für Immunfluoreszenz

PFA	1 % (w/v)	Sigma, Heidelberg
PBS pH 7,0		PEI

Propidiumiodid-Puffer (PI-Puffer)

PI	2 µg/ml	Calbiochem, Bad Soden
PBS pH 7,0		PEI

Propidiumiodid-Färbelösung für Methanolfixierung

PI	100 µg/ml	Calbiochem, Bad Soden
Triton-X-100	0,1 % (v/v)	Sigma, Heidelberg
EDTA	3,7 g/100 ml	Sigma, Heidelberg
PBS pH 7,0		PEI
(Bei 4 °C gelagert und vor Gebrauch auf Raumtemperatur erwärmt.)		

Sammelgel für SDS-PAGE

30 % Acrylamid/0, 8 % Bisacrylamid	1,67 ml	National Diagnostics
Tris-Puffer 1M pH 6,8	1,25 ml	Merck, Darmstadt
SDS 10 %	100 µl	Merck, Darmstadt
H ₂ O	7,03 ml	PEI
Ammoniumperoxidsulfat 20 % (APS)	50 µl	Merck, Darmstadt
TEMED	10 µl	Merck, Darmstadt

TAE-Puffer für Gelelektrophorese pH 7:8

Tris	40 mM	PEI
Essigsäure	20 mM	
EDTA	1 mM	

TBE-Puffer für Gelelektrophorese pH 8,0

Tris	90 mM	PEI
Borsäure	90 mM	
EDTA	2 mM	

TBS (Tris-gepufferte Salzlösung) für Western-Blot

Tris pH 8,0	10 mM	Merck, Darmstadt
NaCl	150 mM	Merck, Darmstadt

TBST für Western-Blot

Tris pH 8,0	10 mM	Merck, Darmstadt
NaCl	150 mM	Merck, Darmstadt
Tween® 20	0,05 %	Merck, Darmstadt

TE-Puffer für Gelelektrophorese pH 8,0

Tris-HCl	10 mM	Merck, Darmstadt
Titriplex III	1 mM	PEI

Transfer-Puffer pH 8,0 für Western-Blot

Tris	25 mM	Merck, Darmstadt
Glycin	190 mM	Serva, Heidelberg
Methanol	20 % (v/v)	PEI
SDS	0,015 % (v/v)	Serva, Heidelberg
H ₂ O		PEI

(Der Transfer-Puffer wurde bei 4 °C gelagert und möglichst kalt eingesetzt.)

Trenngel 10 % für SDS-PAGE (30 ml)

30 % Acrylamid/0, 8 % Bisacrylamid	10 ml	National Diagnostics
Tris-Puffer 1M pH 8,8	11,2 ml	Merck, Darmstadt
SDS 10 %	300 µl	Merck, Darmstadt
H ₂ O	8,7 ml	PEI
Ammoniumperoxidsulfat 20 % (APS)	100 µl	Merck, Darmstadt
TEMED	20 µl	Merck, Darmstadt

Wasch-Puffer für Immunfluoreszenz

BSA	1 % (w/v)	Roth, Karlsruhe
NaN ₃	0,1 % (w/v)	Merck, Darmstadt
PBS pH 7,0		PEI
Bei 4 °C gelagert.		

1.5 Radioaktive Reagenzien

Methyl- ³ H-Thymidin-Lösung:	spezifische Aktivität: 21 mCi/ml
	radioaktive Konzentration: 1 mCi/ml
(γ - ³² P-ATP)	9,25 MBq/25 μ l Amersham, Braunschweig

1.6 Protein-Molekulargewichts-Standards

Protein-Molekulargewichts-Standards für die SDS-PAGE wurden nach Herstellerangaben eingesetzt. Verwendet wurden verschiedene ungefärbte und vorgefärbte Molekulargewichtsmarker von Novex, Frankfurt/Main (Mark 12/SeeBlue/MultiMark), Biorad, München (Low MWM/High MWM/Prestained MWM Broad Range), Amersham, Braunschweig (RainbowMarker) und New England Biolabs, Schwalbach/Ts (Protein Marker Broad Range).

1.7 Antikörper und Antiseren

Die in Tab. 2 aufgeführten mono- und polyklonalen Antikörper wurden z. T. für proteinbiochemische Analysen, z. T. in Zellkulturansätzen und FACScan-Analysen eingesetzt.

Tab. 2: Mono- und polyklonale Antikörper

Antikörper	Spezifität	Isotyp	Bezug	Konjugat
ATG-Fresenius	humane T-Zellen	Kaninchen- IgG	Fresenius	-
ATG-Biotest	humane T-Zellen	Kaninchen- IgG	Biotest	-
Thymoglobulin	humane T-Zellen	Kaninchen- IgG	Sangstat	-
Lymphoglobulin	humane T-Zellen	Pferde-IgG	Sangstat	-
ATGAM	humane T-Zellen	Pferde-IgG	Upjohn	-
Rabbit IgG	-	Kaninchen- IgG	Sigma	-
Horse IgG	-	Pferde-IgG	Sigma	-
Leu5b	CD2	Maus-IgG1	BD	FITC/PE
OKT11	CD2	Maus-IgG1	ATCC	-/FITC/B
OKT3	CD3	Maus-IgG2a	CILAG	-/PE/FITC
Leu4	CD3	Maus-IgG1	BD	PE
OKT4	CD4	Maus-IgG2b	ATCC	-/FITC
5F8	CD4	Maus-IgG1	Lab. Kabelitz	-
Leu3a	CD4	Maus-IgG1	BD	PE
Leu1	CD5	Maus-IgG2a	BD	PE
Leu9	CD7	Maus-IgG2a	BD	FITC
OKT8	CD8	Maus-IgG2a	ATCC	-/FITC
Leu2a	CD8	Maus-IgG1	BD	PE
G-25.2	CD11a	Maus-IgG2a	BD	FITC
LeuM3	CD14	Maus-IgG2b	BD	FITC
Leu11	CD16	Maus-IgG1	BD	PE
6.7	CD18	Maus-IgG1	BD	FITC

Antikörper	Spezifität	Isotyp	Bezug	Konjugat
Leu12	CD19	Maus-IgG1	BD	FITC
L27	CD20	Maus-IgG1	BD	FITC
B-Ly4	CD21	Maus-IgG1	BD	PE
2A3	CD25	Maus-IgG1	BD	PE
Leu45R0	CD45R0	Maus-IgG2a	BD	PE
Leu23	CD69	Maus-IgG1	BD	PE
DX2	CD95	Maus-IgG1	BD	
7C11	CD95	Maus-IgM	Robertson M	-
CH11	CD95	Maus-IgM	Upstate Biotechnology	-
ZB4	CD95	Maus-IgG1	Upstate Biotechnology	-
L243	HLA DR	Maus-IgG2a	BD	FITC
4G10	p-Tyr	Maus-IgG2b	Upstate Biotechnology	-
anti-fyn	fyn	Ascites	Da Silva et al., Boston	-
anti-lck	lck	IgG	Janssen et al., Langen	-
anti-Maus	Maus-IgG	Schaf-F(ab') ₂	Amersham	HRP
anti-Kaninchen	Kaninchen-IgG	Esel-IgG (poly)	Amersham	HRP

1.8 Inhibitoren

Die in Tab. 3 aufgeführten Inhibitoren wurden in Zellkulturansätzen oder als Zusätze in proteinbiochemischen Puffern (z. B. Lyse-Puffer) verwendet.

Tab. 3: Inhibitoren

Inhibitor	Abkürzung	Spezifität	Einsatzkonzentration	Bezugsquelle
Herbimycin A	HerbA	src-ähnliche PTK Inhibitor	1,5 µM	Calbiochem
Genistein	Gen	PTK Inhibitor	75 µM	Calbiochem
Aprotenin	APR	Serin-Protease Inhibitor	5 mg/ml	Sigma
Wortmannin	Wort	PI3-Kinase Inhibitor	100 nM	Calbiochem
Tyrphostin	Tyrp	PTK Inhibitor	25 µM	Calbiochem
Leupeptin	LEU	Trypsin/Cystein-Protease Inhibitor	5 µg/ml	Sigma
Ethylenamintetraacetat	EDTA	inhibiert Kationen abhängige Proteasen, inhibiert Phosphatasen		Merck
Phenylmethyl-Sulfonyl-Fluorid	PMSF	irreversible Inhibition von Serin-Proteasen	1 mM	Sigma
Natriumorthovanadat	SOV	Phosphatase Inhibitor	1 mM	Sigma
Natriumfluorid	SF	Protease Inhibitor	10 mM	Fluka
Natriumphosphat	SPP	Protease Inhibitor	1 mM	Sigma
Caspase-1 (N-1510)	ICE	(Z-VAD-FMK) Caspasen-1, -3, -4, -7	25, 50, 100 µM	Bachem
Caspase-3 (H-3358)	Cpp-32, Yama, Apopain	(Ac-DMQD-CHO) Caspase-3	25, 50, 100 µM	Bachem
Caspase-6 (N-1640)	Mch2	(Ac-VEID-CHO) Caspase-6	25, 50, 100 µM	Bachem
Caspase-9 (N-1720)	Mach6	(Ac-LEHD-CHO)	25, 50, 100 µM	Bachem

1.9 Test-Kits

ECL-Detection-Kit Amersham, Braunschweig

1.10 Membranen und Filter

Nylon-Membran Hybond-N+	Amersham, Braunschweig
Nitrocellulose-Membran Hybond-C	Amersham, Braunschweig
Filterpapier Whatman 3MM	Whatman, Maidstone (GB)
Filtrationsgefäß 0,2 µm	Schleicher & Schuell, Dassel
Filtrationsgefäß 0,45 µm	Schleicher & Schuell, Dassel
Spritzen-Vorsatzfilter 0,45 µm	Satorius, Göttingen
Spritzen-Vorsatzfilter 0,2 µm	Satorius, Göttingen
Spritzen-Vorsatzfilter 0,2 µm (mit Vorfilter)	Satorius, Göttingen
Dialyseschlauch	Satorius, Göttingen

1.11 Sonstiges

Protein G-Sepharose 4 Fast Flow	Pharmacia, Freiburg
Biotin-X-NHS	Calbiochem, Bad Soden
Fluorescein Isothiocyanat (FITC)	Sigma, Heidelberg
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma, Heidelberg
Kaninchen-Komplement	Behringwerke AG, Marburg

1.12 Geräte

β-Counter	Packard
Absaugvorrichtung (PHD)	Dunn Laboratories
Cäsiumquelle (Gammacell 1000)	Atomic Energy of Canada Ltd.
CO ₂ -Begasungsbrutschrank	Heraeus, Flow Laboratories
Durchflusszytometer (FACScan)	Becton Dickinson
Ein- und Zwölfkanalpipetten	Eppendorf, Labsystems
Elektrophoresekammern	Biorad
Photometer	Pharmacia
Filmentwicklungsmaschine Compact 45	Dupont
Kühlzentrifuge Typ 15R	Heraeus
Lichtmikroskop	Zeiss
Metallblock Thermostat DB-2 und DB-3	Techne
Netzgerät	Biorad

Netzgerät Consort E443	Fröbel
pH-Meter	WTW
Pipetus	Integra
Protein-Elektrophorese-Kammer Protean II	Biorad
Röntgenfilm-Kassetten	Amersham
Schüttelwasserbad	GFL
Sicherheits-Sterilbank	Flow Laboratories
Tischzentrifuge Typ 5415C	Eppendorf
Ultraschallgerät	Branson
Ultrospec Plus Spektralphotometer	Pharmacia
Umkehrmikroskop	Zeiss
Videokamera mit Thermoprinter	Fröbel Labortechnik
Wärmeschrank	Heraeus
Western-Blot Transfer-Zelle Trans-Blot	Biorad
Wipptisch	Fröbel
Zentrifuge Typ Megafuge 1.0	Heraeus

2 Methoden

2.1 Zelluläre Methoden

2.1.1 Isolierung mononukleärer Zellen aus peripherem Blut

PBMC (mononukleäre Zellen des peripheren Blutes) wurde mittels Dichtezentrifugation über Ficoll-Hypaque isoliert. Hierzu wurden ca. 35 ml verdünntes Vollblut (bzw. Zellsuspension) über 15 ml Ficoll (1,077 g/ml Dichte) geschichtet. Nach 20 Min Zentrifugation bei ca. 820 xg (20 °C, ohne Bremse) wurden die in der Interphase angereicherten Lymphozyten und Monozyten/Makrophagen abgenommen, 2 x mit PBS (5 Min bei 300 xg und 20 °C) gewaschen und anschließend in Kulturmedium mit 10 % FKS aufgenommen.

2.1.2 Bestimmung der Zellzahl und Zellvitalität

Zur Bestimmung der Zellzahl und der Vitalität der Zellen wurden 20 µl der Zellsuspension mit Eosin resuspendiert. Durch die Membranschädigung bei toten Zellen kann Eosin in die Zelle eindringen und dadurch anfärben. Die Zahl der toten bzw. vitalen Zellen wurde in Neubauer Zählkammern bestimmt. Die Zellkonzentration ergab sich aus der Multiplikation von Zellzahl, Kammerfaktor (10^4) und Verdünnungsfaktor.

2.1.3 Trennung von Monozyten und Lymphozyten mittels Adhärenz

Die Eigenschaft von Monozyten/Makrophagen an Glas- oder Plastikoberflächen zu adhären, ermöglicht die Trennung von Monozyten/Makrophagen (adhärente Zellen) von nicht adhärenen Lymphozyten. Maximal 100×10^6 PBMC wurden in 25 ml Kulturmedium mit 10 % FKS aufgenommen und in einer 250 ml Kulturflasche (liegend) für 1 Std bei 37 °C im Brutschrank inkubiert. Nicht adhärente Lymphozyten wurden mit dem Überstand abpipettiert. Die adhärenen Monozyten/Makrophagen konnten durch Ablösen mit kaltem PBS zurückgewonnen werden.

2.1.4 Trennung von T- und B-Zellen

Humane T-Zellen exprimieren den CD2-Rezeptor, der spezifisch an das T11TS-Molekül auf Schaferythrozyten (sheep red blood cell, SRBC) bindet. Dadurch bilden T-Zellen mit den SRBC's Rosetten, die aufgrund ihrer höheren Dichte über Dichtezentrifugation von den restlichen Lymphozyten (B-Lymphozyten, Monozyten) getrennt werden können.

2.1.5 Herstellung von Neuraminidase behandelten Schaferythrozyten

20 ml Schafblut (zur Konservierung 1:2 mit Alsever-Lösung verdünnt) wurde 3 x mit PBS je 5 Min ca. 820 xg (20 °C, ohne Bremse) gewaschen, wobei jeweils der lymphozytenreiche Ring

auf den Erythrozyten abgesaugt wurde. Anschließend wurde das Erythrozytenpellet in 20 ml Kulturmedium mit 10 % FKS aufgenommen und nach Zugabe von 0,5 ml Test-Neuraminidase für 30 Min bei 37°C im Wasserbad inkubiert. Nach der Inkubation wurden die Erythrozyten erneut 3 x mit PBS gewaschen und ausgehend vom Volumen des Pellets mit Kulturmedium (10 % FKS) eine 10 %ige Schafererythrozyten-Suspension hergestellt.

2.1.6 Durchführung der Rosettierung

Für die Erythrozyten (E)-Rosettierung wurden je 3 ml einer Lymphozyten-Suspension (in Kulturmedium mit 10 % FKS) mit 1 ml einer 10 %igen Schafererythrozyten-Suspension vermischt (max. 40×10^6 PBMC/1 ml Schafererythrozyten) und dann über 3 ml Ficoll-Hypaque geschichtet (10 ml Röhrchen). Nach 20-minütiger Zentrifugation bei ca. 820 xg (20 °C, ohne Bremse) wurden die nicht rosettierenden Zellen (E⁻-Zellen = B-Zellen und Monozyten) an der Phasengrenze abgenommen und 2 x mit Kulturmedium mit 5 % FKS gewaschen (300 xg, 5 Min, 20 °C). Das Pellet mit den rosettierten Zellen (E⁺-Zellen = T-Zellen und NK-Zellen) wurde mit 0,5-1 ml einer Tris-gepufferten NH₄Cl-Lösung resuspendiert. Durch die NH₄Cl-Lösung wurden die Schafererythrozyten lysiert. Die rosettierten Zellen wurden 2 x mit Kulturmedium mit 5 % FKS gewaschen (300 xg, 5 Min, 20 °C) und anschließend ebenso wie die nicht rosettierten Zellen in Kulturmedium mit 10 % FKS aufgenommen.

2.1.7 Kryokonservierung von Zellen

Vitale Zellen können in flüssigem Stickstoff kryokonserviert werden. Mittels DMSO, welches in die Zellen diffundiert, wird die Kristallbildung beim Einfrieren und somit die Zerstörung der Zell-Membran verhindert. Da DMSO bei Raumtemperatur toxisch ist, erfolgte die Vorbereitung bei 4 °C (auf Eis). Hierbei wurden die Zellen (5 Min, 340 xg, bei 20 °C) abzentrifugiert und maximal 30×10^6 Zellen in 1 ml kaltem Einfriermedium (Kulturmedium mit 20 % FKS und 10 % DMSO) aufgenommen und auf Eis in jeweils 1 ml Kryoröhrchen pipettiert. Die Zellen wurden dann zunächst über Nacht bei -70 °C eingefroren und anschließend in flüssigen Stickstoff (-196 °C) umgelagert. Wenn die Zellen wieder in Kultur genommen werden sollten, wurden diese im Wasserbad (bei 37 °C) aufgetaut. Die Zellsuspension wurde möglichst schnell in ein 15 ml Röhrchen überführt und vorsichtig mit 10 ml Kulturmedium mit 5 % FKS versetzt. Nach 2-maligem Waschen (5 Min, 340 xg, bei 20 °C) wurden die Zellzahl und die Zellvitalität bestimmt.

2.1.8 Proliferationstest (³H-Thymidin-Einbau)

Die relative Proliferation einer Zellkultur kann durch den Einbau eines radioaktiv markierten Nukleotids, z. B. Methyl-³H-Thymidin, bestimmt werden. Dieser β-Strahler wird statt des zellulären Desoxythymidins während der S-Phase der Mitose in die DNA eingebaut. Jeweils

1 μCi des markierten Thymidins wurde zu der Mikrokultur gegeben und für weitere 5-6 Std bei 37 °C inkubiert. Die Einbauzeit wurde durch Absaugen der Kulturen über Filterplättchen mit einem Cell Harvester von Berthold abgebrochen (alternativ wurden die Kulturen bei -20 °C eingefroren). Die getrockneten Filter wurden mit dem Automatic Filter Counting System ausgewertet. Die Impulse/Min stellen ein relatives Maß der Zellproliferation dar.

2.2 Methoden zur Durchflusszytometrie

Mithilfe der Durchflusszytometrie können spezifisch gefärbte Zellen identifiziert und deren Anteil in einer Zellpopulation bestimmt werden. Die für die Färbung der Zellen verwendeten Methoden werden in den folgenden Kapiteln beschrieben.

Im Durchflusszytometer wird mittels einer Kapillare ein Strom einzelner Zellen erzeugt, der an einem Laserstrahl vorbeigeführt wird. Eine Reihe von Fotodetektoren messen die von den Zellen verursachte Lichtstreuung und die Emissionen der verschiedenen Fluoreszenzfarbstoffe. Diese Informationen werden von einem Rechner analysiert und können grafisch dargestellt werden. Je nach Gerät, entscheidend sind hier der oder die verwendeten Laser, können heute bis zu fünf verschiedene Farbstoffe analysiert werden. Die Analyse des von dem jeweiligen Farbstoff emittierten Lichts erlaubt neben einer Quantifizierung der Zellpopulationen untereinander auch eine relative Aussage über die Menge des von der Zelle gebundenen Farbstoffs. Eine solche Analyse erlaubt beispielsweise Aussagen über den Grad der Expression eines Antigens. Größe und Granularität jeder Zelle werden über das Streulicht ermittelt.

2.2.1 Ein- bzw. Zweifarben-Immunfluoreszenz

Die Immunfluoreszenz wurde zur Phänotypisierung von Linien bzw. Klonen eingesetzt.

Alle Markierungsschritte fanden bei 4 °C statt. Die eingesetzten Reagenzien hatten ebenfalls eine Temperatur von 4 °C. Zwischen jedem Markierungsschritt wurden die Zellen 2 x mit 100 μl Wasch-Puffer bei ca. 180 xg für 5 Min zentrifugiert. Zur Markierung wurden 5-15 x 10⁴ Zellen in einer Spitzbodenplatte (Nerbe) pipettiert und nach 2-maligem Waschen mit 5 μl Antikörperverdünnung für 25 Min bei 4 °C inkubiert. Nach dem Waschen wurden die Zellen in 100 μl Fixier-Puffer (1 % PFA/PBS) aufgenommen oder indirekt mit einem zweiten Fluoreszenzfarbstoff markierten Antikörper bei unkonjugierten Erstantikörpern bzw. mit Streptavidin-PE (SA-PE) im Falle von biotinylierten Erstantikörpern gefärbt.

Zur Phänotypisierung der Linien bzw. Klone wurden die Zellen mit FITC- oder PE-konjugierten monoklonalen Antikörpern gegen CD2 [Leu5b (BD, 1:5); OKT11 (10 $\mu\text{g/ml}$)], CD3 [Leu4 (BD, 1:5); OKT3 (10 $\mu\text{g/ml}$)], CD4 [Leu3a (BD, 1:5); OKT4 (10 $\mu\text{g/ml}$)], CD8 [Leu2a (BD, 1:5); OKT8 (10 $\mu\text{g/ml}$)] und MHC II [L243 (20 $\mu\text{g/ml}$)] gefärbt. Für die Bestimmung von CD95 standen ein biotinylierter (Pharmingen) und ein unkonjugierter

(7C11) anti-CD95 mAk zur Verfügung, die in einem zweiten Schritt mit SA-PE [BD (1:5)] bzw. Ziege-anti-Maus- IgG + IgM FITC [Medac (1:60)] markiert wurden.

2.2.2 Kompetitive Immunfluoreszenz

Mittels kompetitiver Immunfluoreszenz lassen sich einzelne Antigen-Spezifitäten in den verschiedenen ATG-Präparaten nachweisen. Hierfür wurden in dieser Arbeit primär fluoreszenz-markierte, monoklonale Antikörper (mAk) von Becton-Dickinson verwendet. Der Versuchsansatz erfolgt analog den Markierungsschritten, wie sie im Kapitel 2.2.2 beschrieben sind. Geeignete Zellen (PBMC oder Zell-Linien, die das entsprechende Antigen exprimieren) werden mit verschiedenen Konzentrationen einer ATG-Verdünnung (20 µl) für 25 Min bei 4 °C inkubiert. Nach 2-maligem Waschen wird zur Kompetition der ATG-Antigen-Bindung eine konstante Konzentration eines primär fluoreszenz-markierten mAks hinzugegeben. Die in Abhängigkeit der ATG-Konzentration schwächer werdende Fluoreszenzintensität dient als Nachweis der Kompetition und kann am Durchflusszytometer gemessen werden.

2.2.3 Propidiumiodid-Färbung (PI)

Diese Färbung dient zum Nachweis toter Zellen. Durch Auflösung der Membranintegrität bei sterbenden oder toten Zellen kann PI in die Zelle eindringen und in der Kern-DNA interkalieren.

Der Ansatz erfolgte in 96er Rundbodenplatten mit $10\text{-}15 \times 10^4$ Zellen/Vertiefung. Nach Zugabe von serumhaltigem Kulturmedium mit und ohne Stimulus wurden die Zellen zwischen 18 und 22 Std bei 37 °C inkubiert. Die Zellen wurden dann in 96er Spitzbodenplatten überführt und 1 x mit PBS gewaschen. Anschließend wurden sie in 50-100 µl PBS mit 2 µg/ml PI aufgenommen und für weitere 10-15 Min bei Raumtemperatur inkubiert. Die PI-Aufnahme wurde dann im Durchflusszytometer anhand der Rotfluoreszenz bestimmt. Die Häufigkeitsverteilung von lebenden und toten Zellen wurde prozentual bestimmt, wobei die Population der kleineren, noch PI-negativen Zellen zu den toten PI-positiven addiert wurde. In Vorarbeiten war gezeigt worden, dass diese Zellschrumpfung unter Beibehaltung der Membranundurchlässigkeit für PI frühe apoptotische Zellen auszeichnet.

2.2.4 SCDA (standard cell dilution analysis)

Im Unterschied zum ^3H -Thymidineinbau ist es mittels der in unserem Labor entwickelten Standardzellverdünnungsanalyse (standard cell dilution analysis, SCDA) (Pechhold K et al., 1994) möglich, in einem heterogenen Zellgemisch die Absolutzellzahl einer oder zweier Zellpopulationen zu bestimmen. Zur Bestimmung von T-Zellen wurden kultivierte Zellen mit anti-CD3 mAk (Leu4), anti-CD4 mAk (Leu3a) oder anti-CD8 mAk (Leu2a) für 25 Min auf Eis

inkubiert. Nach 1-maligem Waschen mit 150 µl Wasch-Puffer (PBS mit 1 % BSA und 0,01 % NaN_3) wurden die Zellen in Wasch-Puffer mit einer konstanten Menge von fixierten, FITC⁺-Standardzellen (meist 10^5 Zellen/ml) und 0,2 µg/ml PI durchflusszytometrisch analysiert. Als Standardzellen wurden PHA-aktivierte T-Zellen verwendet, die zuvor mit FITC-konjugiertem anti-HLA Klasse I mAk W6/32 markiert in PBS 1 % PFA fixiert worden waren. Zum Ausschluss von toten Zellen, die sich möglicherweise während der Kultivierung ansammeln, wurde Propidiumiodid eingesetzt.

Formel zur Berechnung der Absolutzellzahl:

$(\% \text{ positive Zellen} / \% \text{ Standardzellen}) \times \text{definierte Standardzellzahl} = \text{Absolutzellzahl}$

2.2.5 DNA-Analyse (Methanol-Fixierung)

Durch Lyse der zu untersuchenden Zellen und anschließender Färbung mit einer hohen PI-Konzentration ist es möglich, durchflusszytometrische Kerne mit hypodiploidem, diploidem oder hyperdiploidem DNA-Gehalt zu bestimmen. Diese Methode bietet eine Alternative zum Agarose-Gel, um eine größere Anzahl von Proben auf DNA-Fragmentierung hin zu untersuchen.

Die DNA-Fragmentation wurde nach einer über Nacht-Inkubation in Ab- bzw. Anwesenheit von entsprechenden Stimuli untersucht. Von der 1 ml Zellkultur wurden 200 µl in ein 1,5 ml Eppendorfgefäß pipettiert und nach Zugabe von 400 µl eiskaltem Methanol in einem Vortex Mixer verrührt. Nach wenigstens 1 Std Fixierung wurden die Zellen bei ca. 300 xg für 5 Min pelletiert und in 100 µl Lyse-Puffer [100 µg/l PI, 0,1 % (v/v) Triton X-100, 100 µM EDTA] aufgenommen. Nach Zugabe von 100 µl DNase-freier RNase (200 U/ml) verblieben die Proben 30 Min bei Raumtemperatur im Dunkeln und wurden anschließend im FACScan analysiert.

2.2.6 FITC-Markierung

Die Konjugation von Antikörpern mit Isothiocyanatderivaten von Fluorescein erfolgt durch einen nukleophilen Angriff der unprotonierten ε-Aminogruppe der Lysine mit dem Fluorochrom. Eine optimale Kopplung erfolgt bei pH 9,5.

Zur Durchführung wurde der Antikörper über 1-2 Tage mit 2-3 Pufferwechsel gegen Kopplungs-Puffer dialysiert. Um eine Hydrolyse des Fluorochroms zu verringern, wurde es zunächst auf Raumtemperatur erwärmt und möglichst schnell in DMSO (10 mg/ml) gelöst. Zu 1 ml mAk (1 mg/ml) wurden 10 µl FITC gegeben und für 2-3 Std auf einem Schüttler im Dunkeln inkubiert. Zum Entfernen der freien FITC-Moleküle folgte eine Dialyse gegen PBS. Nach Sterilfiltration wurde der Antikörper auf 0,3-0,5 mg/ml eingestellt und bei -70 °C gelagert.

Die Bestimmung des FITC/Protein-Quotienten erfolgte mittels der unten gezeigten Formel. Dabei gibt der Quotient das molare Verhältnis von FITC (F) zum Protein (P) an. Der F/P-Quotient eines Konjugates wird durch die Extinktionsbestimmung bei 280 nm und 495 nm ermittelt und sollte bei direkt markierten Antikörpern zwischen 4 und 6 liegen.

$$\text{F/P-Quotient} = (2,87 \times \text{OD}_{495\text{nm}}) / (\text{OD}_{280\text{nm}} - 0,35 \times \text{OD}_{495\text{nm}})$$

2.3 Proteinbiochemische Methoden

2.3.1 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Die SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) wurde in modifizierter Form nach U. K. Laemmli (1970) durchgeführt. Dabei werden Proteine in einer inerten Matrix nach ihrem Molekulargewicht und unabhängig von ihrer Ladung im elektrischen Feld getrennt. Durch das stark negativ geladene Detergens Natriumdodecylsulfat (SDS), das an hydrophobe Regionen der Proteinmoleküle bindet, entfalten sich diese in gestreckte Polypeptidketten und bekommen eine einheitlich negative Ladung. Die Zugabe von β -Mercaptoethanol reduziert die Disulfidbrücken und ermöglicht so eine Analyse der Proteinuntereinheiten.

Für die Analyse wurden Gesamt-Zell-Lysate von $1-1,5 \times 10^6$ Zellen eingesetzt. Vor der Stimulation wurden die Zellen entsprechend in Kulturmedium mit 2 % FKS eingestellt und nach dem Pelletieren in einer Eppendorfszentrifuge mit 50 μ l einer 37 °C warmen Antikörperlösung für eine definierte Zeit (1-10 Min) inkubiert. Im Falle von IgG-Antikörpern, wie OKT3 und BMA031 (jeweils 2 μ g/ml), wurde der kreuzvernetzende Kaninchen-anti-Maus Ak (RaM, 1 μ g/ml) zugegeben, der ebenfalls als Kontrolle diente. IgM-Antikörper, wie der anti-CD95 (7C11, 2 μ g/ml), wurden ohne RaM eingesetzt. Die Inkubation wurde durch Zugabe von 1 ml kalten PBS gestoppt. Nach sofortiger Zentrifugation wurde das Pellet in 30 μ l Lyse-Puffer aufgenommen und für wenigstens 15 Min auf Eis inkubiert, bevor das Lysat bei 17300 xg für 7 Min in einer 4 °C Kühlzentrifuge pelletiert wurde. Der Überstand wurde abgenommen und mit 30 μ l reduzierendem Proben-Puffer vermischt, für 5 Min gekocht und nach dem Abkühlen in die Taschen des Gels überführt. Zusätzlich wurde pro Gel ein Molekulargewichtsstandard aufgetragen. Die Elektrophorese erfolgte bei 120 V (Sammelgel) und ca. 4 Std bei 160 V (Trenngel) bzw. über Nacht bei 45 V. Nach der Elektrophorese wurde das Gel mit H₂O gespült und für den Western-Blot vorbereitet.

2.3.2 Färbung von Proteinen in Polyacrylamidgelen

Coomassie Brilliant Blue dient zur Detektion von Proteinen in Agarose- und Polyacrylamidgelen. Die Gele wurden hierzu für mindestens 1 Std mit Färbelösung inkubiert und die Gelmatrix danach entfärbt. Die Silberfärbung stellt eine wesentlich sensitivere Methode zum Nachweis von Proteinen (aber auch DNA und RNA) in Polyacrylamidgelen

dar. Die Polyacrylamidgele wurden für 1 Std in Silberfärbung-Fixierlösung fixiert, dann 3 x 20 Min mit 50 % Ethanol gewaschen, 1 Min mit Imprägnierlösung inkubiert, 3 x mit ddH_2O gespült und 20 Min in Silbernitratlösung inkubiert. Nach 3-maligem Waschen mit ddH_2O wurde Reduktionslösung zugegeben, die einsetzende Reaktion bei ausreichender Färbung mit 50 % Methanol/12 % Eisessig abgestoppt, mit 50 % Methanol gewaschen und schließlich für 30 Min mit der Konservierlösung inkubiert. Beide Färbemethoden wurde hauptsächlich zum Nachweis der Reinheit und zur Konzentrationsbestimmung aufgereinigter Fusionsproteine verwendet. Die Gele wurden zur Dokumentation nach der Färbung in verschiedenen Gelrockner-Systemen getrocknet.

2.3.3 Western-Blot-Analyse

Die Western-Blot-Analyse dient zum spezifischen Nachweis von Proteinen mittels spezifischer Antikörper (Towbin H et al., 1979). Nach Entfernen des Sammelgels wurde das Trenngel kurz in H_2O gespült und, ebenso wie die Nitrozellulose-Membran, im Transfer-Puffer equilibriert. Die Beladung der Transfer-Kassette erfolgte in folgender Weise: ein Faserpad (in Transfer-Puffer getränkt) auf die Kathodenseite (schwarz), zwei Whatman-Papiere (in Transfer-Puffer getränkt), equilibriertes Gel, Nitrozellulose-Membran, zwei Whatman-Papiere (in Transfer-Puffer getränkt), ein Faserpad (in Transfer-Puffer getränkt) zur Anodenseite (farblos). Es wurde besonders darauf geachtet, dass zwischen dem Gel und der Membran keine Luftblasen entstanden, um einen optimalen Transfer zu gewährleisten. Die fertige Transfer-Kassette wurde entsprechend der farbigen Orientierung in den Transfer-Tank eingeschoben, mit kaltem Transfer-Puffer aufgefüllt und auf einen Magnetrührer in den Kühlraum gestellt. Der Transfer (blotting) erfolgte bei 0,6 A für 2-4 Std oder bei 0,15 A über Nacht. Nach dem Transfer wurden die Proteine auf der Membran mit PonceauS angefärbt, die Standards markiert und nach der Fotodokumentation mit TBS entfärbt.

Zur Blockierung unspezifischer Bindungstellen wurde die Membran 1 Std mit 5 % BSA in TBS inkubiert. Diese und auch alle nachfolgenden Wasch- und Inkubationsschritte erfolgten auf einer Wippe bei Raumtemperatur. Anschließend wurde 1 x mit TBST gewaschen, mit der jeweiligen Primärantikörperlösung (1:2500 in TBST) für 1 Std inkubiert, 3 x 10 Min mit TBST gewaschen, 40 Min mit HRP-markiertem, Spezies spezifischem Sekundärantikörper (1:7500 in TBST) inkubiert und wiederum 3 x mit TBST gewaschen. Die Antikörper markierten Banden konnten dann mit dem ECL-Chemilumineszenz-System durch Auflegen eines Röntgenfilms sichtbar gemacht werden. Dazu wurde die Membran für 1 Min in ECL-Färbelösung inkubiert, mit Frischhaltefolie abgedeckt und die Röntgenfilme mit unterschiedlichen Expositionszeiten aufgelegt.

Um Western-Blot-Membranen für den Nachweis mit anderen spezifischen Antikörpern wiederzuverwenden, wurde der alte Antikörper von der Membran entfernt, ohne die

Membran gebundenen Proteine zu lösen. Dazu wurden die Membranen ca. 30-40 Min in der ECL-Stripping-Solution bei 55 °C in einem Schüttelwasserbad inkubiert. Vor der Markierung mit Antikörpern wurden die Membranen ausgiebig 3 x mit TBST gewaschen und erneut mit 5 % BSA blockiert.

2.3.4 Biotinylierung von Zelloberflächenmolekülen

Durch Inkubation intakter Zellen mit NHS-Biotin werden Zelloberflächenantigene über eine primäre Amidbindung an Biotin gekoppelt und können dann nachfolgend über die hochaffine Biotin/Streptavidin-Interaktion nachgewiesen werden. Für die Biotinylierungsreaktion wurden je Ansatz 200×10^6 Jurkat-Zellen 3 x mit PBS gründlich gewaschen und für 20 Min mit 0,5 mg/ml Biotin in PBS (bei 50×10^6 Zellen/mg NHS-Biotin) bei RT inkubiert. Danach wurden die Zellen 1 x in RPMI-Medium (ohne FKS) und 2 x in PBS gewaschen und in 1 % Brij-Lyse-Puffer lysiert. Die filtrierten Lysate (Filter: 0,45 µm) wurden dann für Immunpräzipitationen eingesetzt. Die präzipitierten Proteine wurden mittels SDS-PAGE aufgetrennt und auf Nitrozellulose transferiert. Der Nachweis von präzipitierten, biotinylierten Oberflächenmolekülen erfolgte im Western-Blot nach Blockieren der Membran durch Inkubation mit Streptavidin/HRP (1:1500 in TBST).

2.3.5 Immunpräzipitation

Proteine aus dem Zell-Lysat können mit spezifischen Antikörpern gebunden und die entstehenden Immun-Komplexe über den F_c-Anteil von IgG-Antikörpern über Protein A-/Protein G-gekoppelte Sepharose-Beads präzipitiert werden. Protein A und Protein G haben ähnliche Bindungseigenschaften für Immunglobuline, unterscheiden sich jedoch in ihrer Bindungseffizienz je nach Isotyp und Spezies (Tab. 4). Für die in der Immunpräzipitation verwendeten Antikörper wurde die optimale Bindungseffizienz ausgetestet.

Tab. 4: Relative Bindungsstärke von Immunglobulinen an Protein A und Protein G

nach Angaben von Pharmacia, Freiburg

- ++ starke Bindungseffektivität
- + mittlere Bindungseffektivität
- keine Bindungseffektivität

Spezies	Protein G	Protein A
hu IgG ₁ , hu IgG ₂ , hu IgG ₄	++	++
hu IgG ₃	++	-
Kaninchen IgG	++	++
Ziege	++	-
Maus IgG	+	+
Maus IgG ₁	++	+

Zur Präzipitation wurden 2-5 µg des entsprechenden Antikörpers mit 60 µl gewaschenen 50 % (v/v in Lyse-Puffer für Zellen) Protein A-, Protein G- (oder gemischten) Sepharose CL-4B-Beads sowie mit Zell-Lysat und mit 1 mg BSA (zur Blockierung unspezifischer Bindungsstellen) für mindestens 1,5 Std bei 4 °C auf dem Rotator inkubiert und danach 3 x in Lyse-Puffer gewaschen. Alternativ wurden die Lysate unstimulierter Zellen mit

Staphylococcus aureus-Konzentrat (Pansorbin) für 30 Min vorinkubiert, um unspezifische Bindungen herauszufiltern. Die Elution der Proteine von den Beads erfolgte durch Erhitzen (5 Min, 100 °C) in reduzierendem SDS-PAGE-Proben-Puffer.

2.3.6 Kinase-Assay

Kinasen, die mit Antikörpern oder Fusionsproteinen präzipitiert bzw. kopräzipitiert werden, behalten ihre enzymatische Aktivität bei. Bei Inkubation derartiger Präzipitate *in vitro* mit radioaktiv markiertem γ -³²P-ATP kann die Autophosphorylierung der Kinasen sowie die Phosphorylierung von weiteren präzipitierten Substraten nach der Auftrennung im SDS-PAGE autoradiografisch festgestellt werden. Zunächst wurden Präzipitationen, wie oben beschrieben, durchgeführt. Hierbei wurde jedoch im Lyse-Puffer auf EDTA verzichtet, da die Aktivität von Kinasen Kationen abhängig ist. Beladene Beads wurden zuletzt 1 x in Kinase-Puffer gewaschen. Die Inkubation mit γ -³²P-ATP (5 μ Ci, in 30 μ l Kinase-Puffer) erfolgte für 10 Min bei RT. Die Beads wurden sedimentiert und der radioaktive Überstand mit einer 27G-Nadel abgesaugt. Die Proben wurden dann mit 60 μ l SDS-PAGE-Proben-Puffer 5 Min gekocht. Die Auftrennung der präzipitierten Proteine erfolgte mittels SDS-PAGE. Von den getrockneten Gelen wurden anschließend Autoradiogramme angefertigt.

IV ERGEBNISSE

Die Untersuchungen der vorliegenden Arbeit wurden mit fünf verschiedenen kommerziell erhältlichen Produkten durchgeführt, die im Wesentlichen aus der Immunglobulin- (Ig) G Fraktion bestehen. Die Aufreinigung der Immunglobulinfraktion erfolgte nach Immunisierung der Tiere mittels Präzipitation, Ionenaustauschchromatografie, Dialyse und Filtration (Angaben der Hersteller, Fachinformation). Drei der fünf Produkte werden aus Kaninchen gewonnen und zwei aus dem Pferd. Für die Immunisierung der Tiere werden humane juvenile Thymozyten verwendet, außer bei einem ATG aus Kaninchen, wo eine humane T-Zell-Linie (Jurkat) zur Immunisierung eingesetzt wird.

1 Zellbiologische Charakterisierung von ATG

Grundsätzlich können wenigstens zwei Mechanismen zur Wirkung der ATG beitragen: (1) Durch die Bindung an korrespondierende Oberflächenantigene können funktionell wichtige Zelloberflächenmoleküle blockiert werden; (2) ATG können direkt funktionelle Effekte ausüben, z. B. die Aktivierung der F_c -Rezeptor-abhängigen Zytotoxizität oder die Fas/CD95-abhängige Apoptose. Ausgehend von diesen grundsätzlichen Mechanismen und einschließlich der in der Einleitung vorgestellten Wirkmechanismen wird deutlich, dass der T-Lymphozyt im Mittelpunkt der Diskussion über die Wirksamkeit der ATG steht. Für die Wirksamkeitsprüfung von ATG ergeben sich daraus zwei wesentliche Punkte, nämlich die Charakterisierung der spezifischen Bindung an T-Lymphozyten und deren mögliche funktionelle Relevanz im Hinblick auf die Aktivierung und/oder Apoptose von T-Zellen sowie die funktionelle Bedeutung des F_c -Teil der in ATG enthaltenen Immunglobuline.

1.1 Die Bindung von ATG an humane Lymphozyten

Frisch isolierte PBMC (peripheral blood mononuclear cells) wurden mit steigenden Konzentrationen von ATG inkubiert. Die Bindung an humane Lymphozyten wurde nach der Färbung mit einem FITCkonjugierten Sekundärantikörper in der indirekten Immunfluoreszenz durchflusszytometrisch untersucht. Diese Bindung ist konzentrationsabhängig. Der Kurvenverlauf der Fluoreszenzintensität erinnert an eine klassische Präzipitationskurve, wie der nach M. Heidelberger und F. E. Kendall (1935), wobei das Maximum der Fluoreszenzintensität für die verschiedenen ATG im Konzentrationsbereich von 100-1000 $\mu\text{g/ml}$ liegt. Eine sinnvolle Reihenfolge der ATG in Bezug auf die Konzentration bei maximaler Fluoreszenzintensität lässt sich nicht aufstellen, da diese auch vom Sekundärantikörper abhängig ist. Als Beispiel lassen sich folgende Konzentrationen

angeben, die dem Versuchsansatz entsprechen, der in Abb. 2 dargestellt ist: ATG 1 (400 µg/ml), ATG 2 (95 µg/ml), ATG 3 (700 µg/ml), ATG 4 (1000 µg/ml) und ATG 5 (650 µg/ml).

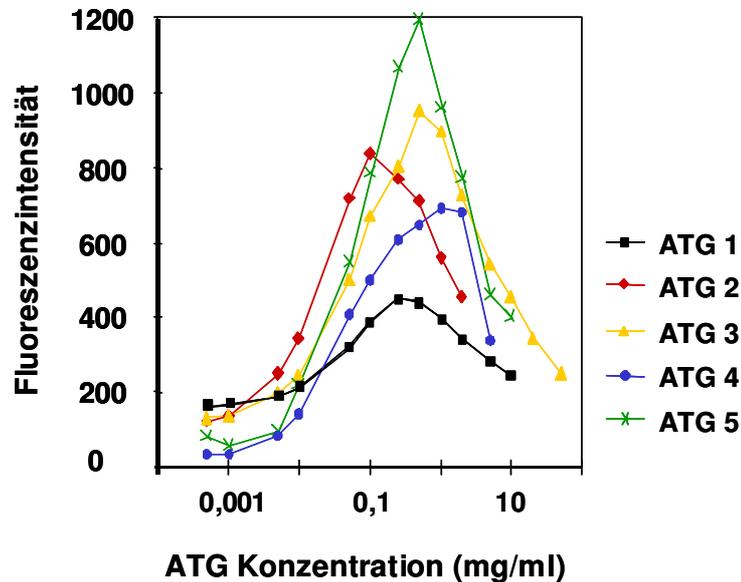


Abb. 2: Indirekte Immunfluoreszenz

Frisch isolierte PBMC wurden mit steigenden Konzentrationen fünf verschiedener ATG inkubiert und das gebundene ATG anschließend mit einem zweiten FITC-markierten Antikörper dargestellt. Die Fluoreszenzintensität wurde am Durchflusszytometer gemessen.

Sowohl die „Gittertheorie“ als auch das „Zwei-Stufen-Modell“ der Immunpräzipitation (Klein J, 1991) eignen sich nicht, den Verlauf der Fluoreszenzintensität nach ATG-Inkubation und indirekter Immunfluoreszenz zu erklären. Man muss aber davon ausgehen, dass sich mit steigender ATG-Konzentration Antigen-Antikörper und/oder Antikörper-Antikörper-Komplexe bilden, die aufgrund von sterischen Behinderungen oder durch Fluoreszenzlöschung eine Abnahme der Fluoreszenzintensität verursachen.

Diese Methode ist geeignet, die spezifische Bindung von ATG an frisch isolierten PBMC darzustellen, womit jedoch nur einer der oben erwähnten, für die Wirksamkeit von ATG entscheidenden Punkte, abgedeckt ist. Der angegebene Konzentrationsbereich umfasst die ATG-Konzentrationen, die eine Reihe von biologischen Aktivitäten *in vitro* induzieren, wie etwa Apoptose oder Proliferation ruhender Zellen.

1.2 Komplement-abhängige Zytotoxizität von ATG

Mit einem komplement-abhängigen Lymphozyttoxizitätstest lassen sich *in vitro* zum einen die spezifische Bindung an Zielzellen, den Lymphozyten, und zum anderen auch die Funktionalität des F_c-Teils der Immunglobuline überprüfen. Einer der beiden bereits

existierenden *in vitro* Methoden basiert auf dem Prinzip der komplement-abhängigen Zytotoxizität. In einer neueren und verbesserten Variante lässt sich dieser Test, anstatt im Mikroskop, im Durchflusszytometer auswerten. Dies hat den Vorteil, dass eine viel größere Anzahl von Zellen gemessen werden kann und die Beurteilung der Zellen nicht mehr einem subjektiven Urteil unterliegt. Abb. 3 zeigt einen typischen Verlauf der Dosis-Wirkung von zwei Kaninchen-ATG (ATG 1 u. 2) im Vergleich zu zwei ATG aus dem Pferd (ATG 4 u. 5).

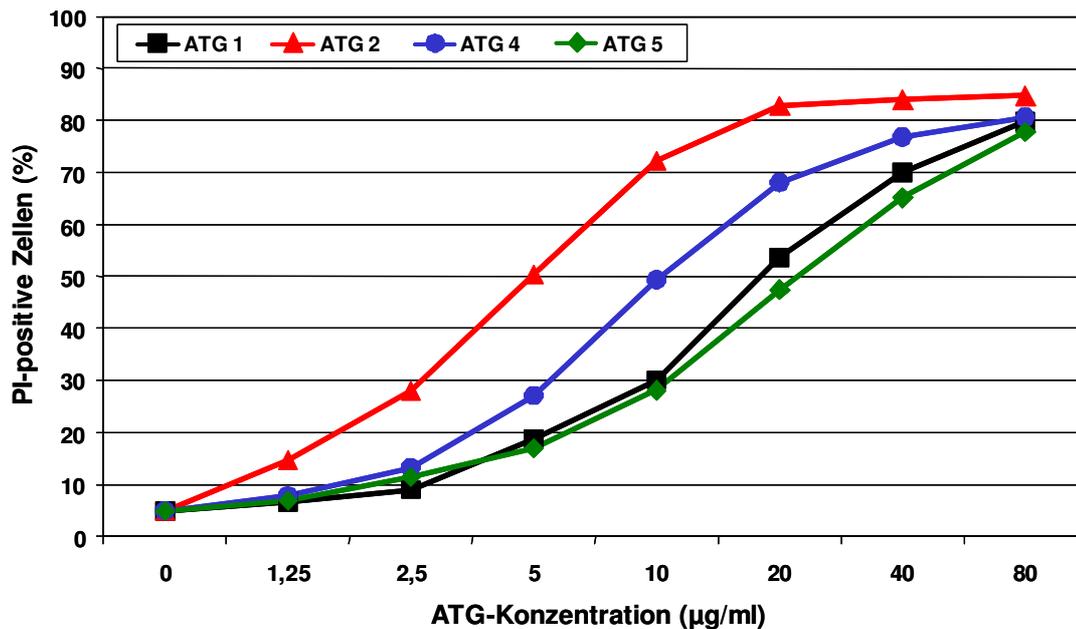


Abb. 3: Komplement-abhängige Zytotoxizität gemessen mit frisch isolierten PBMC

Frisch isolierte PBMC wurden mit steigenden Konzentrationen vier verschiedener ATG in Gegenwart von Kaninchenkomplement für 1/2 Std bei RT (Raumtemperatur) inkubiert. Je 4000 Zellen wurden am Durchflusszytometer gemessen und der Anteil (in Prozent) der Propidiumjodid-(PI)-positiven Zellen (tote Zellen) dargestellt.

Der Kurvenverlauf ist sigmoidal, womit er sich gut für die Berechnung von ED₅₀-Werten eignet. Die Seren aus beiden Spezies geben eine vergleichbare Reaktivität mit dem eingesetzten Komplement aus Kaninchen wieder. Insgesamt wurden alle fünf ATG in mindestens vier unabhängigen Tests eingesetzt. Der Konzentrationsbereich, in dem alle getesteten Produkte die ED₅₀ erreichen, liegt zwischen 2 und 20 µg/ml. Das verwendete kommerziell erhältliche Kaninchenkomplement wurde entsprechend den Herstellerangaben rekonstituiert. In diesem Test zeigt es bei einem Ansatzvolumen von insgesamt 200 µl mit 100 000 Zellen, für Zell-Linien und T-Zell-Klone bis zu einem Anteil von 5 %, für frisch isolierte PBMC bis 12 %, keinen toxischen Effekt. Zusammen mit normalem Kaninchen- und Pferde-IgG konnte für die oben angegebene Menge an Kaninchenkomplement ebenfalls keine zytotoxische Wirkung auf die verwendeten Zellen beobachtet werden (Ergebnisse nicht

dargestellt). Im Hinblick auf die Reproduzierbarkeit und die Anwendung in Routinelabors ist es sinnvoll, kommerziell erhältliches Kaninchenkomplement zu verwenden, auch wenn im Vergleich mit humanem Komplement die gemessene Reaktivität der ATG mit Kaninchenkomplement deutlich höher ist, sodass aus dieser Reaktivität keine direkten Rückschlüsse auf den Grad der komplement-abhängigen Lyse als Wirkmechanismus *in vivo* gemacht werden können.

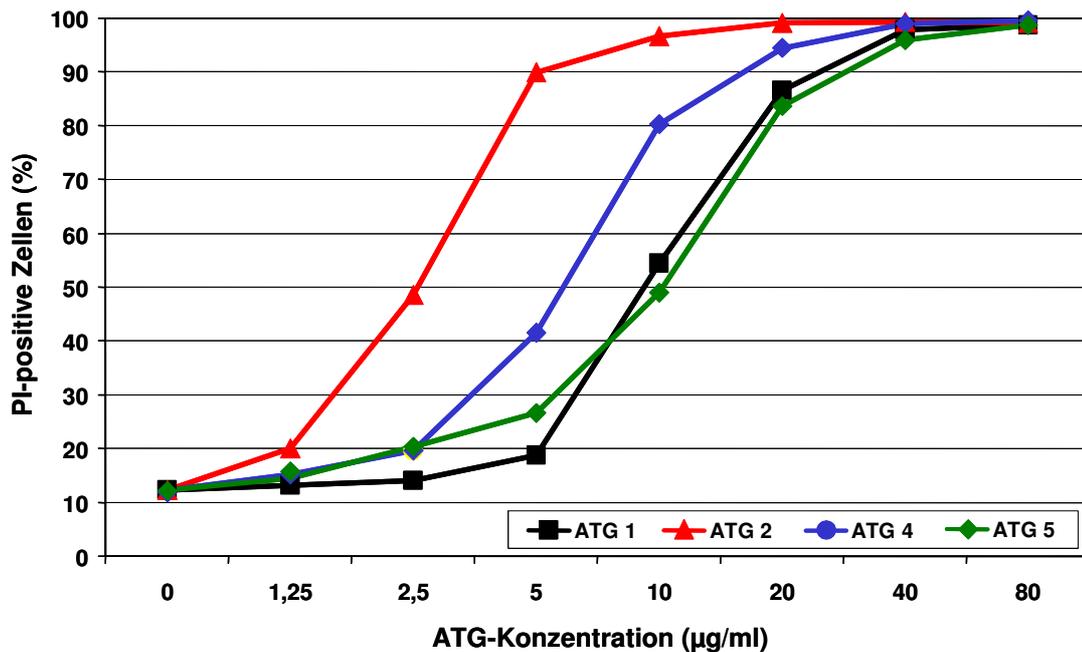


Abb. 4: Komplement-abhängige Zytotoxizität gemessen mit der T-Zell-Linie Jurkat

Zellen der T-Zell-Linie Jurkat wurden mit steigenden Konzentrationen vier verschiedener ATG in Gegenwart von Kaninchenkomplement für 1/2 Std bei RT (Raumtemperatur) inkubiert. Je 4000 Zellen wurden am Durchflusszytometer gemessen und der Anteil (in Prozent) der Propidiumjodid-(PI)-positiven Zellen (tote Zellen) dargestellt.

Neben PBMC wurden zur Darstellung der komplement-abhängigen Zytotoxizität von ATG auch Versuche mit T-Zell-Linien durchgeführt. Bei einem mit den für PBMC vergleichbaren Konzentrationsbereich gibt der sigmoidale Verlauf der Dosis/Wirkungs-Kurve einen steileren Anstieg wieder (Abb. 4). Für die Berechnung einer ED_{50} ist es wichtig nach Möglichkeit mehrere Messpunkte im linearen Bereich der Kurve zu haben um mit geeigneten statistischen Auswerteprogrammen eine möglichst genaue Schätzung von diesem Bereich der Kurve zu erhalten. Auch wenn im Vergleich zu PBMC verschiedener Spender eine Zell-Linie besser charakterisiert und standardisierbar ist und außerdem im Labor kontinuierlich verfügbar wäre, hat sich für den komplement-abhängigen Zytotoxizitätstest gezeigt, dass PBMC für die Darstellung der Dosis-Wirkungs-Beziehung besser geeignet sind.

1.3 T-Zell-Aktivierung

Die Wirkung von ATG auf die Proliferation von frisch isolierten PBMC wurde über einen mehrere log-Stufen umfassenden Konzentrationsbereich (0,001-1000 µg/ml) analysiert. Alle untersuchten ATG können T-Zellen *in vitro* stimulieren. Die Konzentration, die ein Maximum an Proliferation in ruhenden Lymphozyten induziert, liegt je nach ATG zwischen 50 und 150 µg/ml. Es handelt sich hierbei um eine Aktivierung in Gegenwart von B-Zellen und Makrophagen. Die von ATG induzierte Proliferation ist im angegebenen Konzentrationsbereich mit üblichen T-Zell-Mitogenen, wie etwa dem Phytohämagglutinin (PHA) oder dem monoklonalen Antikörper (mAk) OKT3, vergleichbar. Die Proliferation wurde mittels radioaktivem Thymidin (³H-TdR) gemessen. In Abb. 5 ist die Proliferation frisch isolierter PBMC in Abhängigkeit von der Konzentration zweier Kaninchen- (ATG 1 u. 2) und Pferde-ATG (ATG 4 u. 5) dargestellt. Je nach ATG werden Werte von 8000-14.600 cpm (counts per minute) erreicht. Zum Vergleich: Mit dem Standardmitogen Phytohämagglutinin (PHA) wurden knapp 14.000 cpm und mit dem monoklonalen Ak OKT3 (ohne Kreuzvernetzung mittels zweitem Ak) 9000 cpm gemessen.

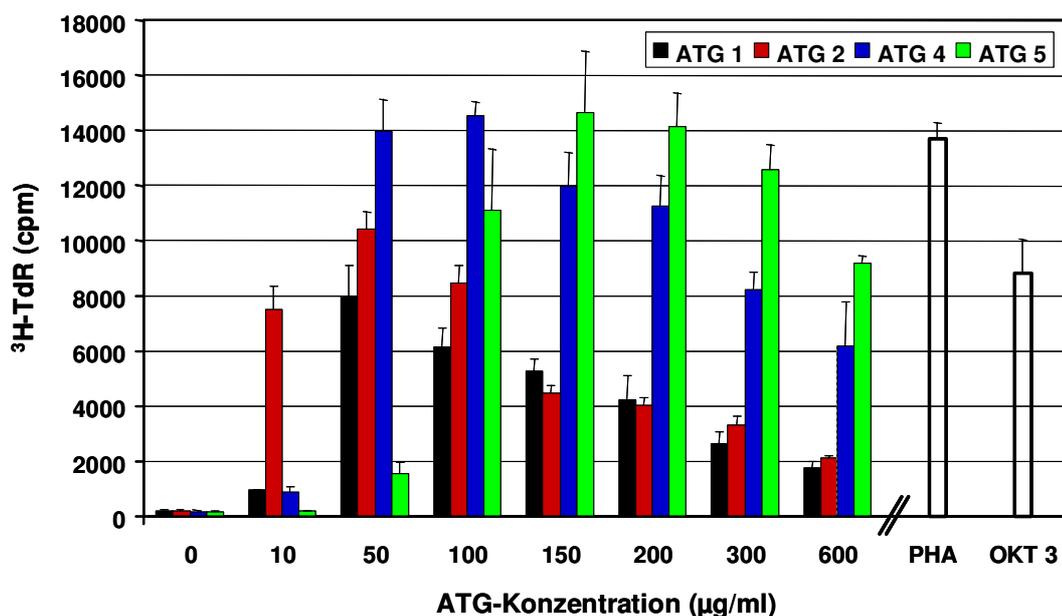


Abb. 5: Proliferation von PBMC nach ATG-Stimulation

Die Proliferation von frisch isolierten PBMC wurde nach der Inkubation mit vier verschiedenen ATG in steigender Konzentration an Tag 3 und Tag 6 (Tag 6 nicht dargestellt) gemessen. Als Kontrolle wurden der mAk OKT3 und das Standardmitogen PHA eingesetzt. Dargestellt sind der Mittelwert und die Standardabweichung von Dreifachbestimmungen eines repräsentativen Experiments (n = 4).

Die verschiedenen ATG unterscheiden sich in ihrer Mitogenität. Diese Unterschiede hängen jedoch stark vom jeweiligen Spender der PBMC ab. Je nach Spender variiert sowohl die Intensität der Proliferation insgesamt als auch die einzelner ATG.

Im Gegensatz zu dem mAk OKT3 oder dem Standardmitogen PHA sind ATG auch in der Lage, gereinigte T-Lymphozyten zur Proliferation anzuregen (Abb. 6). Hierfür wurden die T-Zellen mittels Schaeferythrozyten aus frischen PBMC isoliert. Die so gereinigten E⁺ Zellen (CD2⁺ Zellen) zeigten nach Inkubation mit PHA und OKT3 keine Proliferation. Wurden die E⁺ Zellen wieder mit den autologen E⁻ Zellen gemischt, war eine deutliche Proliferation, induziert durch PHA oder OKT3, wieder messbar (nicht dargestellt).

Die ATG-Konzentration, die ein Maximum an Proliferation in gereinigten E⁺ Zellen induziert, liegt je nach ATG zwischen 100 und 300 µg/ml. Im Mittel also etwas höher als die optimale Konzentration für die Proliferation in PBMC. Die dabei gemessene Radioaktivität liegt unter vergleichbaren Versuchsbedingungen (Zellzahl, ³H-TdR-Konzentration und Inkubationszeiten) für PBMC im Mittel deutlich über 10.000 cpm, für gereinigte T-Lymphozyten (E⁺ Zellen) deutlich unter 10.000 cpm. Diese Art der T-Zell-Aktivierung ist über das Molekül CD2 möglich, für das Spezifitäten in ATG nachweisbar sind, nicht zuletzt auch durch den bereits als *in vitro* Test eingesetzten Rosetten-Inhibitionstest, bei dem die Bindung von humanen Lymphozyten an Schaeferythrozyten durch ATG spezifisch inhibiert wird. Es ist aber auch denkbar, dass co-stimulatorische Signale durch Spezifitäten, die z.B. gegen das Molekül CD28 gerichtet sind, von den ATG selbst ausgelöst werden.

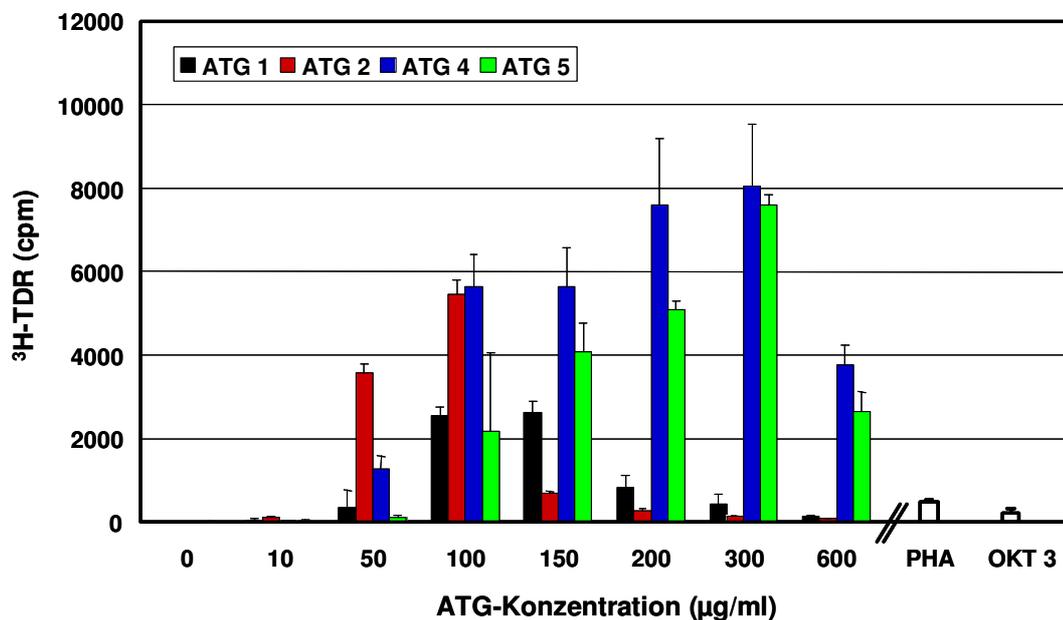


Abb. 6: Proliferation gereinigter T-Lymphozyten nach ATG-Stimulation

Die Proliferation gereinigter T-Lymphozyten wurde nach der Inkubation mit vier verschiedenen ATG in steigender Konzentration an Tag 3 und 6 gemessen (Tag 3 ist nicht dargestellt). Als Kontrolle wurden der mAk OKT3 und das Standardmitogen PHA eingesetzt. Dargestellt sind der Mittelwert und die Standardabweichung von Dreifachbestimmungen eines repräsentativen Experiments (n = 4).

Alle ATG stimulieren die T-Lymphozyten-Proliferation *in vitro*. Inwieweit diese Eigenschaft jedoch mit ihrer klinischen Wirksamkeit korreliert, ist schwer zu sagen. Des Weiteren ist die Variabilität dieser Proliferations-Assays sehr groß, da man auf frisch isolierte Lymphozyten aus dem peripheren Blut angewiesen ist, die von Spender zu Spender starke Unterschiede in ihrer Reaktivität aufweisen. Neben der dargestellten radioaktiven Methode ist es prinzipiell möglich, auch auf nicht radioaktive Alternativen, wie etwa den MTT-Test, auszuweichen (Versuche nicht dargestellt). Der Test beruht auf dem Nachweis der Bildung von Formazan aus Methyltetrazolium (MTT) (Mosmann T, 1983).

1.4 Protein-Tyrosin-Phosphorylierung

Ein sehr frühes intrazelluläres Ereignis bei der Aktivierung von Lymphozyten ist die spezifische Protein-Tyrosin-Phosphorylierung von sog. ITAMs (immunoreceptor tyrosine-based activation motifs, Tyrosinaktivierungssequenzen von Immunrezeptoren). Um die Bedeutung einzelner Spezifitäten, die in ATG enthalten sind, für die Aktivierung von T-Lymphozyten zu untersuchen, wurde die Tyrosin-Phosphorylierung in PHA-Blasten nach Inkubation mit ATG und monoklonalen Antikörpern (anti-CD2, -CD3, -CD4 und -MHC I) mittels Western-Blot dargestellt.

Ohne Kreuzvernetzung der oben genannten mAk mit einem Zweitantikörper lassen sich nur schwache Veränderungen im Muster der Protein-Tyrosin-Phosphorylierung in PHA-Blasten erkennen. Abb. 7 zeigt, dass ATG ebenfalls keine sehr starke Veränderung der Protein-Tyrosin-Phosphorylierung gegenüber den Kontrollen induzieren. Die größte Ähnlichkeit im Bandenmuster und in der Intensität besteht zwischen der Stimulation mit ATG und dem anti-CD2 mAk. Auf der Höhe der Pfeile (a) lassen sich nach der Stimulation von CD2 eine einzelne und zwei dicht beieinander liegende Banden (Doppelbande) identifizieren, die innerhalb der Kontrolle schwächer bzw. gar nicht zu sehen sind. ATG 1 und ATG 3 induzieren das gleiche Bandenmuster, wohingegen mit ATG 4 von der Doppelbande nur die obere sichtbar ist. Nach der Stimulation mit anti-CD3 mAk zeigt sich auf der Höhe der Pfeile (a) ein den ATG und dem anti-CD2 mAk vergleichbares Bandenmuster; eine zusätzliche Bande läßt sich weiter unten nachweisen (Pfeil b). In der Kontrolle oder nach der Stimulation mit ATG ist diese Bande nicht vorhanden. Der mAk anti-MHC I gibt das deutlichste Phosphorylierungssignal wieder; neben dem Pfeil (d) sind zwei Banden zu sehen, die ausschließlich nach der Stimulation mit dem anti-MHC I mAk induziert wurden. Die Stimulation der PHA-Blasten mit dem anti-CD4 mAk lässt gegenüber den Kontrollen lediglich leicht schwächere Banden erkennen. Am deutlichsten sieht man dies an der Bande, die mit dem Pfeil (c) markiert ist. Auch diese Veränderung der Protein-Tyrosin-Phosphorylierung lässt sich nach der Inkubation mit ATG nicht feststellen.

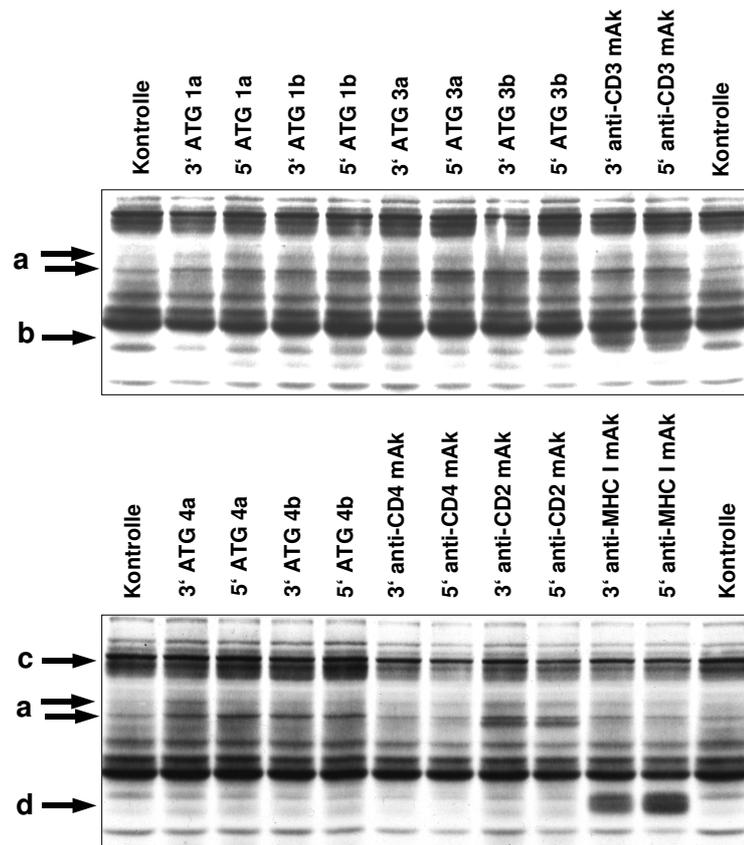


Abb. 7: Tyrosin-Phosphorylierung nach ATG-Stimulation

PHA-Blasten ($1,5 \times 10^6$ Zellen/Probe) wurden für 3 und 5 Min mit verschiedenen ATG (50 $\mu\text{g/ml}$) oder zur Kontrolle mit den mAk gegen CD2, CD3, CD4 und MHC I (je 10 $\mu\text{g/ml}$ ohne kreuzvernetzenden Zweitantikörper) stimuliert. Nach der Inkubation in der Antikörperlösung bei 37 °C wurden die Zellen in NP40 Lyse-Puffer lysiert. Nach der Trennung der Proteine durch SDS-PAGE und dem Transfer auf eine Nitrozellulose-Membran wurde mit dem anti-Phosphotyrosin mAk 4G10 gefärbt.

1.5 Einfluss von ATG auf die gemischte Lymphozyten-Kultur

Wie bereits dargestellt, sind ATG in der Lage, frisch isolierte PBMC und gereinigte E⁺ Zellen *in vitro* konzentrationsabhängig zur Proliferation zu aktivieren. Dieses Ergebnis stimmt mit der Beobachtung *in vivo* überein, wonach ATG, ebenso wie OKT3, unmittelbar nach der ersten Applikation ein sog. Aktivierungs-Syndrom auslösen. Es beruht auf dem massiven Ausstoß verschiedener Zytokine, wie TNF- α , IFN- γ und IL-6, die bereits 1 Std nach der ersten Injektion im Serum nachgewiesen werden können. Diese Nebenwirkung ist bei der Anwendung von ATG deutlich geringer ausgeprägt als bei OKT3, wobei eine definitive Erklärung hierfür noch fehlt.

Neben der Aktivierung von T-Zellen wurde von J.-P. Revillard und anderen (Revillard JP et al., 1970; Brochier J & Revillard JP, 1971; Bonnefoy-Bérard N et al., 1992 A) beschrieben, dass ATG je nach Konzentration auch in der Lage sind, eine T-Zell-Aktivierung zu inhibieren.

Die gemischte Lymphozyten-Kultur (mixed lymphocyte reaction, MLR) stellt ein einfaches *in vitro* Korrelat zur Situation nach der Transplantation von allogenen Gewebe dar. Über einen Konzentrationsbereich von 1 ng/ml-1 mg/ml konnte in unseren Versuchen jedoch kein MLR spezifisch inhibierender Effekt nachgewiesen werden (s. Abb. 8). Bei einer ATG-Konzentration von 100 µg/ml ist im autologen System die mitogene Eigenschaft von ATG zu erkennen. Bei Konzentrationen von 1 mg/ml zeigt sich eine deutliche Inhibition, die, wie im Folgenden noch dargestellt werden soll, auf einen zytotoxischen Effekt der ATG zurückgeführt werden kann.

Die MLR als *in vitro* Modell für die Transplantation eignet sich nach unseren Erfahrungen nicht zur Bewertung und Charakterisierung der Wirksamkeit von ATG.

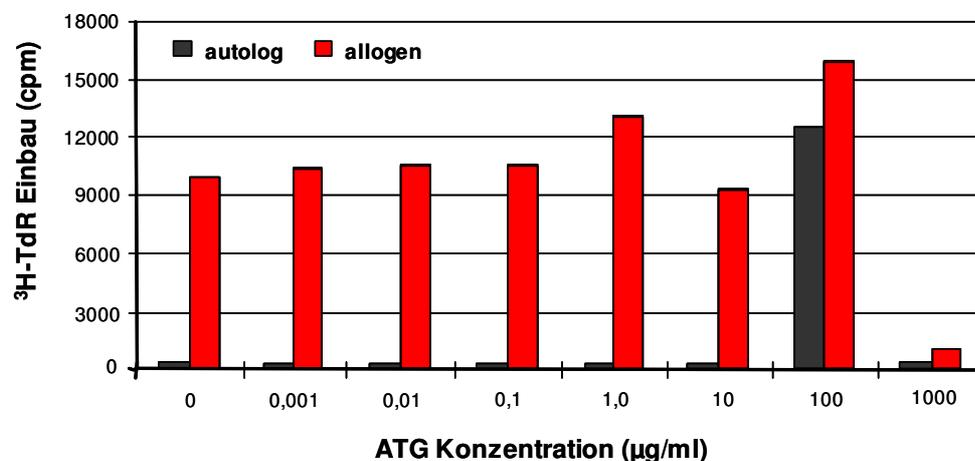


Abb. 8: ATG in der gemischten Lymphozyten-Kultur

Frisch isolierte PBMC wurden mit/ohne EBV-transformierten und bestrahlten allogenen humanen B-Lymphozyten inkubiert. Dargestellt ist ein für alle ATG-Produkte repräsentatives Ergebnis aus mindestens drei von einander unabhängigen Versuchsansätzen.

1.6 Antigen-Spezifitäten in ATG

Klinische Erfahrungen in der Anwendung von monoklonalen Antikörpern haben gezeigt, dass die immunsuppressive Wirkung nicht ausschließlich auf eine Depletion von Lymphozyten zurückzuführen sein muss, sondern durch eine gezielte Interaktion mit funktionellen Oberflächenmolekülen, wie den CD3 T-Zell-Rezeptor-Komplex, das CD2-Molekül, oder Adhäsionsmolekülen, wie CD4 und den LFA-1-Komplex, induziert werden kann (Bonney-Bérard N et al., 1991).

Im Gegensatz zu den F_c -abhängigen, zytotoxischen Mechanismen, die eine Bindung an die Zelle und einen funktionsfähigen F_c -Teil der bindenden Immunglobuline voraussetzt, ist z. B. für die Lymphozyten-Aktivierung eine spezifische Bindung an einzelne Rezeptoren nötig, durch die funktionelle Eigenschaften der Zelle induziert werden. Mit einem kompetitiven

Immunfluoreszenz-Assay (komp. IF) lassen sich einzelne Spezifitäten aufgrund der Konkurrenz zwischen Fluoreszenz markierten, monoklonalen Antikörpern und ATG am Durchflusszytometer darstellen.

Die Konzentration der Fluoreszenz markierten Antikörper wurde so gewählt, dass, gemessen an der mittleren Fluoreszenzintensität, annähernd eine Sättigung der Epitope erreicht wurde. Die Reduktion der Fluoreszenzintensität nach kompetitiver Inkubation der Zellen mit steigenden Konzentrationen von ATG lässt sich auf das Vorhandensein von Spezifitäten zurückführen, die mit dem verwendeten Fluoreszenz markierten, monoklonalen Antikörper um dasselbe oder ein räumlich sehr nahes Epitop konkurrieren. Als Kontrolle wurde normales Kaninchen- oder Pferde-IgG verwendet, das kein Potenzial zur Konkurrenz der verwendeten mAk gezeigt hat.

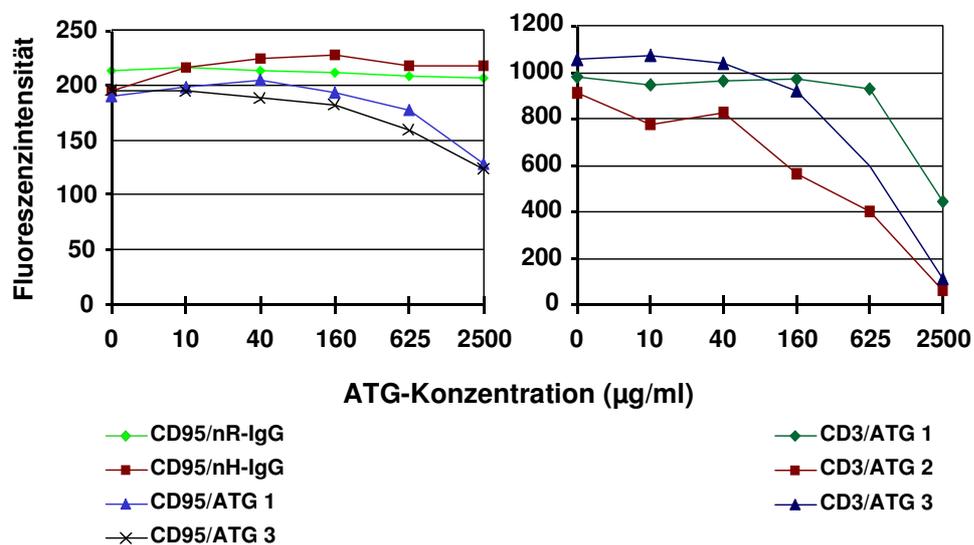


Abb. 9: Kompetitive Immunfluoreszenz

Frisch isolierte PBMC wurden zuerst mit FITC/PE markierten mAk gegen CD95 und CD3, anschließend mit steigenden Konzentrationen an ATG inkubiert. Die mit der ATG-Konzentration schwächer werdende Fluoreszenzintensität ist ein Maß für die Konkurrenz der ATG mit dem mAk. Verschiedene ATG kompetitieren anti-CD95 FITC und anti-CD3 PE; dagegen zeigt normales Kaninchen- (nR) und Pferde- (nH) IgG in Bezug auf den mAk anti-CD95 FITC keine kompetitive Eigenschaft.

In Abb. 9 ist die Veränderung der Fluoreszenzintensität anhand einer typischen Konkurrenz dargestellt. Die für die Konkurrenz benötigten ATG-Konzentrationen liegen je nach Antigen und mAk zwischen 10 µg/ml und 1 mg/ml. Für eine eindeutige Darstellung der Konkurrenz ist eine starke Expression des Antigens auf der Zelloberfläche wichtig, weshalb je nach Antigen die Verwendung unterschiedlicher Zelltypen (PBMC oder Zell-Linien) sinnvoll ist.

Die in ATG enthaltenen Spezifitäten sind bereits in früheren Arbeiten für einzelne sehr unterschiedliche Produkte analysiert worden. Neben eigenen Untersuchungen wurde dieser

Test auch von einigen Herstellern durchgeführt. Tab. 5 gibt einen Überblick über das Spektrum der von uns in ATG nachgewiesenen Spezifitäten. Neben T-Zell spezifischen Antigenen sind auch solche gegen B-Zellen, NK-Zellen sowie Monozyten und Makrophagen enthalten; aber auch Aktivierungsmarker und Adhäsionsmoleküle werden von ATG gebunden sowie der Apoptose induzierende Rezeptor CD95 (Fas, Apo-1) konnte nachgewiesen werden.

Tab. 5: Spezifitäten der ATG

Mittels kompetitiver Immunfluoreszenz getestete potenzielle Spezifitäten von ATG. (+) bedeutet, dass die Spezifität in ATG enthalten ist, (-) bedeutet, dass diese Spezifität nicht nachgewiesen werden konnte. Die Spalten 3, 4 und 5 geben einen ergänzenden Kommentar sowie Angaben über die Expression der jeweiligen Antigene auf Thymozyten/T-Zellen bzw. der T-Zell-Linie Jurkat wieder.

CD/Ag	ATG	Kommentar	Thymozyten/T-Zellen	Jurkat
2	+		+	+
3	+		+	+
4	+		+	+
5	+		+	+
7	+		+	+
8	+	nicht bei ATG 1	+	-
11a	+	insg. schwach/nicht bei ATG 1	Lymphozyten	+/-
14	-		myelomonozytische Zellen	-
16	+		Makrophagen, neutrophile & NK-Zellen	-
18	+	schwach/nicht bei ATG 1	Leukozyten	+/-
19	-		B-Zellen	-
20	+		B-Zellen	-
23	-		reife B-Zellen u.a.	-
25	+	allg. nur schwach	aktivierte T-Zellen	+/-
28	+		T-Zellen	+/-
45 R0	+	nicht bei ATG 1	+	+/-
45RA	-		naive T-Zellen	+/-
95	+		+	+

2 Komplement-unabhängiger Zelltod

Menschliches Komplement ist bei der Anwendung von ATG im Patienten sehr viel weniger effizient als Kaninchenkomplement, das zur Darstellung der komplement-abhängigen Zytotoxizität von ATG (s. vorangegangenes Kapitel) eingesetzt wird. Hierfür sind sehr wahrscheinlich nicht nur die Spezifitäten der über den F_c-Teil vermittelten Bindungen verantwortlich, sondern auch eine Reihe von regulatorischen Proteinen, die den Körper vor den Effekten des Komplementsystems schützen. CD59 (oder Protectin), ein in Membranen von Körperzellen intrinsisches Protein, hemmt z. B. die Bildung des Membran angreifenden

Komplexes, in dem es die Bindung von C9 an den C5b,6,7,8-Komplex blockiert; oder das Cofaktorprotein mit der Bezeichnung Faktor H konkurriert mit Faktor B um die Bindung an C3b. Im Gegensatz zu Faktor B besitzt Faktor H eine Affinität für die endständigen Sialsäurereste an den Glykoproteinen von Membranen der Körperzellen, wodurch sich die Bindung an C3b auf Körperzellen noch verstärkt. Durch die Bindung von Faktor H an C3b wird dieser inaktiviert und so die Komplementaktivierung blockiert (Janeway CA et al., 2005). Für das Verständnis der klinischen Wirksamkeit von ATG ist daher die Aufklärung der komplement-unabhängigen, zytotoxischen Wirkung von erheblicher Bedeutung. Die enorme zytolytische, aber auch breite immunsuppressive Wirkung von ATG kann nicht allein durch die F_c-abhängige Zytotoxizität und die Wirkung des Komplementsystems erklärt werden. Unabhängig von Komplementfaktoren sind ATG in der Lage, Zelltod in unterschiedlicher Intensität sowohl in T-Zell-Linien als auch in aktivierten T-Zell-Klonen sowie in frisch isolierten PBMC zu induzieren. Frisch isolierte PBMC sind jedoch deutlich weniger suszeptibel als T-Zell-Linien und aktivierte T-Zellen.

Nach den Angaben in den Fachinformationen der in Deutschland zugelassenen Produkte ATG-Fresenius[®], Thymoglobulin[®], Lymphoglobulin[®] und Tecelac[®] liegt die maximale Dosierung je nach Präparat zwischen 5 und 10 mg/kg Körpergewicht. Bei einem mittleren Körpergewicht und einem mittleren Blutvolumen von 5 L wird unter klinischen Bedingungen eine Konzentration an ATG von 70-140 µg/ml erreicht. Lässt man den Anteil des Zellvolumens am Gesamtvolumen des Blutes von etwa 45 % mit in die Kalkulation einfließen, kann eine Konzentration von etwas über 200 µg/ml an ATG im Serum erreicht werden. *In vitro* wurde bei ATG-Konzentrationen größer/gleich 500 µg/ml ein zytotoxischer Effekt beobachtet, der bereits innerhalb von Minuten bis wenigen Stunden auftrat. Da dieser Konzentrationsbereich im Normalfall keine klinische Relevanz besitzt, wurde der Effekt zunächst nicht weiter untersucht. Es sei noch erwähnt, dass gleiche Konzentrationen an normalem Kaninchen/Pferde-Immunglobulin diesen zytotoxischen Effekt nicht gezeigt haben. Die eingesetzten Lösungen lagen alle in isotonischer Form vor.

2.1 Komplement-unabhängiger Zelltod in frisch isolierten mononukleären Zellen des peripheren Blutes (PBMC)

Nach der Inkubation mit ATG über eine Dauer von etwa 24 Stunden lässt sich in PBMC in Abhängigkeit der Konzentration Zelltod nachweisen; die Intensität des Zelltodes ist spenderabhängig. Insgesamt wurden PBMC von vier verschiedenen Spendern in unabhängigen Tests untersucht.

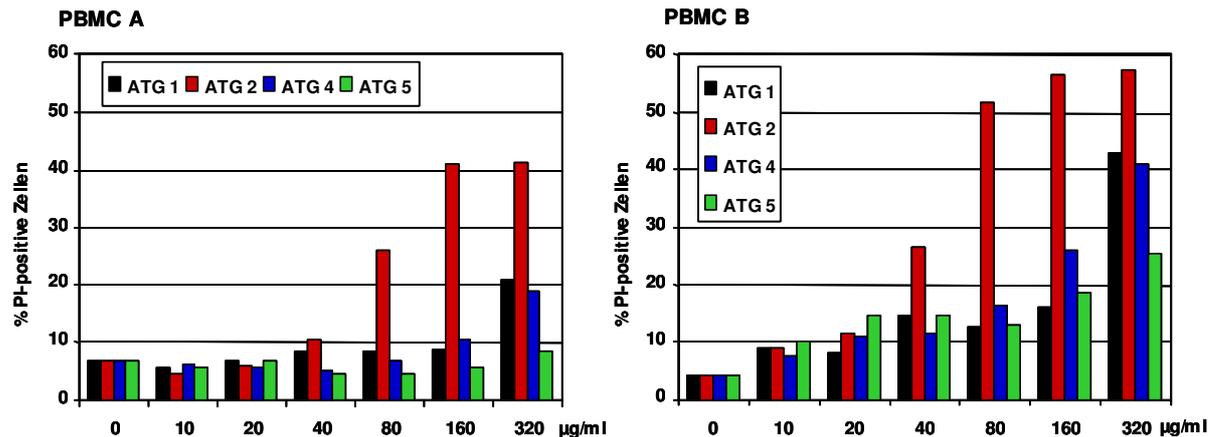


Abb. 10: Komplement-unabhängiger Zelltod in PBMC

Frisch isolierte PBMC (Spender A & B) wurden mit steigenden Konzentrationen vier verschiedener ATG (ATG 1 & 2 vom Kaninchen, ATG 4 & 5 vom Pferd) für etwa 24 Std bei 37 °C im CO₂-Begasungsbrutschrank für die Zellkultur inkubiert. Je 4000 Zellen wurden am Durchflusszytometer gemessen und die Prozente der Propidiumjodid-(PI)-positiven Zellen (tote Zellen) dargestellt.

Abb. 10 zeigt die Unterschiede in der Intensität des komplement-unabhängigen Zelltodes in Abhängigkeit verschiedener ATG am Beispiel von PBMC zwei verschiedener Spender. Der Anteil an toten Zellen in der Versuchsreihe mit PBMC von Spender A fällt insgesamt geringer aus, insbesondere mit ATG 5 scheint auch bei einer Konzentration von 320 µg/ml kein Zelltod induziert zu werden. Bei Spender B induzieren alle getesteten ATG Zelltod; die benötigten Konzentrationen liegen zwischen 40 und 160 µg/ml. Normales Kaninchen- und Pferde-IgG als Kontrollen zeigen keinen zytotoxischen Effekt; der Anteil an toten Zellen war < 10 %. Ohne Inkubation mit ATG oder normalem Kaninchen/Pferde-IgG lag dieser Wert zwischen 6 und 9 %.

Neben der Spenderabhängigkeit wird deutlich, dass die getesteten ATG ein sehr unterschiedliches Potenzial besitzen, einen komplement-unabhängigen Zelltod in PBMC auszulösen. Im Einzelnen: ATG 1 induziert bei einer Konzentration von 320 µg/ml einen Anteil an toten Zellen, der zwischen 21 und 43 % liegt, ATG 2 induziert bereits mit 80 µg/ml 26-52 % tote Zellen, ATG 4 mit 320 µg/ml 19-41 % und ATG 5 ebenfalls mit 320 µg/ml etwa 26 % tote Zellen. Eine Ausnahme war, wie bereits erwähnt und in Abb. 10 zu erkennen, dass mit ATG 5 bei einem Spender (PBMC A) von insgesamt vier (nicht alle dargestellt) kein Zelltod im angegebenen Konzentrationsbereich induziert werden konnte. Für ATG 3 liegen Daten von zwei Spendern vor, wonach Zelltod (≥ 14 %) ab einer Konzentration von ≥ 160 µg/ml induziert wurde.

2.2 Komplement-unabhängiger Zelltod in T-Zell-Linien und T-Zell-Klonen

In der T-Zell-Linie Jurkat induzieren ATG bereits nach einer Inkubationszeit von wenigen Std Zelltod. Definiert man die Induktion von Zelltod ab einem Anteil von toten Zellen von über 20 % (Kontrolle < 10 %), so reichten bei einer Inkubationszeit zwischen 1-2 Std je nach ATG 5-20 µg/ml aus. Betrachtet man einen Konzentrationsbereich bis 200 µg/ml, so wurden in unseren Versuchen nach 1-2 Std bis zu 50 % tote Zellen induziert, nach etwa 6 Std bis zu 70 % und nach 18-24 Std wurden über 90 % erreicht. Um nach etwa 20 Std ± 2 mehr als 20 % tote Zellen zu induzieren, werden 4 - 40µg/ml je nach ATG benötigt, und erst Konzentrationen um 100 µg/ml induzieren Zelltod von 40 bis über 90 %. Die gemessene Intensität des Zelltodes war stark von der verwendeten Zell-Linie abhängig. Für einen vergleichbaren Anteil an toten Zellen waren außerdem für die verschiedenen ATG unterschiedliche Konzentrationen notwendig.

Ein deutlicher Unterschied in der Suszeptibilität für den durch ATG induzierten Zelltod konnte zwischen verschiedenen Subklonen der T-Zell-Linie Jurkat identifiziert werden, die zum einen sensitiv und zum anderen resistent für den über das Molekül CD95 (Fas/Apo-1) induzierten Zelltod sind.

Agonistische anti-CD95 (Fas/Apo-1) Antikörper, wie der mAk CH11, können in entsprechend empfänglichen Zellen programmierten Zelltod auslösen. Aus der Zell-Linie Jurkat wurden in unserem Labor Subklone isoliert, die gegenüber diesem Zelltod resistent (Fas-res. Jurkat) bzw. sensitiv (Fas-sens. Jurkat) sind.

Abb. 11 zeigt die unterschiedliche Intensität an Zelltod, die durch ATG in Fas-sens. versus Fas-res. Jurkat induziert wurden. Bei einer einheitlichen Konzentration von 80 µg/ml unterscheidet sich der Anteil an toten Zellen um mehr als 20 %. Eine Ausnahme in dem dargestellten Versuch scheint ATG 3 zu sein. Werden jedoch die Differenzen über den insgesamt untersuchten Konzentrationsbereich von 5-320 µg/ml betrachtet, ist zu erkennen, dass mit ATG 3 bei einer Konzentration von 160 µg/ml ebenfalls eine Differenz größer als 20 % toter Zellen in Fas-res. (39 %) versus Fas-sens. (81 %) Zellen erreicht wird. Alle getesteten ATG variieren in ihrem für die Induktion von Zelltod optimalen Konzentrationsbereich. Im Mittel liegt er bei 100 µg/ml (20-180 µg/ml). Der Anteil an toten Zellen in den Kontrollen ohne ATG lag unter 12 %; nach Inkubation mit dem anti-Fas mAk CH11 (1 µg/ml) wurden in Fas-sens. Jurkat über 30 % und in Fas-res. Jurkat keine Erhöhung am Anteil der toten Zellen gemessen (nicht dargestellt).

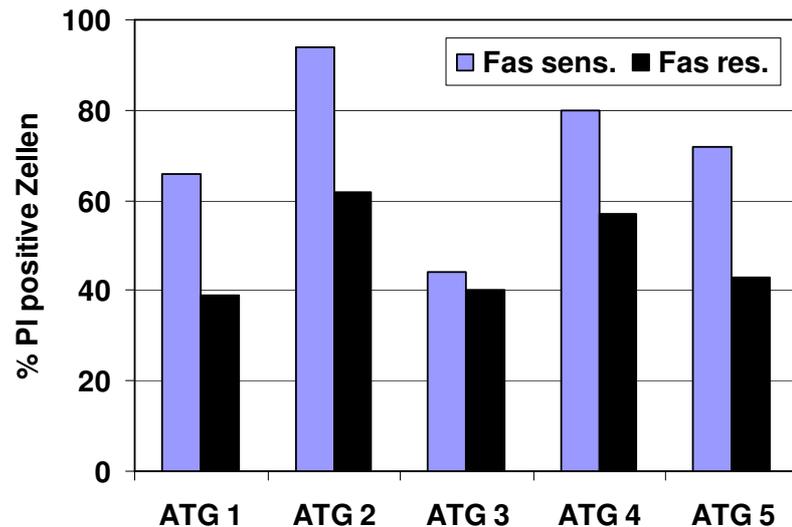


Abb. 11: Vergleich Fas-sensitive versus -resistente Subklone der T-Zell-Linie Jurkat

Verschiedene Subklone der T-Zell-Linie Jurkat wurden mit steigenden Konzentrationen fünf verschiedener ATG (ATG 1, 2 & 3 vom Kaninchen, ATG 4 & 5 vom Pferd) für etwa 20 Std bei 37 °C im CO₂-Begasungsbrutschrank für die Zellkultur inkubiert. Je 4000 Zellen wurden am Durchflusszytometer gemessen und die Prozente der Propidiumjodid-(PI)-positiven Zellen (tote Zellen) gemessen. Dargestellt ist der Anteil an toten Zellen bei einer ATG-Konzentration von 80 µg/ml; jeweils im Vergleich ein CD95 (Fas/Apo-1) -sens. versus -res. Subklon. Die angegebenen Werte sind für jeweils mindestens drei voneinander unabhängige Versuche repräsentativ.

Bereits in früheren Arbeiten aus unserem Labor wurden T-Zell-Klone charakterisiert und analysiert, von denen einige weitgehend resistent für die über den TCR/CD3-Komplex induzierten Apoptose (AICD) waren. Vergleicht man sensitive versus resistente Klone in der gleichen Weise, wie oben für Fas-sens. und Fas-res. Jurkats dargestellt, zeigt sich ebenfalls eine unterschiedliche Empfindlichkeit der T-Zell-Klone gegenüber den durch ATG induzierten Zelltod. Im Konzentrationsbereich von 20-80 µg/ml lassen sich je nach ATG ebenfalls mindestens 20 % mehr tote Zellen in sensitiven T-Zell-Klonen als in resistenten messen (Abb. 12).

Die Beobachtung des Zelltodes nach der Inkubation mit ATG (~20 Std) in Fas-sens. Jurkats und AICD-sens. T-Zell-Klonen korreliert mit der Darstellbarkeit der DNA-Fragmentierung mittels Propidiumjodid-Färbung isolierter Zellkerne und anschließender Analyse im Durchflusszytometer. In den entsprechend resistenten Zell-Linien und T-Zell-Klonen sowie in frisch isolierten MNC konnte eine geringe bzw. gar keine DNA-Fragmentierung nachgewiesen werden (nicht dargestellt).

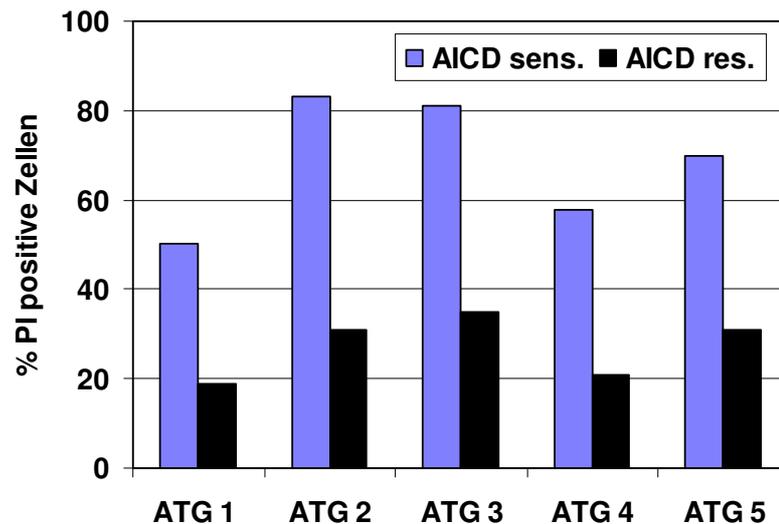


Abb. 12: Vergleich AICD-sensitive versus resistente T-Zell-Klone

Verschiedene T-Zell-Klone wurden mit steigenden Konzentrationen fünf verschiedener ATG (ATG 1, 2 & 3 vom Kaninchen, ATG 4 & 5 vom Pferd) für etwa 20 Std bei 37 °C im CO₂-Begasungsbrutschrank für die Zellkultur inkubiert. Je 4000 Zellen wurden am Durchflusszytometer gemessen und die Prozente der Propidiumjodid-(PI)-positiven Zellen (tote Zellen) gemessen. Dargestellt ist der Anteil an toten Zellen bei folgenden ATG-Konzentrationen: ATG 1 80 µg/ml, ATG 2 20 µg/ml, ATG 3-5 40 µg/ml; jeweils im Vergleich ein AICD (TCR/CD3) sens. versus res. T-Zell-Klon. Die angegebenen Werte sind für jeweils mindestens drei voneinander unabhängige Versuche repräsentativ.

2.3 Induktion von Apoptose durch ATG

Mittels Wettbewerbsversuche konnten wir zeigen, dass ATG Antikörper-Spezifitäten gegen das Molekül CD95 (Fas/Apo-1) enthalten; J.-P. Revillard und Mitarbeiter haben darüber hinaus gezeigt, dass ATG-Apoptose in humanen B-Zell-Linien und aktivierten T-Zellen induzieren (Bonney-Bérard N et al., 1994; Genestier L et al., 1998). Diese durch ATG initiierte Apoptose und/oder der AICD kann durch Fas-neutralisierende Antikörper inhibiert werden. Um dies zu zeigen, haben wir mit den verschiedenen ATG-Präparaten an Fas-sens. Jurkat-Zellen Inhibitionsversuche mit dem Fas-neutralisierenden Antikörper (ZB4) durchgeführt. Bei einer ATG-Konzentration von 25-100 µg/ml ließ sich der Zelltod durch den Fas-neutralisierenden Antikörper (ZB4) inhibieren. Bei 100 µg/ml liegt die Inhibition für alle getesteten ATG jedoch unter 10 %. Zum Vergleich der ATG untereinander wurde in Abb. 13 die einheitliche Konzentration von 25 µg/ml gewählt. Es ist deutlich zu erkennen, dass die stärkste Inhibition von mehr als 50 % mit ATG 1 und die geringste von knapp 25 % mit den ATG 2 und 4 zu beobachten ist. Mit ATG 3 ließ sich der Zelltod um etwa 40 % inhibieren. Dieser Unterschied zwischen ATG 1 gegenüber den anderen ATG ließ sich in allen drei

unabhängigen Versuchen beobachten. Ein signifikanter Unterschied der ATG 2-4 untereinander war nicht darstellbar.

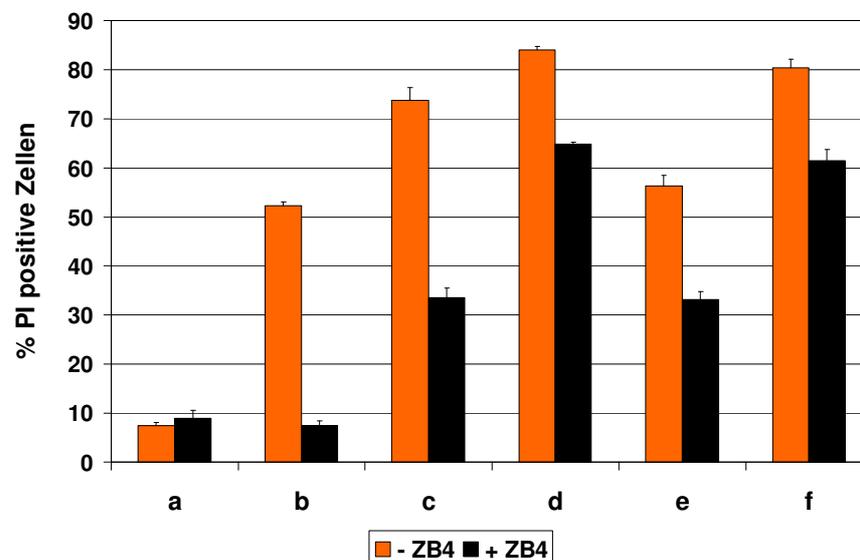


Abb. 13: Einfluss des Fas-neutralisierenden mAk ZB4 auf den Zelltod nach ATG-Inkubation

Zellen eines Subklons der T-Zell-Linie Jurkat (JM) wurden mit dem anti-Fas-neutralisierenden mAk ZB4 (100 ng/ml) bzw. mit PBS für eine Std bei RT vorinkubiert. Anschließend wurden die Zellen entweder mit verschiedenen ATG (25 µg/ml) oder dem anti-Fas mAk CH11 (500 ng/ml) für 20 Std inkubiert. Die Kontrolle wurde nur mit ZB4 vorinkubiert und anschließend in PBS gehalten. Je 4000 Zellen wurden am Durchflusszytometer gemessen und die Prozente der PI-positiven Zellen (tote Zellen) dargestellt. Die Buchstaben a-f entsprechen in folgender Reihenfolge: Kontrolle, anti-Fas mAk, ATG 1-ATG 4. Bei den wiedergegebenen Werten handelt es sich um Mittelwerte einer Dreifachbestimmung, die für insgesamt drei unabhängige Versuche repräsentativ sind.

Der Anteil an toten Zellen in der Negativkontrolle lag jeweils unter 9 % und die durch den mAk CH11 induzierte Apoptose (52 % PI-positive Zellen) ließ sich durch den mAk ZB4 vollständig inhibieren (8 % PI-positive Zellen). Eine Inhibition des Zelltodes, induziert durch ATG in Fas-res. Jurkat, war mit dem mAk ZB4 nicht zu erkennen (nicht dargestellt).

Parallel zum Zelltod wurde mit den gleichen Ansätzen, wie oben beschrieben, auch der Einfluss von ATG und ZB4 auf die DNA-Fragmentierung untersucht.

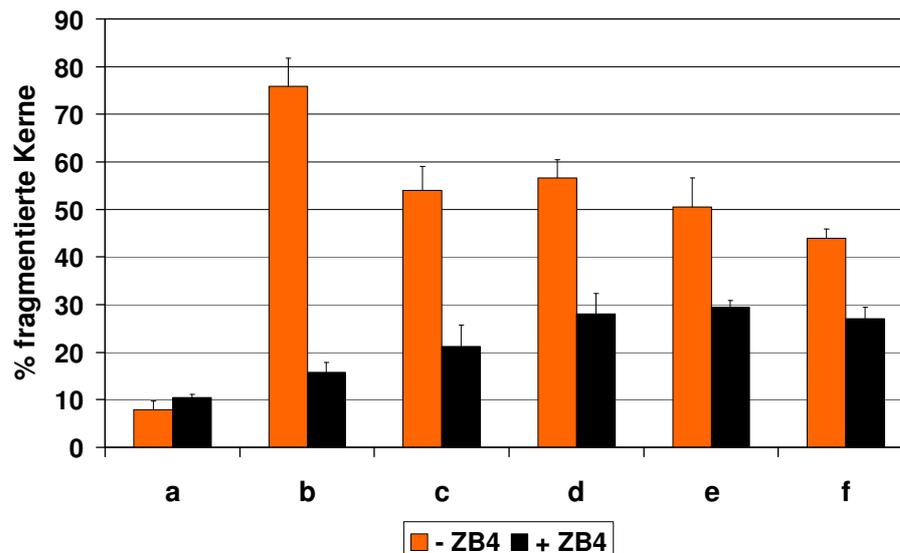


Abb. 14: Einfluss des mAk ZB4 auf die DNA-Fragmentierung nach ATG-Inkubation

Zellen eines Subklons der T-Zell-Linie Jurkat (JM) wurden mit dem anti-Fas-neutralisierenden mAk ZB4 (100 ng/ml) bzw. mit PBS für eine Std bei RT vorinkubiert. Anschließend wurden die Zellen entweder mit verschiedenen ATG (25 µg/ml) oder dem anti-Fas mAk CH11 (500 ng/ml) für 20 Std inkubiert. Die Kontrolle wurde nur mit ZB4 vorinkubiert und anschließend in PBS gehalten. Je etwa 4000 Zellkerne wurden am Durchflusszytometer gemessen und die Anzahl der Kerne mit fragmentierter DNA in Prozent dargestellt. Die Buchstaben a-f entsprechen in folgender Reihenfolge: Kontrolle, anti-Fas mAk, ATG 1-ATG 4. Bei den wiedergegebenen Werten handelt es sich um Mittelwerte einer Dreifachbestimmung, die für insgesamt drei unabhängige Versuche repräsentativ sind.

In Fas-sens. Jurkat-Zellen und aktivierten AICD-sens. T-Zell-Klonen induzieren alle getesteten ATG DNA-Fragmentierung. Eine Korrelation zwischen der Intensität des Zelltodes und der prozentualen Häufigkeit fragmentierter Kerne lässt sich im Vergleich der ATG untereinander nicht nachweisen. In der Positivkontrolle mit dem mAk CH11 ist der größte Anteil an Kernen mit fragmentierter DNA zu erkennen (76 %), für die untersuchten ATG liegt dieser Wert zwischen 42 und 58 %. Die Inhibition der Fragmentierung gelingt in der Positivkontrolle (CH11) zu etwa 80 % auf 16 % fragmentierter Kerne; im Vergleich dazu liegen die Werte der Negativkontrolle bei ≤ 10 %. Wie auch beim Zelltod, ist die stärkste Inhibition bei ATG 1 festzustellen (von 53 auf 21 %); sie liegt knapp über 60 %, für die restlichen ATG liegen diese Werte, wie in Abb. 14 dargestellt, zwischen 38 und 50 %. Diese relativen Unterschiede in den Anteilen an Kernen mit fragmentierter DNA sind repräsentative Ergebnisse aus drei unabhängigen Versuchen.

2.4 Die Rolle der Caspasen im ATG induzierten Zelltod

Apoptose als Zelltod ist letztlich durch charakteristische Veränderungen in der Morphologie der Zelle charakterisiert. An der Steuerung dieser Veränderungen sind sog. Caspasen

beteiligt: Cysteinproteasen, die Proteinketten hinter Asparaginsäureresten spalten, woraus sich auch ihr Name ableitet. Alle bekannten Signalübertragungswege, die den programmierten Zelltod auslösen, führen zur Aktivierung von Caspasen. Wir haben bekannte kommerziell erhältliche spezifische Caspase-Inhibitoren eingesetzt, um die Bedeutung der Apoptose in dem durch ATG induzierten Zelltod genauer zu beschreiben.

Inhibitoren der Caspase-1 (ICE) sind in der Lage, den Zelltod fast vollständig zu hemmen. In Vorversuchen haben wir ermittelt, dass für die verwendeten Fas-sens. Jurkats ATG-Konzentrationen von 12,5-50 µg/ml am besten geeignet sind, den Effekt der Caspase-Inhibitoren darzustellen. Zelltod bis zu 40 % ließ sich durch Inhibitoren der Caspase-1 in den eingesetzten Konzentrationen von 25, 50 und 100 µM komplett inhibieren (unter 10 % tote Zellen).

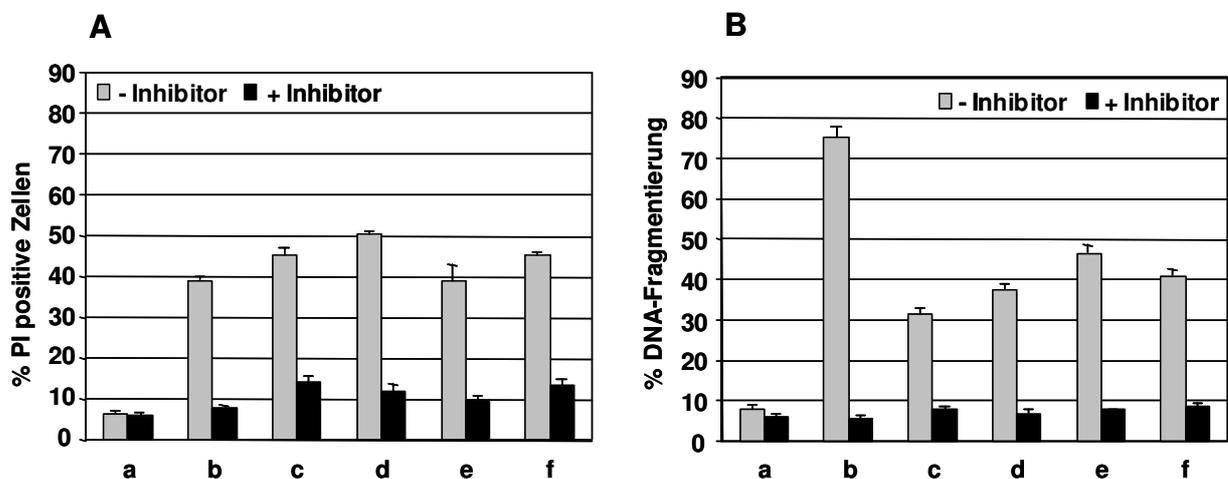


Abb. 15: Caspase-1 (ICE)

Zellen eines Fas-sens. Subklons der T-Zell-Linie Jurkat wurden in den Grafiken A & B mit einem Inhibitor der Caspase-1 (50 µM) bzw. mit PBS für eine Std bei RT vorinkubiert. Anschließend wurden die Zellen mit ATG 1 (50 µg/ml), ATG 2 (12,5 µg/ml), ATG 3 & 4 (25 µg/ml) und mit dem anti-Fas mAk CH11 (500 ng/ml) für 20 Std inkubiert. Die Kontrollen wurden nur mit den Caspase-Inhibitoren bzw. PBS inkubiert. Es wurden 4000 Zellen bzw. Kerne am Durchflusszytometer gemessen und in A die Prozente der PI-positiven Zellen (tote Zellen) dargestellt; in B entsprechend die Anzahl der Kerne mit fragmentierter DNA in Prozent wiedergegeben. Die Buchstaben a-f entsprechen in folgender Reihenfolge: Kontrolle, anti-Fas mAk, ATG 1-ATG 4. Bei den wiedergegebenen Werten handelt es sich um Mittelwerte einer Doppelbestimmung, die für insgesamt vier unabhängige Versuche repräsentativ sind.

Erhöhte man die ATG-Konzentration in der Weise, dass mehr als 40 % Zelltod induziert wurde, ließ sich keine vollständige Inhibition mehr erreichen. Ein signifikanter Unterschied von ATG 1 gegenüber den anderen ATG, wie er in den Versuchen zur Neutralisation der anti-Fas Spezifitäten zu erkennen war, konnten wir in Bezug auf die Inhibition durch Caspase-Inhibitoren nicht beobachten. Der Anteil toter Zellen in der Negativkontrolle lag jeweils unter 7 %, die Positivkontrolle mit CH11 (Zelltod 40 %) ließ sich vollständig

inhibieren. Die Caspase-Inhibitoren waren in den eingesetzten Konzentrationen alleine nicht toxisch (Abb. 15).

Anhand der DNA-Fragmentierung wird der inhibitorische Effekt noch deutlicher. Eine vollständige Inhibition war hier auch dann noch zu erkennen, wenn der durch ATG induzierte Zelltod über 40 % lag (je nach ATG 45-76 %, nicht dargestellt). In den Abb. 15, Abb. 16 und Abb. 17 sind jeweils Mittelwerte von Doppelbestimmungen dargestellt. Sie entsprechen Ergebnissen drei weiterer Versuche, bei denen weitere Konzentrationsbereiche und z. T. Caspase-Inhibitoren anderer Hersteller verwendet wurden.

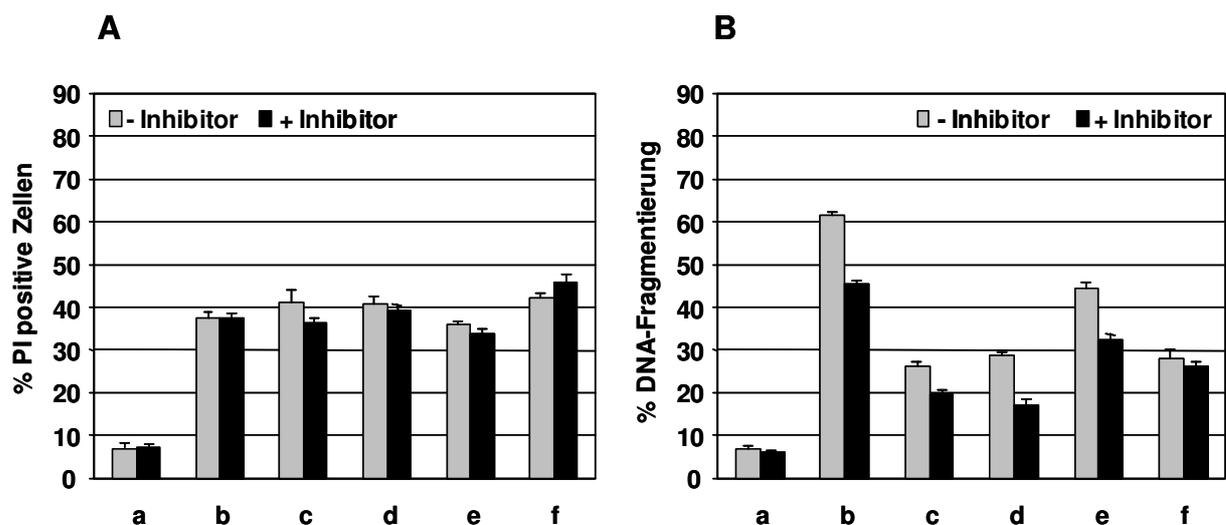


Abb. 16: Caspase-9 (ICH-LAP6, APAF-3, Mch6)

Zellen eines Fas-sens. Subklons der T-Zell-Linie Jurkat wurden in den Grafiken A & B mit einem Inhibitor der Caspase-9 (50 μ M) bzw. mit PBS für eine Std bei RT vorinkubiert. Anschließend wurden die Zellen mit ATG 1 (50 μ g/ml), ATG 2 (12,5 μ g/ml), ATG 3 & 4 (25 μ g/ml) und mit dem anti-Fas mAk CH11 (500 ng/ml) für 20 Std inkubiert. Die Kontrollen wurden nur mit den Caspase- Inhibitoren bzw. PBS inkubiert. Es wurden 4000 Zellen bzw. Kerne am Durchflusszytometer gemessen und in A die Prozenste der PI-positiven Zellen (tote Zellen) dargestellt; in B entsprechend die Anzahl der Kerne mit fragmentierter DNA in Prozent wiedergegeben. Die Buchstaben a-f entsprechen in folgender Reihenfolge: Kontrolle, anti-Fas mAk, ATG 1-ATG 4. Bei den wiedergegebenen Werten handelt es sich um Mittelwerte einer Doppelbestimmung, die für insgesamt vier unabhängige Versuche repräsentativ sind.

Inhibitoren der Caspase-9 (ICH-LAP6, APAF-3, Mch6) zeigten in unseren Versuchen keinen Effekt auf den Anteil toter Zellen nach der Inkubation mit ATG oder dem mAk CH11 (Abb. 16 A). Dagegen ließ sich jedoch der Anteil an Zellkernen mit fragmentierter DNA reduzieren (Abb. 16 B). Für ATG 1-3 konnten wir im Mittel eine Reduktion um 5-12 Prozentpunkte beobachten, was je nach ATG einer prozentualen Veränderung von 24-40 % gleichkommt. Im Vergleich dazu wurde in der Positivkontrolle (anti-Fas, CH11) eine Reduktion um 15 Prozentpunkte erreicht, was etwa 26 % entspricht. Mit ATG 4 war in Abhängigkeit der ATG

und der Konzentration des Inhibitors keine signifikante Reduktion an fragmentierter DNA nach der Inkubation mit einem Caspase-9 Inhibitor zu erkennen.

Die Caspasen-3 (CPP32, Apopain, Yama) und -6 (Mch2) spielen eine entscheidende Rolle bei den apoptotischen Veränderungen im Zellkern. Caspase-3 aktiviert Caspase-6 und beide vermitteln die Kondensation des Chromatins und die DNA-Fragmentierung.

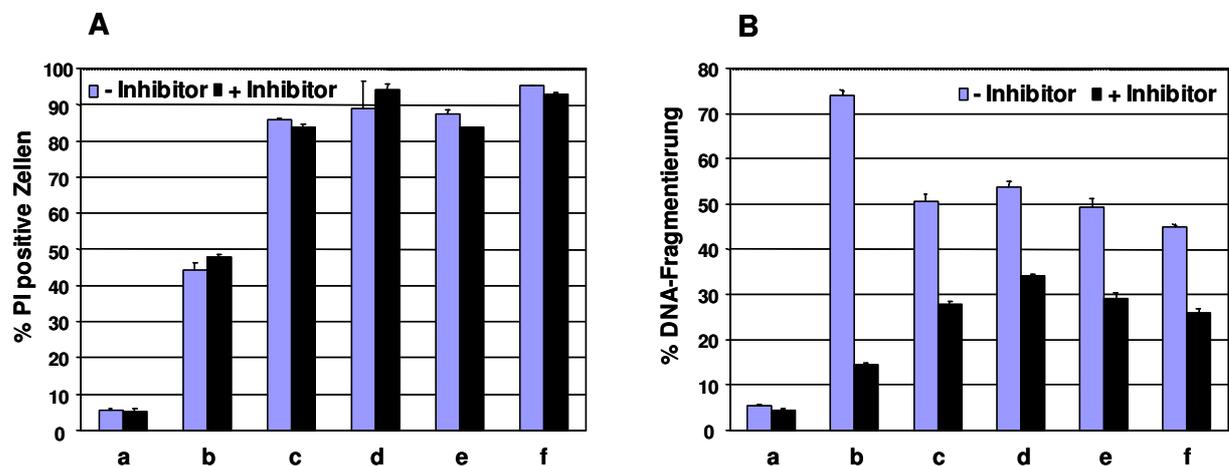


Abb. 17: Caspasen-3 (CPP32, Apopain, Yama) & -6 (Mch2)

Zellen eines Fas-sens. Subklons der T-Zell-Linie Jurkat wurden mit den Inhibitoren der Caspase-3 (50 μ M) und -6 (50 μ M) bzw. mit PBS für eine Std bei RT vorinkubiert. Anschließend wurden die Zellen mit ATG 1 (50 μ g/ml), ATG 2 (12,5 μ g/ml), ATG 3 & 4 (25 μ g/ml) und mit dem anti-Fas mAk CH11 (500 ng/ml) für 24 Std inkubiert. Die Kontrollen wurden nur mit den Caspase-Inhibitoren bzw. PBS inkubiert. In A wurden je 4000 Zellen am Durchflusszytometer gemessen und die Prozente der PI-positiven Zellen (tote Zellen) dargestellt; in B entsprechend die Anzahl der Kerne mit fragmentierter DNA in Prozent wiedergegeben. Die Buchstaben a-f entsprechen in folgender Reihenfolge: Kontrolle, anti-Fas mAk, ATG 1–ATG 4. Bei den wiedergegebenen Werten handelt es sich um Mittelwerte einer Doppelbestimmung, die für insgesamt vier unabhängige Versuche repräsentativ sind.

Auf den Anteil an toten Zellen nach der ATG-Inkubation bzw. mit dem mAk CH11 zeigten Inhibitoren der Caspasen-3 und -6 keinen Einfluss. Beide Inhibitoren wurden in den Konzentrationen 12,5, 25 und 50 μ M sowohl einzeln als auch in Kombination miteinander für die Vorinkubation der Zellen (Fas-sens. Jurkat) eingesetzt. Nach einer anschließenden Inkubation mit ATG oder dem mAk CH11 als Positivkontrolle für 18-24 Std wurde der Anteil an toten Zellen und parallel der Anteil an fragmentierten Kernen am Durchflusszytometer gemessen. Ein inhibitorischer Effekt auf den Anteil toter Zellen war mit keinem der beiden Caspase-Inhibitoren erkennbar, weder einzeln noch in Kombination. Die Werte der Negativkontrolle lagen jeweils unter 7 % PI-positive Zellen. Abb. 17 zeigt die Werte nach der Vorinkubation mit beiden Caspase-Inhibitoren gemeinsam. Obwohl sich die Induktion von Zelltod durch den mAk CH11 oder durch ATG mit den Inhibitoren der Caspase-3 und/oder -6 nicht beeinflussen ließ, war ein deutlicher Effekt beider Inhibitoren bei der DNA-Fragmentierung zu erkennen. Nach der gemeinsamen Vorinkubation mit beiden Inhibitoren

ließ sich in der Positivkontrolle die Fragmentierung fast vollständig inhibieren (um etwa 80 %) und nach der Inkubation mit ATG war wenigstens eine Reduktion um 36-45 % (20-25 Prozentpunkte) zu erkennen.

Der Effekt beider Caspase-Inhibitoren (-3 & -6) in Bezug auf die DNA-Fragmentierung ist additiv. Einzeln betrachtet reduzieren sie den Anteil an Kernen mit fragmentierter DNA um 15-23 % (10-15 Prozentpunkte), sowohl in der Positivkontrolle als auch nach der Inkubation mit ATG. In der Negativkontrolle lag der Anteil an Kernen mit fragmentierter DNA jeweils unter 6 %. Es ließ sich bei beiden ein additiver Effekt feststellen.

3 Biochemische Charakterisierung

Die klinische Indikation der in dieser Arbeit untersuchten ATG ist für alle fünf Produkte gleich. Die Produkte unterscheiden sich jedoch zum einen in der für die Immunisierung gewählten Tierart (Kaninchen oder Pferd), und zum anderen in dem für die Immunisierung verwendeten Agens (juvenile gereinigte Thymozyten oder T-Zell-Linie Jurkat). Zusammen mit der klinischen Erfahrung und den gezeigten *in vitro* Daten wird deutlich, dass sich die oben erwähnten Unterschiede der ATG-Präparation in jeweils charakteristischen Produkteigenschaften widerspiegeln sollten. Sie darzustellen kann als Nachweis für die Spezifität der Methode angesehen werden. Eine schadhafte Charge als ideale Kontrolle konnte leider nicht verwendet werden, da eine solche Charge laut Hersteller nicht existiert.

3.1 Spezifität der ATG im Kinase-Assay

Eine sehr sensitive Methode, um spezifische Unterschiede der verschiedenen ATG-Produkte wiederzugeben, ist der Kinase-Assay. Nach der Präzipitation von Zell-Lysat mit ATG und der anschließenden Inkubation des Präzipitats mit radioaktiv markiertem ATP lässt sich die jeweilige Kinase-Aktivität im SDS-PAGE darstellen. Entsprechend der Bindungseigenschaften der verschiedenen ATG-Präparationen lassen sich produktspezifische Bandenmuster erkennen. Verschiedene Chargen zeigen in Abhängigkeit vom Zell-Lysat ein für das jeweilige Produkt charakteristisches und identisches Bandenmuster. Von den ATG 1, 3 und 4 wurden je sechs verschiedene Chargen in elf voneinander unabhängigen Versuchen wiederholt getestet. Von den ATG 2 und 3 lagen jeweils nur zwei verschiedene Chargen vor.

Wie einleitend erwähnt, ließe sich mit dieser Methode sehr spezifisch die Chargenkonsistenz in Bezug auf eine Referenzcharge überprüfen. Eine biochemische Methode, die zwar nur beschreibend, dafür aber umfassend und spezifisch die Bindungscharakteristik der ATG darstellt und kontrollieren kann, wäre eine sinnvolle Ergänzung zur Wirksamkeitsprüfung.

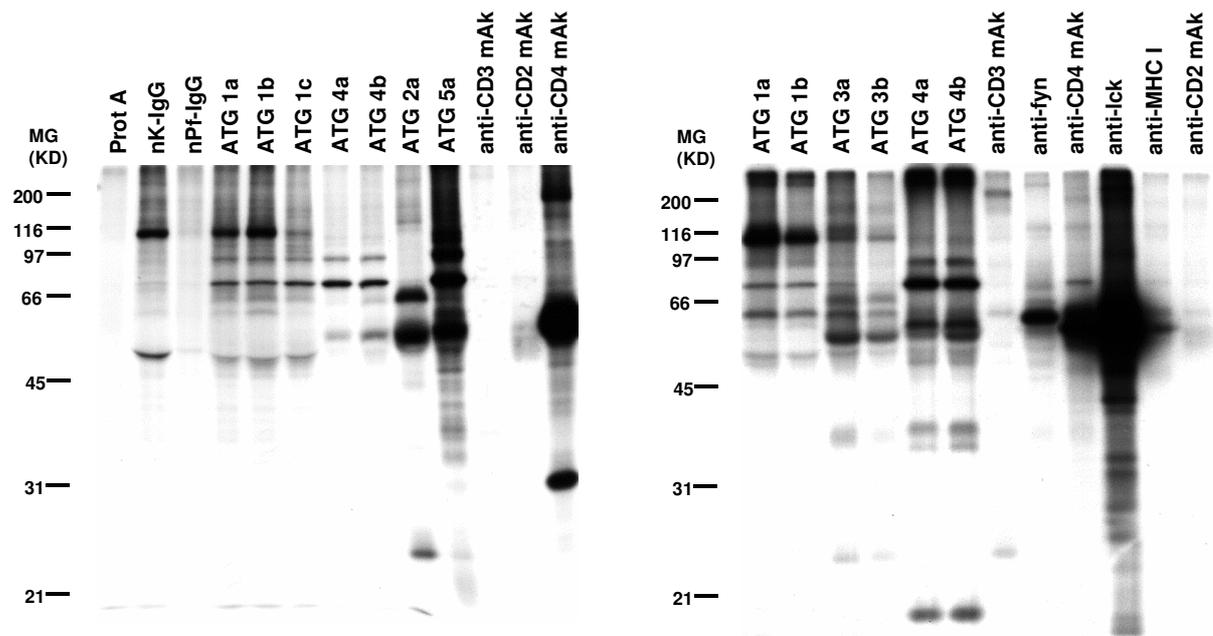


Abb. 18: Kinase-Assay

PHA-Blasten (25×10^6 Zellen/Probe) wurden mit NP-40-Lyse-Puffer (+ Inhibitoren) lysiert und das Zell-Lysat mit den angegebenen Seren (1-3 bezeichnet die verschiedenen Produkte, a-c je unterschiedliche Chargen) und Antikörpern zur Kontrolle präzipitiert sowie mit radioaktivem ATP inkubiert; anschließend wurden sie elektrophoretisch aufgetrennt (SDS-PAGE 11 %) und autoradiografisch dargestellt.

Um die Spezifität der Methode zu untersuchen, wurde mit den im Kinase-Assay co-migrierenden Banden verschiedener Chargen eines Produktes ein sog. Peptide Map durchgeführt. Einzelne Banden wurden aus den Gelen gestanzt und mit der Protein-Peptidase V8 verdaut. Die so erhaltenen Proteinfragmente wurden erneut mittels SDS-PAGE aufgetrennt und autoradiografisch dargestellt. Die aus dem Verdau resultierenden Fragmente co-migrierender Banden zeigten ein gleiches Laufverhalten, was darauf hindeutet, dass es sich mit großer Wahrscheinlichkeit um die gleichen Proteine gehandelt hat.

In Abb. 19 sind die Autoradiogramme zweier Gele eines Kinase-Assays wiedergegeben, darunter der korrespondierende „Peptide Map“. Die analysierten Banden sind jeweils mit den Ziffern 1-12 gekennzeichnet. Zur Kontrolle wurden neben den ATG auch Präzipitate mit monoklonalen Antikörpern gegen CD3 und 4, den Protein-Tyrosin-Kinasen fyn und Ick sowie mit normalem Kaninchen-IgG dargestellt.

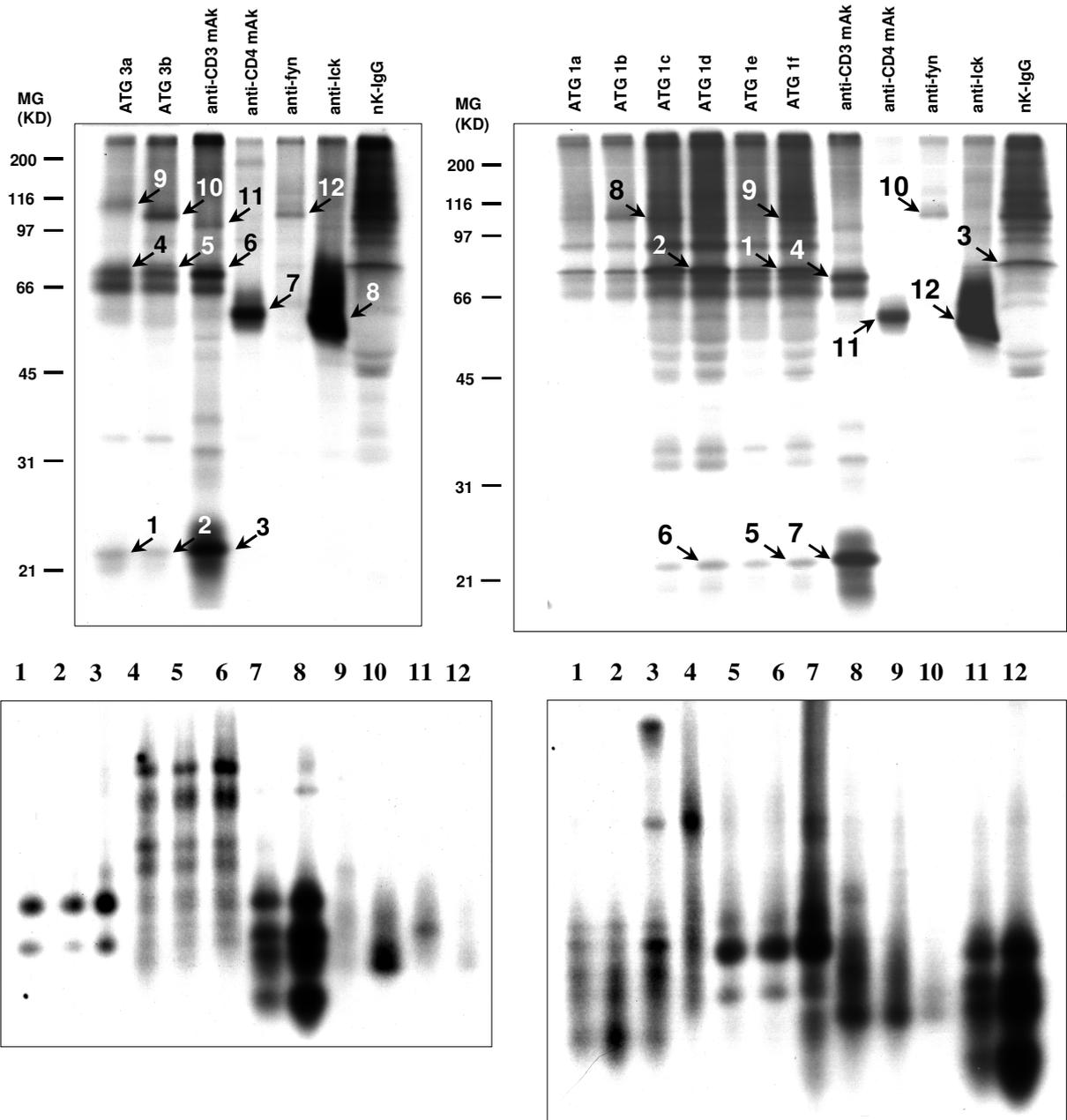


Abb. 19: Peptide Map

Zellen der T-Zell-Linie Jurkat (30×10^6 Zellen/Probe) wurden mit dem Brij-Lyse-Puffer (+ Inhibitoren) lysiert und das Zell-Lysat mit den angegebenen Seren (1-3 bezeichnet die verschiedenen Produkte, a-c je unterschiedliche Chargen) und Antikörpern zur Kontrolle präzipitiert sowie mit radioaktivem ATP inkubiert; anschließend wurden sie elektrophoretisch aufgetrennt (SDS-PAGE 11 %) und autoradiografisch dargestellt. Die mit den Ziffern 1-12 gekennzeichneten Banden wurden ausgeschnitten, ein Proteinverdau mit der Protease V8 durchgeführt und anschließend erneut elektrophoretisch aufgetrennt (SDS-PAGE 16 %) sowie autoradiografisch dargestellt. Die korrespondierenden Gele sind jeweils untereinander wiedergegeben.

3.2 Spezifische Bindung der ATG an Zelloberflächenmoleküle

Die Ergebnisse aus dem Kinase-Assay haben sehr gut gezeigt, dass trotz vergleichbarer klinischer Wirksamkeit den verschiedenen ATG-Präparationen eine individuelle Bindungscharakteristik zugeschrieben werden kann. Es stellte sich die Frage, ob diese für die ATG-Produkte spezifische Präzipitation von Kinase-Aktivitäten auch in einer für die ATG individuellen Bindung von Zelloberflächenmolekülen wiederzufinden ist. Durch Biotinylierung intakter Zellen lassen sich alle Zelloberflächenmoleküle kovalent markieren. Nach der Immunpräzipitation des Zell-Lysats mit individuellen ATG werden die biotinylierten und präzipitierten Proteine elektrophoretisch getrennt und im Western-Blot mittels Chemilumineszenz dargestellt. Man erhält ein Spektrum der von ATG gebundenen Zelloberflächenmoleküle, das der jeweiligen Bindungscharakteristik der verschiedenen ATG-Präparationen entspricht.

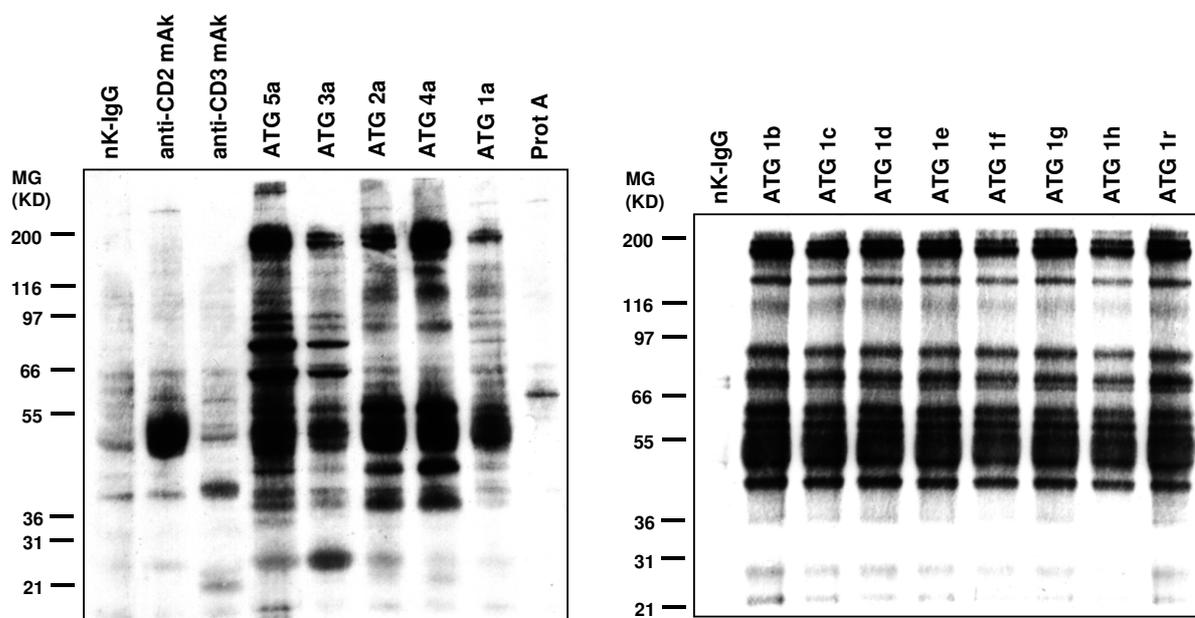


Abb. 20: Biotinylierung

Frisch isolierte MNC (10^6 Zellen/Probe) wurden mit NHS-Biotin für 30 Min inkubiert und in Lyse-Puffer (1 % NP-40) lysiert. Das Zell-Lysat wurde mit den angegebenen Seren (1-5 bezeichnet die verschiedenen Produkte, a-r je unterschiedliche Chargen) und Antikörpern zur Kontrolle präzipitiert; anschließend elektrophoretisch aufgetrennt (NuPAGE-Gradientengele) sowie mittels Streptavidin und Chemilumineszenz dargestellt.

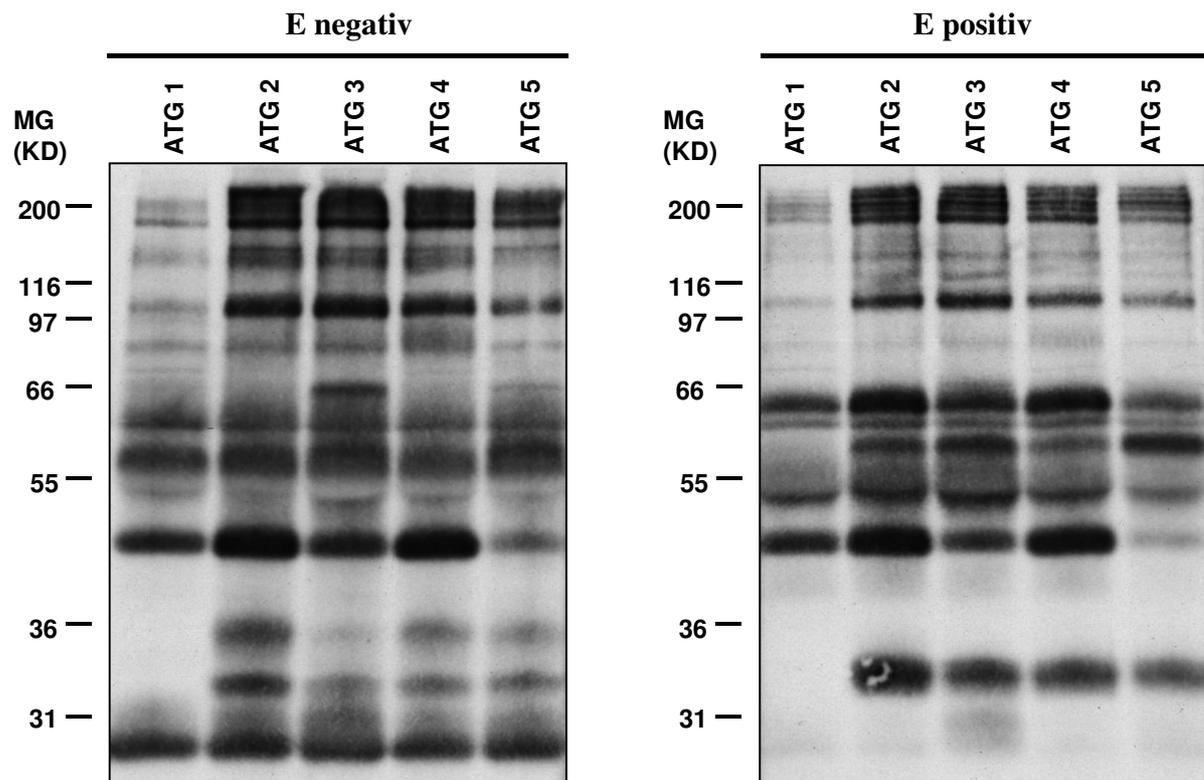


Abb. 21: Biotinylierung (2)

E-positive und E-negative Zellen aus frisch isolierten MNC (10^6 Zellen/Probe) wurden mit NHS-Biotin für 30 Min inkubiert und in Lyse-Puffer (1 % NP-40) lysiert. Das Zell-Lysat wurde mit den angegebenen Seren (1-5 bezeichnet die verschiedenen Produkte) präzipitiert; anschließend wurde es elektrophoretisch aufgetrennt (NuPAGE-Gradientengele) sowie mittels Streptavidin und Chemilumineszenz dargestellt.

Es konnte gezeigt werden, dass, wie bereits im Kinase-Assay gesehen, qualitative und quantitative Unterschiede in der Bindung von Zelloberflächenmolekülen zwischen den ATG-Produkten bestehen. Verschiedene Chargen eines Produktes zeigen jedoch ein einheitliches Bandenmuster, womit die Homogenität der Chargen untereinander dargestellt ist. Ein weiterer Vorteil dieser Methode ist der Verzicht auf radioaktive Agenzien, was insbesondere den Einsatz für Routineuntersuchungen erleichtert. Unter der Verwendung kommerziell erhältlicher Gradientengele und einer Elektrophoreseeinrichtung, die es ermöglicht, die Bedingungen der Elektrophorese (Strom, Zeit und Temperatur) über den gesamten Lauf zu kontrollieren und zu dokumentieren, konnte die Methode standardisiert und die benötigte Zeit um etwa 25 % ohne Verlust an Sensitivität und Auflösung verringert werden.

Der Vergleich von Chargen mittels Biotinylierung und Präzipitation von Zelloberflächenmolekülen kann so nach guter Vorbereitung an einem Tag (8 Std) durchgeführt werden. Innerhalb des Projektes wurden mit dieser Methode etwa zwanzig Chargen vier verschiedener Hersteller auf ihre Identität hin überprüft; hierbei wurden auch unterschiedliche Zellpopulationen (Zell-Linien, aktivierte T-Zell-Blasten und frisch isolierte

mononukleäre Zellen aus dem peripheren Blut) auf ihre Eignung für die Charakterisierung von ATG miteinander verglichen. In keinem der Experimente haben sich Unterschiede in der Qualität und Quantität der Bandenmuster bei den Chargen jeweils eines Herstellers gezeigt, sodass von einer Homogenität der Chargen gesprochen werden kann. Trotz interindividueller Unterschiede und oft nur gering exprimierter Oberflächenmoleküle eignen sich frisch isolierte mononukleäre Zellen am besten zum Vergleich der Chargen. Der Grund hierfür liegt möglicherweise darin, dass in diesen mit Ficoll-Hypaque gereinigten Zellpopulationen neben T-Lymphozyten auch alle anderen Zellpopulationen (Monozyten, natürliche Killerzellen, B-Lymphozyten) vertreten sind, mit denen ATG reagieren können.

V DISKUSSION

Mit der vorliegenden Untersuchung wurde eine umfangreiche Charakterisierung unterschiedlicher ATG-Präparate erstellt. Sie soll, in Kenntnis der Beobachtungen aus der klinischen Situation, als Grundlage dienen, eine geeignete *in vitro* Methode für den Ersatz des Affenhaut-Transplantationstests als Wirksamkeitsprüfung abzuleiten. Wenn auch eine vollständige Beschreibung aller Wirkmechanismen der ATG nicht erreicht werden kann, so ist doch eine möglichst genaue Kenntnis hierüber für die Beurteilung einer geeigneten Ersatzmethode unerlässlich.

1 Die unterschiedlichen Spezifitäten der ATG

In den letzten 30 Jahren sind die methodischen Möglichkeiten und damit auch das Verständnis für die Komplexität und Redundanz der Immunantwort stark gewachsen. Eine erste systematische Analyse der verschiedenen Spezifitäten, die in ATG vorhanden sind, hat zur Identifizierung einer Reihe von Antikörpern gegen funktionelle Oberflächenmoleküle auf Lymphozyten geführt (Bonnefoy-Bérard N et al., 1991). Verschiedene Arbeitsgruppen, die z. T. sehr unterschiedliche ATG-Präparationen verwendeten, konnten zeigen, dass ATG eine Reihe von spezifischen Antikörpern enthalten, die gegen funktionelle Oberflächenmoleküle auf T-Zellen (CD2, CD3, CD4 und CD8), B-Zellen (CD19, CD20 und CD21) sowie gegen HLA-Antigene, Adhäsionsmoleküle (CD11a und CD18) und Aktivierungsmarker (CD25) gerichtet sind (Smith AG et al., 1983; Raefsky EL et al., 1986; Bonnefoy-Bérard N et al., 1991).

In dieser Arbeit wurden die verschiedenen ATG-Präparationen, die momentan kommerziell zur Verfügung stehen, auf mögliche Unterschiede und Gemeinsamkeiten in ihren Spezifitäten untersucht. Hierzu haben wir, wie auch die oben zitierten Arbeitsgruppen, die verschiedenen ATG-Präparate mit Fluoreszenz markierten, monoklonalen Antikörpern (mAk) in einem kompetitiven Immunfluoreszenz-Assay eingesetzt. Die untersuchten Spezifitäten sind in Tab. 5 (S. 49) zusammengefasst und orientieren sich an den bereits in der Literatur beschriebenen. Mit Ausnahme von ATG 1 konnte zwischen den verschiedenen ATG kein signifikanter Unterschied im Spektrum der in ihnen enthaltenen Spezifitäten festgestellt werden. ATG 1 wird durch Immunisierung von Kaninchen mit der T-Zell-Linie Jurkat hergestellt. Diese T-Zell-Linie ist eine CD4⁺ T-Zell-Linie, die kein CD8 exprimiert; wogegen auch keine Spezifität in ATG 1 nachgewiesen werden konnte. Dieses Ergebnis konnte durch eine Western-Blot-Analyse mit biotinylierten Zelloberflächenmolekülen bestätigt werden. Darüber hinaus konnten in dieser Arbeit für ATG 1 ebenfalls keine Spezifitäten gegen CD11a, CD18 und CD45R0 nachgewiesen werden. Von der in unserem Labor verwendeten

Jurkat-Zell-Linie werden diese Antigene relativ zur jeweiligen Immunfluoreszenz-Färbung im Durchflusszytometer nur schwach exprimiert. Eine genaue Charakterisierung der zur Produktion von ATG 1 verwendeten Jurkat-Zell-Linie liegt nicht vor. Ob die zur Immunisierung verwendete Tierart (Kaninchen oder Pferd) einen Einfluss auf das Spektrum der Spezifitäten in den verschiedenen ATG-Präparationen hat, konnte anhand der Ergebnisse dieser Arbeit nicht festgestellt werden.

Unterschiede im Gehalt verschiedener Spezifikationen lassen sich grundsätzlich zwischen den ATG-Präparaten darstellen und sind zu erwarten. Diese Unterschiede ergeben sich in erster Linie aus den zur Immunisierung eingesetzten Zellen, aber auch Unterschiede in der immunisierten Spezies oder der Herstellung (Art der Aufreinigung) können dazu beitragen. N. Bonnefoy-Bérard et al. (1991) versuchten einzelne Spezifitäten, wie CD3, CD5, CD11a, CD18 und CD45, in verschiedenen Präparationen von ATG quantitativ zu beschreiben. Hierbei ist zu beachten, dass eine ganze Reihe von Interaktionen innerhalb der kompetitiven Immunfluoreszenz nicht kontrolliert werden können. Als Kompetitoren wurden von N. Bonnefoy-Bérard et al. (1991) wie auch von uns mAk mit definierter Spezifität eingesetzt. Alle untersuchten Oberflächenmoleküle präsentierten jedoch mehr als nur ein Epitop. Für das Molekül CD4 (55 Kilodalton, kD) sind beispielsweise mindestens sechs verschiedene Epitope beschrieben. Sterische Einflüsse sowie die unterschiedlichen Affinitäten und Aviditäten der in ATG enthaltenen Antikörper lassen sich ebenfalls nicht quantifizieren.

Jede Wirksamkeitsuntersuchung von ATG muss berücksichtigen, dass über die Bindung verschiedener Epitope eines Oberflächenmoleküls unterschiedliche intrazelluläre Signalwege aktiviert werden können und eine antagonistische oder agonistische Wirkung kann nur monoklonalen Antikörpern eindeutig zugeordnet werden. Der Fall „Tegenero“ ist hierfür ein anschauliches Beispiel (Liedert B et al., 2007; Stebbings R et al., 2007).

ATG enthalten außerdem eine große Vielzahl von Spezifitäten mit z. T. gegenteiligen Funktionalitäten, die sich in ihrer Wirkung auf die jeweilige Zelle aufheben können. Beispielsweise sind Antikörper gegen CD3 und CD2 in der Lage, T-Zellen zu aktivieren, für Antikörper gegen CD4 oder CD18 wurde hingegen ein hemmender Effekt auf die T-Zell-Aktivierung beschrieben (Bank I & Chess L, 1985; Dongworth DW et al., 1985; Kabelitz D, 1990; Bonnefoy-Bérard N et al., 1991). Wie in dieser Arbeit nachgewiesen, sind in allen untersuchten ATG auch Spezifitäten gegen CD95 (Fas/Apo-1) enthalten und L. Genestier et al. (1998) sowie eigene Ergebnisse haben gezeigt, dass ATG eine Apoptose in aktivierten T-Zellen induzieren können. In Kapitel V 2.3 der Diskussion (Programmierter Zelltod) wird auf die Spezifität gegen CD95 und die Induktion von Apoptose durch ATG eingegangen.

Das Wissen über die Verteilung der Spezifitäten in ATG und die Funktion der jeweiligen Oberflächenmoleküle können zwar Hinweise auf Wirkmechanismen geben, sie reichen jedoch als Beleg für eine Wirkung nicht aus.

2 Die Wirkmechanismen der ATG

Ihre Wirksamkeit vermitteln ATG über ihre spezifische Bindung an Lymphozyten, hier im Besonderen T-Lymphozyten. Intensive Studien über die Bedeutung von Subpopulationen, wie den CD4⁺ und CD8⁺ T-Lymphozyten sowie CD56/57⁺ NK-Zellen und B-Lymphozyten in der ATG-Therapie, haben für die klinische Beurteilung der Wirksamkeit keine entscheidenden Fortschritte erbracht. Nach wie vor ist die Anzahl der im peripheren Blut ermittelten Lymphozyten der zuverlässigste Parameter für das klinische Monitoring der Therapie mit ATG (Grosse-Wilde H et al., 1981; v. Kiparski A et al., 1990; Kaden J et al., 1992; Döcke WD et al., 1994).

2.1 Lymphozytopenie

ATG induzieren eine starke Reduktion der Lymphozyten im peripheren Blut. Diese Lymphozytopenie tritt bereits innerhalb von einer Stunde nach der ersten Behandlung auf und hält über die Dauer der Verabreichung an. Erst innerhalb von ein bis sechs Wochen (hier gibt es eine große Variabilität unter den Patienten) nach Beendigung der ATG-Behandlung werden die Normwerte für die Zahl der Lymphozyten im Blut wieder erreicht (Chatenoud L et al., 1982). Ein Vergleich der Subpopulationen von Lymphozyten (CD2⁺, CD4⁺, CD8⁺) zeigte nach Rekonstitution des Blutbildes keine großen Unterschiede in ihrer Verteilung (Bock AH et al., 1995; Bonnefoy-Bérard N & Revillard JP, 1996; Müller TF et al., 1997). Für ATG 1 konnte jedoch ein niedrigeres Verhältnis von CD4⁺ zu CD8⁺ Zellen beobachtet werden, welches über mehrere Monate nach der Behandlung mit ATG 1 erhalten blieb. Nach der Gabe einer hohen Einzeldosis von ATG 1 konnte außerdem eine Verstärkung des Zytokinmusters von Th₂-Zellen beobachtet werden (Kaden J et al., 2001). Experimente in Primaten haben außerdem gezeigt, dass sich die Depletion nicht nur auf die Zellen im Blutkreislauf bezieht, sondern sich bis ins sekundäre Lymphgewebe erstreckt (Preville X et al., 2001).

Diese ausgeprägte Lymphozytopenie wird als der entscheidende Mechanismus für die Wirksamkeit der ATG in der klinischen Transplantation angesehen (Hale DA, 2004). F_c-abhängige Mechanismen, darunter die klassische Aktivierung des Komplementsystems sowie die Opsonisierung und Phagozytose durch Makrophagen, dürften hierbei eine wichtige Rolle spielen (Bonnefoy-Bérard N & Revillard JP, 1996).

In dieser Arbeit wurde gezeigt, dass *in vitro* die Bindung von ATG an Lymphozyten bzw. PBMC sehr gut mittels indirekter Immunfluoreszenz darstellbar ist. Auch die Funktionalität des F_c-Anteils lässt sich *in vitro* effektiv im komplement-abhängigen Zytotoxizitätstest überprüfen. Alle von uns untersuchten ATG-Präparationen zeigten dabei eine vergleichbare F_c-vermittelte Zytotoxizität mit einer ED₅₀ zwischen 2 und 20 µg/ml, gemessen mit PBMC.

Aus Gründen der Standardisierbarkeit wurde kommerziell erhältlichliches Kaninchenkomplement verwendet. Von der Aktivität *in vitro* lässt sich jedoch keinesfalls direkt auf die Wirksamkeit *in vivo* schließen. Zwar wird der klassische Weg der Komplementaktivierung *in vivo* von Kaninchen-Immunglobulin (Ig) noch relativ gut, von Pferde- und Maus-Ig jedoch nur schwach aktiviert. Außerdem können kernhaltige Zellen den Membran angreifenden Komplex (C5b-9) durch Exozytose oder Internalisierung und Degradation abwehren (Bonney-Bérard N & Revillard JP, 1996). Es sei an dieser Stelle noch einmal deutlich betont, dass sich die verschiedenen ATG-Produkte sowohl *in vivo* als auch *in vitro* voneinander unterscheiden, es existieren aber keine wissenschaftlichen Erkenntnisse, die eine direkte Korrelation zwischen *in vitro* Daten und *in vivo* Wirksamkeit ermöglichen.

Ein sigmoidaler Kurvenverlauf der Dosis-Wirkungsbeziehung, der sich für eine Berechnung von ED₅₀-Werten gut eignet, wurde in dieser Arbeit am ehesten mit frisch isolierten PBMC erreicht. Hieraus ergibt sich eine spenderabhängige Variabilität, die für die Bewertung der Aktivität der verschiedenen ATG in diesem System zu berücksichtigen ist.

Die Versuche zur komplement-abhängigen Zytotoxizität (complement-dependent cytotoxicity, CDC) wurden in Hinblick auf ihre Anwendbarkeit als Test für die Wirksamkeitsprüfung *in vitro* im Rahmen der Chargenprüfung untersucht. In Kapitel V 4 (Wirksamkeitsprüfung von Anti-T-Lymphozyten-Globulinen) wird hierauf eingehend Bezug genommen.

Um die Eignung des komplement-abhängigen Zytotoxizitätstestes für die Verwendung als Wirksamkeitstest beurteilen zu können, sollen im Folgenden weitere, in der Literatur beschriebene Mechanismen besprochen werden, die an der Depletion von Lymphozyten durch ATG in der klinischen Situation beteiligt sein können.

Die Rolle der Opsonisierung mit anschließender Phagozytose und die Antikörper abhängige zellvermittelte Zytolyse (antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity, ADCC) durch F_c-Rezeptor tragende Zellen sind für ATG *in vivo* nicht geklärt (Bonney-Bérard N & Revillard JP, 1996; Hale DA, 2004). Für viele mAk, wie Rituximab, gelten CDC und ADCC allerdings als gesichert. Alle drei bisher genannten Mechanismen CDC, Phagozytose und ADCC hängen von der Subklasse und der Funktionalität der F_c-Region der Antikörper ab. Experimente mit F(ab)₂-Fragmenten und verschiedenen Isotypen könnten die Bedeutung dieser Mechanismen an der Wirksamkeit *in vivo* bestätigen, es wird jedoch sehr schwer sein, den jeweiligen Anteil dieser Mechanismen zu bestimmen.

Ergebnisse von J. T. Wong et al. (1990) lassen für den mAk OKT3 einen weiteren Mechanismus zu. Über die beiden Bindungsstellen des mAk für das Molekül CD3 können zwei Zellen miteinander vernetzt werden, sodass es zu einer Verbindung kommt, bei der scheinbar eine zytotoxische T-Zelle auf ihre natürliche Zielzelle getroffen ist – eine durch Antikörper ausgelöste TCR-abhängige zellvermittelte Zytolyse. Dieser Mechanismus ist prinzipiell auch auf die Antikörper, die in ATG enthalten sind, übertragbar. Im Gegensatz zu

den bisher betrachteten Mechanismen zur Depletion von Lymphozyten ist dieser jedoch von der jeweiligen F_c-Region des Antikörpers unabhängig, er muss lediglich, wie jeder vollständige Antikörper, mindestens zwei funktionale Bindungsstellen besitzen.

Die in der Klinik zu beobachtende rasche Lymphozytopenie kann aber auch durch eine verstärkte Adhäsion der T-Zellen an das Endothel verursacht werden. Für OKT3 konnte gezeigt werden, dass die Aktivierung über den TCR/CD3-Komplex zu einer erhöhten Expression von Adhäsionsmolekülen, wie CD11a und CD11b, führt (Wong JT et al., 1990; Ten Berge RJM et al., 1995). Prinzipiell ist dieser Mechanismus auch auf ATG übertragbar. In dieser Arbeit konnte mittels kompetitiver Immunfluoreszenz gezeigt werden, dass ATG Spezifitäten gegen CD3 enthalten und die von ATG induzierte Proliferation, gemessen mittels radioaktivem Thymidin (³H-TdR), mit üblichen T-Zell-Mitogenen, wie etwa dem Phytohämagglutinin (PHA) oder dem monoklonalen Antikörper (mAk) OKT3, vergleichbar ist. Darüber hinaus wurde gezeigt, dass ATG im Gegensatz zu OKT3 oder PHA in der Lage sind, gereinigte T-Lymphozyten zur Proliferation anzuregen. Die Ergebnisse zur Aktivierung von T-Zellen durch ATG werden im folgenden Kapitel diskutiert.

N. Bonnefoy-Bérard et al. (1992 B/C) beschreiben in Bezug auf die mitogene Eigenschaft der ATG auch den Einfluss inhibitorischer Signale, ausgelöst von Spezifitäten wie CD11a/CD18, CD4 und HLA DR. Inwieweit jedoch andere Spezifitäten, die ebenfalls in ATG enthalten sind, kompensatorisch wirken können, ist schwer und für die Situation *in vivo* wohl kaum abzuschätzen. Für die Beurteilung der Situation nach der Behandlung mit ATG oder OKT3 wäre dies jedoch von Bedeutung. Handelt es sich somit bei den Zellen, die nach der Lymphozytopenie wieder auftauchen, um Zellen, die aus dem peripheren Blut abgewandert sind, oder um neugebildete Zellen. Für Strategien, die Toleranz gegenüber dem Transplantat im Empfängerorganismus induzieren wollen, ist dieser Unterschied mitunter von entscheidender Bedeutung. Eine Reihe von präklinischen, aber auch klinischen Studien demonstriert die Bedeutung der T-Zell-Depletion für die Induktion von Toleranz (Kawai T et al., 1995; Knechtle SJ et al., 1997; Thomas JM et al., 1997; Li Y et al., 1999; Wells AD et al., 1999). Demgegenüber stehen allerdings Untersuchungen von Z. Wu et al. (2004), wonach in klinisch relevanten Mausmodellen homeostatisch neugebildete T-Zellen resistent gegenüber Strategien zur Toleranzinduktion sind (Wu Z et al., 2004).

2.2 T-Zell-Aktivierung

R. N. Levey und P. B. Medawar (1966) brachten die Überlegung einer „sterile activation“ in die Diskussion um die Wirkmechanismen der ALS/ATG ein: eine generelle Aktivierung von Lymphozyten, ähnlich der des Phytohämagglutinins (PHA), ohne immunologische Effektorfunktion.

ALS/ATG besitzen *in vitro* mitogene Eigenschaften, die mit denen anderer Agenzien, wie dem monoklonalen Antikörper OKT3 oder dem Standardmitogen PHA, vergleichbar sind (Bonnefoy-Bérard N et al., 1992 A/B). Mit den Ergebnissen dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass alle ATG eine vergleichbare mitogene Eigenschaft besitzen. ATG 1 zeigte dabei in den hier durchgeführten Proliferationsversuchen mit verschiedenen Spendern (n = 8) das vergleichsweise geringste mitogene Potenzial. Die Herstellung der ATG im Kaninchen oder Pferd scheint indes keine Auswirkung auf das mitogene Potenzial der ATG zu haben. Alle Produkte, die durch eine Immunisierung mit Thymozyten gewonnen werden, waren anhand ihrer mitogenen Eigenschaft nicht zu identifizieren. Hierbei ist zu bedenken, dass die Mitogenität der ATG stark von den Zellen des jeweiligen Spenders abhängt, die zur Quantifizierung der Proliferation eingesetzt werden.

Es wurde in dieser Arbeit bereits diskutiert, dass für ATG 1 im Gegensatz zu allen anderen ATG keine Spezifität für CD8 und CD45 dargestellt werden konnte. Untersucht wurden die beiden Isoformen CD45RA und CD45R0. Spezifitäten gegen CD45RA konnte von uns in keinem der ATG-Präparate nachgewiesen werden; CD45R0 war in allen untersuchten ATG-Präparaten nachweisbar, jedoch nicht in ATG 1. Diese beiden Isoformen werden auf naiven und auf Effektorleukozyten unterschiedlich stark exprimiert. Naive T-Zellen tragen verstärkt das Molekül CD45RA, wohingegen Effektor-T-Zellen stärker das Molekül CD45R0 exprimieren. T-Gedächtniszellen exprimieren dagegen beide Isoformen etwa gleich stark (Janeway CA et al., 2005). Den beschriebenen Unterschied in der Mitogenität der ATG einzelnen Spezifitäten zuzuordnen, bleibt spekulativ. An dieser Stelle soll trotzdem versucht werden, einen potenziellen Mechanismus für die Unterscheidbarkeit des ATG 1 gegenüber den anderen Präparaten zu diskutieren.

Für die effektive Signalweiterleitung über den T-Zell-Rezeptor-Komplex und seinen Corezeptor nimmt man an, dass durch die Bindung eines Peptid:MHC-Liganden der T-Zell-Rezeptor (TCR), der Corezeptor und CD45 zusammengebracht werden müssen. Die Protein-Tyrosin-Phosphatase CD45 aktiviert die Protein-Tyrosin-Kinasen des TCR/CD3-Komplexes und des Corezeptors; über diese Kinase-Aktivität können die weiteren Signalübertragungswege zur Aktivierung der T-Zelle eingeleitet werden. Effektor-T-Zellen und T-Gedächtniszellen exprimieren CD45R0, das mit dem T-Zell-Rezeptor-Komplex assoziiert ist und so die Signalgebung des Rezeptors erleichtert. Im Gegensatz dazu exprimieren naive T-Zellen verstärkt die Isoform CD45RA, die dazu nicht in der Lage ist (Janeway CA et al., 2005). Es ist leicht denkbar, dass geeignete Spezifitäten eine ähnliche räumliche Nähe der beteiligten Faktoren (Rezeptoren) induzieren können, wie hier für den Peptid:MHC-Liganden angenommen. Zusammen mit dem Fehlen von Spezifitäten gegen CD8 ließe sich so die geringere Mitogenität von ATG 1 relativ zu den anderen getesteten ATG erklären.

Anders als bei Standardmitogenen (z. B. PHA) oder OKT3 ist allen hier untersuchten ATG gemeinsam, dass sie gereinigte T-Lymphozyten zur Proliferation anregen. Es konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass der zeitliche Verlauf der Aktivierung von PBMC versus gereinigte T-Lymphozyten durch ATG vergleichbar ist. Ein relatives Maximum der Proliferation konnte zwischen dem dritten und sechsten Tag nach Stimulation gemessen werden. Wie in den Versuchen zu den Spezifitäten der ATG gezeigt, enthalten ATG eine ganze Reihe von T-Zell spezifischen Antikörpern, darunter anti-CD3, anti-CD2 und anti-CD28. Es ist daher leicht vorstellbar, dass die Aktivierung gereinigter T-Zellen entweder direkt über CD2 erfolgt, hier wird nach Daten von S. C. Meuer et al. (1984) kein zweites Signal benötigt, und/oder die in ATG enthaltenen Spezifikationen gegen CD28 liefern das nötige zweite Signal für die Aktivierung naiver T-Zellen über den TCR/CD3-Komplex. Beide „Arten“ der T-Zell-Aktivierung durch ALS/ATG wurden auch von anderen Arbeitsgruppen beschrieben (Grasbeck R et al., 1963; Bonnefoy-Bérard N et al., 1992 A/B).

Eine ALS-Präparation, bei der mittels kompetitiver Immunfluoreszenz keine Spezifitäten gegen CD2 und CD3 detektiert werden konnten, zeigte keine T-Zell mitogenen Eigenschaften, was die Bedeutung von anti-CD2 und anti-CD3 Antikörpern für die Mitogenität von ATG/ALS bestätigt (Bonnefoy-Bérard N et al., 1991 & 1992 B). Angaben zu dieser ALS-Präparation über die Wirksamkeit *in vivo* konnten der Veröffentlichung nicht entnommen werden.

N. Bonnefoy-Bérard et al. (1992 A) haben außerdem beschrieben, dass mit steigenden ALS-Konzentrationen (> 500 µg/ml) eine immer geringer werdende Mitogenität zu beobachten ist. Sie soll von der ebenfalls steigenden Anzahl inhibitorischer Signale ausgelöst werden, die von Spezifitäten gegen CD11a, CD18, CD4 und HLA DR ausgehen könnten. Unter der Voraussetzung, dass die Aktivierung von T-Zellen durch ALS/ATG bereits bei einer geringeren Konzentration in den Sättigungsbereich gelangt als die inhibitorischen Signale, ist ein solches Modell denkbar. Die im Rahmen dieser Arbeit gemachten Beobachtungen haben jedoch gezeigt, dass ATG *in vitro* in diesem hohen Konzentrationsbereich einen starken zytotoxischen Effekt vermitteln, der bereits nach wenigen Stunden nachweisbar ist und die Proliferation der T-Zellen überdeckt. Wie in Kapitel IV2 (Komplement-unabhängiger Zelltod, S. 49) erläutert, haben ATG-Konzentrationen (> 500 µg/ml) zu hohen Zellzahlverlusten im Durchflusszytometer geführt, was durch Auszählen der Zellen unter dem Mikroskop bestätigt werden konnte. Der von ATG induzierte Zelltod wird ausführlich im folgenden Kapitel diskutiert.

N. Bonnefoy-Bérard et al. (1992 B) berichten auch von inhibierenden Eigenschaften der ALS auf die T-Zell-Proliferation bei einer Konzentration von etwa 1,25 mg/ml. Diese Inhibition ist unabhängig von Monozyten, inhibiert die Expression von CD25 und die Sekretion von Interferon- γ . Den Konzentrationsbereich, den N. Bonnefoy-Bérard et al. (1992 B) für die

Aktivierung und Inhibition der T-Zell-Proliferation angeben, entspricht den in dieser Arbeit beschriebenen Resultaten mit dem Unterschied, dass N. Bonnefoy-Bérard et al. (1992 B) keinen zytotoxischen Effekt beobachtet haben. In dieser Arbeit konnte jedoch ab 500 µg/ml ein von der Komplementaktivierung unabhängiger zytotoxischer Effekt beobachtet werden (s. oben).

Die Schlussfolgerung von N. Bonnefoy-Bérard et al. (1992 B), dass Serumkonzentrationen von über 1 mg/ml in der klinischen Anwendung von ATG erreicht werden, entspricht nicht den eigenen Berechnungen (s. Kapitel IV2 Komplement-unabhängiger Zelltod, S. 49).

Die erste Injektion von OKT3 führt bei der Mehrzahl der Patienten zu starken Nebenreaktionen, wie Schüttelfrost, hohes Fieber, Kopfschmerzen und Phasen mit Erbrechen und Durchfall. Man bezeichnet diese Reaktion als Aktivierungs- oder Zytokin-Syndrom. Dieses Syndrom ist die Folge einer massiven Ausschüttung von Zytokinen. Die polyklonale Aktivierung von T-Zellen durch OKT3 in Gegenwart von Monozyten/B-Zellen induziert die Ausschüttung von Zytokinen, die ihrerseits Monozyten aktivieren. Es kommt zu hohen Konzentrationen von TNF- α und INF- γ , ebenso wird IL-6 freigesetzt. Andere für Monozyten/Makrophagen typische Zytokine wie IL-1 β und INF- α finden sich jedoch kaum im Blutkreislauf. ALS/ATG induzieren ein deutlich schwächeres Zytokin-Syndrom. Der Unterschied mag auf einer verschiedenen Dosierung beruhen oder darin liegen, dass ALS/ATG eine Reihe von diversen Spezifitäten gegen T-Zellen enthalten. Damit reduziert sich zum einen der relative Anteil an aktivierenden (anti-CD3, -CD2) Antikörpern, zum anderen kommen blockierende Antikörper wie gegen CD4, CD11a, CD18 oder auch HLA-DR hinzu (Dongworth DW et al., 1985; Bank I & Chess L, 1985; Carrera AC et al., 1987; Ruggiero G et al., 1991).

2.3 Programmierter Zelltod

Für das Verständnis der klinischen Wirksamkeit von ATG ist die Aufklärung der molekularen Mechanismen der komplement-unabhängigen, zytotoxischen Wirkung von erheblicher Bedeutung. Menschliches Komplement (bei Anwendung von ATG im Patienten) ist sehr viel weniger effizient als Kaninchenkomplement, weswegen enorme zytolytische, aber auch die breite immunsuppressive Wirkung von ATG nicht allein durch die F_c-abhängige Zytotoxizität erklärt werden kann. ATG können bei bestimmten Zielzellen Fas-abhängige Apoptose auslösen; darüber hinaus konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass ATG auch in der Lage sind, einen komplement-unabhängigen Zelltod in Fas-resistenten Zell-Linien und T-Zell-Klonen, die resistent gegenüber aktivierungsinduziertem Zelltod (AICD) sind, auszulösen.

In Kompetitionsversuchen konnte dargestellt werden, dass ATG entsprechende Antikörper-Spezifitäten gegen das Molekül CD95 (Fas/Apo-1) enthalten. Ferner konnte nachgewiesen

werden, dass die durch ATG initiierte Fas-abhängige Apoptose und/oder der AICD durch Fas-neutralisierende Antikörper inhibiert werden kann.

Einen ähnlichen Nachweis für den über CD95 (Fas/Apo-1) ausgelösten programmierten Zelltod konnte auch von der Gruppe um J. P. Revillard gezeigt werden (Genestier L et al., 1998). Nach ihren Ergebnissen sind ATG in der Lage, spezifisch Apoptose in aktivierten T-Lymphozyten und in B-Zellen auszulösen. Die Apoptose aktivierter T-Zellen ist IL-2 abhängig und kann vollständig durch Fas-neutralisierende Antikörper inhibiert werden (Bonney-Bérard N et al., 1994; Genestier L et al., 1998).

Im Gegensatz zu den Ergebnissen der Gruppe um J. P. Revillard konnte in dieser Arbeit der ATG induzierte programmierte Zelltod durch Fas-neutralisierende Antikörper nur teilweise, um etwa 25 bis 50 % inhibiert werden. Die DNA-Fragmentierung, als Nachweis von Apoptose, wurde hierbei um 38 bis 60 % reduziert. Es fällt auf, dass sich ATG 1 auch bei diesen Untersuchungen von den anderen ATG quantitativ unterscheiden lässt. Der Grund hierfür liegt wahrscheinlich wieder in der für die Immunisierung verwendeten Zell-Linie Jurkat; sie ist eine Fas-positive Zell-Linie. Anhand der Immunfluoreszenz-Färbung im Durchflusszytometer von der in unserem Labor verwendeten Jurkat-Zell-Linie wird Fas offensichtlich stark exprimiert.

Zusammen mit der Beobachtung, dass ATG auch in der Lage sind, Apoptose in Fas-resistenten Zell-Linien sowie in AICD-resistenten T-Zell-Klonen auszulösen, muss davon ausgegangen werden, dass ATG auch Fas-unabhängige Apoptose auslösen. Das könnte mit der Vielzahl an bereits nachgewiesenen Spezifitäten erklärbar sein, über die ebenfalls Apoptose in T-Zellen induziert werden kann. Zu denken sei hier an Spezifitäten, wie z. B. gegen HLA der Klasse I, CD2, CD45 (Wesselborg S et al., 1993; Mollereau B et al., 1996; Klaus SJ et al., 1996; Woodle SE et al., 1997; Skov S et al., 1997; Genestier L et al., 1997). Auch wenn sie bisher noch nicht in ATG nachgewiesen wurden, können neben Fas auch andere Spezifitäten aus der Tumor-Nekrose-Faktor-Rezeptor-(TNFR)Familie hierbei eine Rolle spielen: z. B. der TNFR selbst oder die TRAIL-Rezeptoren DR-4 und DR-5 (Ashkenazi A, 2002).

Apoptose ist über die morphologischen Veränderungen einer Zelle definiert, bei denen Caspasen eine entscheidende Rolle spielen (Leist M & Jaattela M, 2001). Die Spezifität der Caspasen ermöglicht eine selektive Inhibition ihrer enzymatischen Aktivität. Mit geeigneten Membran gängigen Peptiden können Caspasen, die an der intrazellulären Signalweiterleitung des Rezeptor vermittelten programmierten Zelltodes beteiligt sind, spezifisch inhibiert werden. Die Bildung von DNA-Fragmenten lässt sich so nahezu vollständig blockieren (Zhu H et al., 1995; Iyer R & Holian A, 1997; Garcia-Calvo M et al., 1998; Hirata H, et al., 1998; Sawada M et al., 2003).

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass die Bildung von DNA-Fragmenten nach ATG-Inkubation von Fas-sensitiven Zielzellen durch einen Inhibitor der Caspase-1 (Z-VAD-FMK) für alle ATG-Präparationen komplett inhibiert werden kann. Auch die Induktion von Zelltod durch ATG ließ sich in Abhängigkeit von der ATG-Konzentration komplett inhibieren. Mit steigender ATG-Konzentration war jedoch zu beobachten, dass sich, gemessen an der Kontrolle, die Bildung von DNA-Fragmenten noch immer komplett inhibieren ließ, jedoch die Anzahl toter Zellen relativ zur Kontrolle anstieg.

Für den in dieser Arbeit verwendeten Inhibitor der Caspase-1 wurde beschrieben, dass neben der Caspase-1 auch die Caspasen-3, -4 und -7 inhibiert werden, was möglicherweise auch die in der Literatur beschriebene komplette Inhibition der DNA-Fragmentierung erklärt (Zhu H et al., 1995; Iyer R & Holian A, 1997; Garcia-Calvo M et al., 1998; Sawada M et al., 2003).

Von C. Berndt et al. (1998) wurde ein Zelltod beschrieben, der, vermittelt über CXCR4 und CD4, unabhängig von CD95 ist; innerhalb von 2 Stunden abläuft und unabhängig von den bis dahin bekannten Caspasen ist. Für diesen Nachweis wurde der gleiche Inhibitor der Caspase-1 verwendet, wie in dieser Arbeit. Spezifitäten gegen CD4 sind in ATG enthalten, und gegen CXCR4 sind sie ebenfalls denkbar. Wenn ATG diesen Zelltod induzieren können, ist er abhängig von der jeweiligen ATG-Konzentration, bei der sich, wie oben beschrieben, die DNA-Fragmentierung noch komplett inhibieren lässt, jedoch die Induktion von Zelltod gemessen werden konnte. Für diesen „schnellen“ Caspase unabhängigen Zelltod wurde außerdem beschrieben, dass eine Spaltung der Poly-(ADP-Ribose)-Polymerase (PARP) nicht nachweisbar war. In dieser Arbeit konnte die Spaltung von PARP im durch ATG induzierten Zelltod ebenfalls nicht gezeigt werden; eine Beteiligung von Caspasen muss jedoch als sicher angenommen werden. Es ist denkbar, dass die hohe Anzahl von Antikörpern mit verschiedenen Spezifitäten in ATG den Nachweis für die Spaltung von PARP beeinflusst. Anhand der Ergebnisse aus dem Kinase-Assay kann darauf geschlossen werden, dass ATG auch intrazelluläre Proteine erkennt.

Inhibitoren der Caspase-3 (Ac-DMQD-CHO) und -6 (Ac-VEID-CHO) zeigten einen additiven Effekt, sodass mit beiden Inhibitoren eine Reduktion der DNA-Fragmentierung zu beobachten war, jedoch nicht in dem Maße, wie durch den Inhibitor der Caspase-1. Einen Einfluss auf die Induktion von Zelltod durch ATG konnte für beide Caspase-Inhibitoren (Caspase-3 und/oder Caspase-6 Inhibitor) nicht beobachtet werden. Dies entspricht den Angaben der Literatur, wonach beide Inhibitoren die Bildung von DNA-Fragmenten nach Fas-abhängiger Apoptose inhibieren, jedoch keinen Einfluss auf die Induktion des Zelltods haben (Hirata H et al., 1998).

Mit dem in dieser Arbeit verwendeten Inhibitor der Caspase-9 (Ac-LEHD-CHO) ließ sich eine leichte Reduktion der DNA-Fragmentierung beobachten und keinen Effekt auf die Bildung

toter Zellen. Dieser Effekt war zwischen der Positivkontrolle (anti-Fas mAk) und ATG vergleichbar.

Nach den in diesem Kapitel beschriebenen Ergebnissen zeigt der durch ATG induzierte komplement-unabhängige Zelltod eine große Ähnlichkeit zur Fas-abhängigen Apoptose. Die verschiedenen ATG-Präparationen wiesen dabei untereinander keine qualitativen, und nur geringe quantitative Unterschiede auf. Die Unterschiede, die in den Versuchen zur Neutralisation des anti-Fas mAk und zur Inhibition von Caspasen zwischen den verschiedenen ATG und der Positivkontrolle (anti-Fas mAk) zu beobachten waren, machen jedoch deutlich, dass ATG eine breit gefächerte zytotoxische Wirkung auf verschiedene Zellpopulationen ausüben, die alle mehr oder weniger eine Rolle in der klinischen Wirksamkeit von ATG spielen können. Bei dem Fas- und komplement-unabhängigen Zelltod könnte es sich möglicherweise auch um einen Zelltod handeln, der als „Onkose“ beschrieben wird (Majno G & Joris I, 1995; Zhang C et al., 1998; Ma F et al., 2001). Es ist zudem nicht auszuschließen, dass noch andere, bisher nicht beschriebene Mechanismen einen Zelltod über die Bindung von ATG an eine Zielzelle auslösen.

3 Selektivität (Anergie/Toleranz)

Schon kurz nach ihrer Entdeckung durch B. H. Waksman, M. F. A. Woodruff und Kollegen (Waksman BH et al., 1961; Woodruff MFA & Anderson NF, 1963 & 1964; Gray JG et al., 1964; Sacks JH et al., 1964) wurde der immunsuppressiven Wirkung von ALS eine große Bedeutung in der Transplantation zugeschrieben. Leider konnten die Hoffnungen aus verschiedenen Gründen nicht vollständig erfüllt werden. Probleme ergaben sich z. B. aus der Immunogenität der ALS und der nur schwer standardisierbaren Produktion. Auch minderten die Erfolge, die mit anderen Immunsuppressiva, wie Azathioprine und Prednisolon, v. a. aber mit Cyclosporin A erreicht wurden, die Akzeptanz der ALS-Therapie. Trotzdem waren hoch potente ALS-Präparationen für die ersten Strategien zur Induktion spezifischer Toleranz im Empfängerorganismus ein wichtiges Werkzeug (Monaco AP et al., 1966; Lance EM & Medawar PB, 1969). Welche Mechanismen der Induktion und dem Erhalt von Toleranz gegenüber einem Transplantat zugrunde liegen, ist noch nicht bekannt, aber man geht davon aus, dass es sich um aktive, hoch regulierte und mehrstufige Prozesse handelt (Zheng XX et al., 2003).

In präklinischen Studien ist die transiente Depletion von T-Zellen im Empfängerorganismus unter Verwendung von spezifischen Antikörpern gegen T-Zellen Teil einer Strategie, mit der Toleranz indiziert werden soll (Kawai T et al., 1995; Knechtle SJ et al., 1997; Thomas JM et al., 1997). Auch in klinischen Studien werden ähnliche Strategien getestet (<http://www.immunetolerance.org/>). Das wachsende Verständnis über die Funktion regulatorischer T-Zellen (T_{regs}) lässt die Bedeutung der Depletion von T-Zellen zur Induktion

spezifischer Toleranz allerdings hinterfragen (Waldmann H et al., 2006). Die Rolle und Bedeutung der ATG in der klinischen Transplantation bleibt also weiterhin offen und zu diskutieren.

Drei Mechanismen, die für einen selektiven Mechanismus gegenüber alloreaktiven T-Zellen eine Rolle spielen können, müssen hierbei betrachtet werden: klonale Deletion, Anergie und eine Beeinträchtigung der Signale, die zur Aktivierung des Immunsystems durch Alloantigene führen.

Ubiquitäre Selbst-Antigene, die in großer Zahl in der Peripherie exprimiert werden, führen zur Anergie oder klonalen Deletion von Lymphozyten. Eine klonale Deletion gegenüber Transplantatantigenen ließe sich mit Antikörpern, die spezifisch alloreaktive T-Zellen erkennen, erreichen. ATG enthalten zwar Antikörper gegen CD25 und CD95 und sind in der Lage, Fas-abhängige Apoptose zu induzieren, eine selektive Deletion von aktivierten T-Zellen *in vivo* konnte jedoch bisher noch nicht nachgewiesen werden.

4 Wirksamkeitsprüfung von Anti-T-Lymphozyten-Globulinen

In Hinblick auf eine Chargen- und Wirksamkeitsprüfung *in vitro* lassen sich modellhaft vier Effekte unterscheiden, die von ATG aufgrund ihrer spezifischen Bindung an T-Lymphozyten unmittelbar ausgeübt werden können:

1. Die Reihe der F_c-abhängigen, zytotoxischen Mechanismen, wie komplement-abhängige Zell-Lyse, zellvermittelte Zytotoxizität und Opsonierung durch Monozyten/Makrophagen.
2. Eine von ATG ausgelöste Aktivierung, die zu Proliferation, Produktion und Sezernierung von Zytokinen, Modulation von Zelloberflächenantigenen und Apoptose führen kann.
3. Eine über Todesrezeptoren (z. B. Fas) von ATG direkt induzierte Apoptose.
4. Die Maskierung von Rezeptoren für die Antigenerkennung sowie der Rezeptoren für die Zell-Zell- und/ oder Zell-Matrix Interaktionen.

Entsprechend diesem Modell wurden in der vorliegenden Arbeit die Eigenschaften der verschiedenen ATG-Produkte *in vitro* dargestellt. Die Funktionalität der F_c-abhängigen Mechanismen wurde in einem komplement-abhängigen Zytotoxizitäts-Assay am Durchflusszytometer untersucht. Die Aktivierung von T-Lymphozyten wurde in einem Proliferations-Assay über den Einbau von radioaktivem ³H-Thymidin gemessen. Mit der gleichen Messmethode wurde der Einfluss der ATG auf die gemischte Lymphozyten-Kultur untersucht; hier kann die Maskierung von Rezeptoren eine Rolle spielen. Die Induktion von Apoptose durch ATG wurde in verschiedenen Zellsystemen durch den Nachweis von Zelltod und DNA-Fragmentierung am Durchflusszytometer untersucht und charakterisiert. Darüber hinaus wurden in dieser Arbeit Untersuchungen zur Zusammensetzung der Spezifitäten in den verschiedenen ATG-Präparationen durchgeführt und biochemische Methoden zur Charakterisierung getestet.

Einer der beiden bereits existierenden *in vitro* Methoden basiert auf dem Prinzip der komplement-abhängigen Zytotoxizität. In einer neueren und verbesserten Variante lässt sich dieser Test anstatt im Mikroskop im Durchflusszytometer auswerten. Dies hat den Vorteil, dass eine viel größere Zahl an Zellen gemessen werden kann und die Beurteilung der Zellen nicht mehr einem subjektiven Urteil unterliegen. Für die Wirksamkeitsprüfung von ATG *in vitro* lassen sich mit einem komplement-abhängigen Lymphozytotoxizitäts-Assay zwei wichtige Funktionalitäten überprüfen: zum einen die spezifische Bindung an den Zielzellen, den Lymphozyten, zum anderen die Funktionalität des F_c-Teils.

Aufgrund der Ergebnisse dieser Arbeit wurde der komplement-abhängige Zytotoxizitätstest im Rahmen eines Ringversuches zur Evaluierung von Methoden zur Wirksamkeitsprüfung von ATG ausführlich bewertet. Inzwischen wurde die Methode ins Europäische Arzneibuch aufgenommen.

ATG können T-Zellen *in vitro* stimulieren. Diese Induktion der Proliferation von T-Lymphozyten ist konzentrationsabhängig. Versuche dieser Arbeit mit über mehreren Zehner-Potenzen reichenden Verdünnungsstufen zeigen, dass ATG in einem Konzentrationsbereich von 50 bis 150 µg/ml ihre maximale Mitogenität besitzen. In diesem Konzentrationsbereich ist die von ATG induzierte Proliferation mit üblichen T-Zell-Mitogenen, wie etwa PHA (Phytohämagglutinin) oder auch dem monoklonalen Antikörper OKT3, durchaus vergleichbar.

Im Gegensatz zu diesen Standardmitogenen sind ATG auch in der Lage, gereinigte T-Lymphozyten zur Proliferation anzuregen. Das Konzentrationsoptimum liegt dabei im Mittel etwas höher, bis etwa 300 µg/ml, und die Intensität der Proliferation ist geringer. Diese Art der T-Zell-Aktivierung ist über das Molekül CD2 möglich, für das Spezifitäten in ATG nachweisbar sind, nicht zuletzt auch durch den bereits als *in vitro* Test eingesetzten Rosetten-Inhibitionstest. Es ist aber auch denkbar, dass das co-stimulatorische Signal durch Spezifitäten, die gegen das Molekül CD28 gerichtet sind, von den ATG selbst ausgelöst werden. Beide Wege setzen jedoch im Normalfall die Interaktion mit Monozyten und deren Zytokin-Sekretion voraus.

Die Aktivierung von T-Lymphozyten durch ATG ist mit Sicherheit eine Eigenschaft, die allen ATG-Präparationen gemein ist, inwieweit diese Eigenschaft jedoch in Verbindung mit ihrer klinischen Wirksamkeit gebracht werden kann, ist äußerst schwer zu sagen. Daneben ist die Variabilität dieser Proliferations-Assays sehr groß, da man auf frisch isolierte Lymphozyten aus dem peripheren Blut angewiesen ist, die von Spender zu Spender starke Unterschiede in der Reaktivität aufweisen. Neben der dargestellten radioaktiven Methode ist es prinzipiell möglich, auf nicht radioaktive Alternativen, wie etwa den MTT-Test, auszuweichen.

Neben dem bereits dargestellten mitogenen Potenzial von ATG wurde von N. Bonnefoy-Bérard et al. (1992 A) beschrieben, dass die gemischte Lymphozyten-Kultur (mixed

lymphocyte reaction, MLR) durch ATG konzentrationsabhängig inhibiert werden kann. Über einen Konzentrationsbereich von 1 ng/ml bis 1 mg/ml konnte in den Versuchen dieser Arbeit kein MLR-spezifisch inhibierender Effekt nachgewiesen werden. Bei einer ATG-Konzentration von 100 µg/ml ist im autologen System deutlich die mitogene Eigenschaft zu erkennen. Bei Konzentrationen von 1 mg/ml zeigt sich eine deutliche Inhibition, die, wie in dieser Arbeit beschrieben, wohl eher auf einen zytotoxischen Effekt der ATG zurückgeführt werden kann.

Die MLR als *in vitro* Modell für die Transplantation eignet sich nach den Ergebnissen dieser Arbeit nicht zur Bewertung und Charakterisierung der Wirksamkeit von ATG.

Im Gegensatz zu den F_c -abhängigen, zytotoxischen Mechanismen, deren Voraussetzung lediglich die Bindung der ATG an die Zelle und ein funktionsfähiger F_c -Teil darstellt, ist für die Lymphozyten-Aktivierung möglicherweise eine spezifische Bindung einzelner Rezeptoren durch ATG nötig. Mit einem kompetitiven Immunfluoreszenz-Assay (komp. IF) lassen sich einzelne Spezifitäten aufgrund der Competition zwischen Fluoreszenz markierten, monoklonalen Antikörpern und ATG am Durchflusszytometer darstellen.

Die in ATG enthaltenen Spezifitäten sind bereits in früheren Arbeiten für einzelne, sehr unterschiedliche Produkte untersucht worden. Neben eigenen Untersuchungen wurde dieser Test auch von einigen Herstellern selbst durchgeführt. Neben T-Zell spezifischen Antigenen sind auch solche gegen B-Zellen (CD20), NK-Zellen sowie Monozyten und Makrophagen (CD16) enthalten; aber auch Aktivierungsmarker (CD25) und Adhäsionsmoleküle (CD11a und CD18) werden von ATG gebunden, sowie der Apoptose induzierende Rezeptor CD95 (Fas, Apo-1) konnte nachgewiesen werden (Bonney-Bérard N et al., 1991; Bourdage JS & Hamlin DM; 1995; Pistillo MP et al., 2002).

Die klinische Indikation der in dieser Arbeit untersuchten ATG ist für alle fünf Produkte gleich. Die Produkte unterscheiden sich jedoch zum einen in der für die Immunisierung gewählten Tierart (Kaninchen oder Pferd), zum anderen in dem für die Immunisierung verwendeten Agens (juvenile, gereinigte Thymozyten oder T-Zell-Linie Jurkat). Zusammen mit der klinischen Erfahrung und den gezeigten *in vitro* Daten wird deutlich, dass sich die oben erwähnten Unterschiede der ATG-Präparation in jeweils charakteristischen Produkteigenschaften widerspiegeln sollten. Sie darzustellen kann als Nachweis für die Spezifität der Methode angesehen werden. Eine schadhafte Charge als ideale Kontrolle konnte leider nicht verwendet werden, da eine solche Charge laut Hersteller nicht existiert. Neben der Darstellung spezifischer Produktunterschiede mit biochemischen Methoden wurden auch mögliche von ATG induzierte Signaltransduktionswege untersucht.

Eine sehr sensitive Methode, um spezifische Unterschiede der verschiedenen ATG-Produkte darzustellen, ist der Kinase-Assay. Nach Präzipitation von Zell-Lysat mit ATG und anschließender Inkubation des Präzipitats mit radioaktiv markiertem ATP lässt sich die

jeweilige Kinase-Aktivität im SDS-PAGE wiedergeben. Entsprechend der Bindungseigenschaften der verschiedenen ATG-Präparationen lassen sich Produkt spezifische Bandenmuster erkennen. In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass diese Banden für ein Produkt charakteristisch sind. Verschiedene Chargen eines Produktes zeigen in einem Versuchsansatz ein identisches Bandenmuster. Wie einleitend erwähnt, ließe sich mit dieser Methode sehr spezifisch die Chargenkonsistenz immer in Bezug auf eine Referenzcharge überprüfen. Eine biochemische Methode, die zwar nur beschreibend, dafür aber umfassend und spezifisch die Bindungscharakteristik der ATG wiedergibt und überprüfen kann, würde eine sinnvolle Ergänzung zur Wirksamkeitsprüfung darstellen.

Um die Spezifität der Methode zu überprüfen, wurde mit den im Kinase-Assay co-migrierenden Banden verschiedener Chargen eines Produktes ein sog. Peptide Map durchgeführt. Einzelne Banden wurden aus den Gelen gestanzt und mit der Protein-Peptidase V8 verdaut. Die so erhaltenen Proteinfragmente wurden erneut mittels SDS-PAGE aufgetrennt und autoradiografisch dargestellt. Die aus dem Verdau resultierenden Fragmente co-migrierender Banden wiesen ein gleiches Laufverhalten auf, was darauf hindeutet, dass es sich mit großer Wahrscheinlichkeit um die gleichen Proteine gehandelt hat.

Die Ergebnisse aus dem Kinase-Assay haben sehr gut gezeigt, dass trotz vergleichbarer klinischer Wirksamkeit den verschiedenen ATG-Präparationen eine individuelle Bindungscharakteristik zugeschrieben werden kann. Es stellte sich die Frage, ob diese für die ATG-Produkte spezifische Präzipitation von Kinase-Aktivitäten auch in einer für die ATG individuellen Bindung von Zelloberflächenmolekülen wiederzufinden ist. Durch Biotinylierung intakter Zellen lassen sich alle Zelloberflächenmoleküle kovalent markieren. Nach Immunpräzipitation des Zell-Lysats mit individuellen ATG werden die biotinylierten und präzipitierten Proteine elektrophoretisch getrennt und im Western-Blot mittels Chemilumineszenz dargestellt. Man erhält ein Spektrum der von ATG gebundenen Zelloberflächenmoleküle, das der jeweiligen Bindungscharakteristik der verschiedenen ATG-Präparationen entspricht. Es konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass, wie bereits im Kinase-Assay gesehen, qualitative und quantitative Unterschiede in der Bindung von Zelloberflächenmolekülen zwischen den ATG-Produkten bestehen. Verschiedene Chargen eines Produktes zeigen jedoch ein einheitliches Bandenmuster, womit die Homogenität der Chargen untereinander dargestellt ist. Ein weiterer Vorteil dieser Methode ist der Verzicht auf radioaktive Agenzien, was insbesondere den Einsatz für Routineuntersuchungen erleichtert. Unter der Verwendung kommerziell erhältlicher Gradientengele und einer Elektrophoreseeinrichtung, die es ermöglicht, die Bedingungen der Elektrophorese (Strom, Zeit und Temperatur) über den gesamten Lauf zu kontrollieren und zu dokumentieren, konnte die Methode standardisiert und die benötigte Zeit um etwa 25 % verringert werden, ohne

Verlust an Sensitivität und Auflösung. Der Vergleich von Chargen mittels Biotinylierung und Präzipitation von Zelloberflächenmolekülen kann so nach guter Vorbereitung innerhalb eines Tages (8 Std) durchgeführt werden. Innerhalb des Projektes wurden mit dieser Methode etwa 20 Chargen vier verschiedener Hersteller auf ihre Identität hin überprüft; hierbei wurden auch unterschiedliche Zellpopulationen (Zell-Linien, aktivierte T-Zell-Blasten und frisch isolierte, mononukleäre Zellen aus dem peripheren Blut) auf ihre Eignung für die Charakterisierung von ATG miteinander verglichen. In keinem der Experimente haben sich Unterschiede in der Qualität und Quantität der Bandenmuster bei den Chargen jeweils eines Herstellers gezeigt, sodass von einer Homogenität der Chargen gesprochen werden kann. Trotz interindividueller Unterschiede und oft nur gering exprimierter Oberflächenmoleküle eignen sich frisch isolierte mononukleäre Zellen am besten zum Vergleich der Chargen. Der Grund hierfür liegt möglicherweise darin, dass in diesen Ficoll-Hypaque gereinigten Zellpopulationen neben T-Lymphozyten auch alle anderen Zellpopulationen (Monozyten, natürliche Killerzellen, B-Lymphozyten) vertreten sind, mit denen ATG reagieren können.

VI ZUSAMMENFASSUNG

Anti-T-Lymphozyten-Globuline (ATG) sind Immunglobuline zur Anwendung am Menschen. Sie werden aus den Seren von Kaninchen oder Pferden gewonnen, die zuvor mit humanen Thymozyten oder einer etablierten humanen T-Zell-Linie immunisiert wurden. ATG besitzen ein sehr starkes immunsuppressives Potenzial. In der klinischen Anwendung werden sie überwiegend bei Organtransplantationen, Knochenmarktransplantationen und zur Behandlung einzelner Autoimmunerkrankungen, wie z. B. der aplastischen Anämie, eingesetzt.

Wissenschaftliches Ziel der Arbeit war, einen umfangreichen Beitrag zur immunologischen Charakterisierung und Spezifizierung unterschiedlicher ATG-Präparate zu erbringen. Dies ist eine wesentliche Voraussetzung für die Entwicklung und Validierung experimenteller Methoden, sodass die bisher verwendeten Praktiken der Wirksamkeitsprüfung von ATG entsprechend dem Stand der Wissenschaft abgelöst und der Tierversuch (Affenhaut-Transplantationstest; Balner H et al., 1968) ersetzt werden können. Darüber hinaus wurde in diesem Zusammenhang der Entwurf einer Arzneibuch-Monografie für ATG vorgelegt.

Der immunsuppressive Wirkmechanismus von ATG ist selbst nach 40 Jahren klinischer Erfahrung nicht eindeutig geklärt. Ihre Wirksamkeit vermitteln sie über ihre spezifische Bindung an Lymphozyten, woraus sich modellhaft vier Effekte unterscheiden lassen (s. auch Abb. 1, S. 19): Die Reihe der F_c -abhängigen zytotoxischen Mechanismen, eine von ATG ausgelöste Aktivierung, eine über Todesrezeptoren (z.B. Fas/Apo-1) von ATG direkt induzierte Apoptose sowie die Maskierung von Rezeptoren.

Die zytotoxische Wirkung von ATG und die Induktion des programmierten Zelltodes (Apoptose) wurde am Durchflusszytometer (FACS) nach Färbung der toten Zellen bzw. durch den Nachweis von DNA-Fragmentierung analysiert. Der Einfluss von ATG auf die Lymphozyten-Aktivierung *in vitro* sowie auf die gemischte Lymphozyten-Reaktion (mixed lymphocyte reaction, MLR) wurde durch Messung der Lymphozyten-Proliferation anhand des Einbaus von radioaktiv markiertem Thymidin bestimmt. Biochemisch wurden die in ATG enthaltenen anti-Lymphozyten-Antikörper durch den sog. Kinase-Assay charakterisiert. In einer nicht radioaktiven Methode wurden Zelloberflächenmoleküle zunächst biotinyliert. Nach Lyse der Zellen wurden die Proteine mit ATG präzipitiert, gelelektrophoretisch aufgetrennt sowie mittels Streptavidin und Chemilumineszenz im Westernblot nachgewiesen.

Für das Verständnis der klinischen Wirksamkeit von ATG ist die Aufklärung der molekularen Mechanismen der komplement-unabhängigen, zytotoxischen Wirkung von erheblicher Bedeutung, da die enorme zytolytische, aber auch die breite immunsuppressive Wirkung von ATG nicht allein durch die F_c -abhängige Zytotoxizität erklärt werden kann. ATG können bei bestimmten Zielzellen Fas-abhängige Apoptose auslösen; darüber hinaus sind ATG aber

auch in der Lage, einen komplement-unabhängigen Zelltod in Fas-resistenten Zell-Linien und T-Zell-Klonen, die resistent gegenüber aktivierungsinduziertem Zelltod (AICD) sind, auszulösen.

In Kompetitionsversuchen konnte gezeigt werden, dass ATG entsprechende Antikörper-Spezifitäten gegen das Molekül CD95 (Fas/Apo-1) enthalten. Ferner konnten wir nachweisen, dass die durch ATG initiierte Fas-abhängige Apoptose und/oder der AICD durch Fas-neutralisierende Antikörper inhibiert werden können, was auch von anderen Arbeitsgruppen gezeigt wurde (Genestier L et al., 1998). Die DNA-Fragmentierung, als Nachweis von Apoptose, lässt sich nach der ATG-Inkubation von Fas-sensitiven Zielzellen durch Inhibitoren der Caspase-1 (Z-VAD-FMK) komplett sowie durch Inhibitoren der Caspase-3 (Ac-DMQD-CHO) und -6 (Ac-VEID-CHO) teilweise inhibieren. Die zytotoxische Wirkung von ATG lässt sich jedoch nicht in gleichem Maße durch Inhibitoren der Caspase-1 reduzieren, wie bei einem Apoptose induzierenden mAk gegen Fas. Es wird deutlich, dass ATG eine breit gefächerte zytotoxische Wirkung auf verschiedene Zellpopulationen ausüben, die alle mehr oder weniger eine Rolle in der klinischen Wirksamkeit von ATG spielen können. ATG sind in der Lage, periphere blutmononukleäre Zellen (PBMC) zu aktivieren, wobei der Proliferationsindex in etwa dem eines Standardmitogens, wie z. B. Phytohämagglutinin (PHA), entspricht. Isolierte T-Lymphozyten werden ebenfalls aktiviert, zeigen jedoch eine geringere Proliferationsrate. In PHA-Blasten lassen sich schwache Veränderungen im Muster der Protein-Tyrosin-Phosphorylierung erkennen, wobei eine gewisse Ähnlichkeit im Bandenmuster sowie in der Intensität zwischen der Stimulation mit ATG und dem anti-CD2 mAk zu erkennen ist. Im Unterschied zu publizierten Studien konnte in dieser Arbeit kein spezifisch hemmender Effekt der ATG auf die MLR nachgewiesen werden.

Aus den Untersuchungen zur Charakterisierung der ATG hat sich der komplement-abhängige Zytotoxizitätstest, gemessen am Durchflusszytometer, als die Methode herausgestellt, die, bezogen auf den Wirkmechanismus der ATG und im Hinblick auf eine Routineanwendung in der Chargenprüfung, am besten geeignet ist. Eine Evaluierung der Methode wurde im Rahmen eines Ringversuches, an dem sich sieben verschiedene Labore beteiligten, durchgeführt. Die mittlerweile gültige Arzneibuch-Monografie für ATG (Ph. Eur.: 1928) sieht diese *in vitro* Methode zur Wirksamkeitsprüfung von ATG vor, womit die Voraussetzungen zur Abschaffung des Affenhaut-Transplantationstests geschaffen wurden. Neben einer zellulären Charakterisierung der ATG konnte gezeigt werden, dass sich insbesondere biochemische Methoden, wie z. B. der Kinase-assay oder die Biotinylierung von Zelloberflächenmolekülen, sehr gut zur Identitätsprüfung von ATG eignen. Mit beiden Methoden ließen sich produktspezifische Bande nachweisen. Im Rahmen der Entwicklung von ATG sind diese Methoden geeignet, die Konsistenz der Chargenproduktion zu überprüfen, sodass auch hier Alternativen zum Tierversuch vorhanden sind.

VII LITERATURVERZEICHNIS

- Anderson P, Blue ML and Schlossman SF (1988). Comodulation of CD3 and CD4. Evidence for a specific association between CD4 and approximately 5% of the CD3:T cell receptor complexes on helper T lymphocytes. *J. Immunol.* 140, 1732-1737.
- Ashkenazi A (2002). Targeting death and decoy receptors of the tumour-necrosis factor superfamily. *Nat. Rev. Cancer* 2, 420-430.
- Balner H, Eysvoogel VP and Cleton FJ (1968). Testing of anti-human lymphocyte sera in chimpanzees and lower primates. *Lancet* 1, 19-22.
- Bank I and Chess L (1985). Perturbation of the T4 molecule transmits a negative signal to T cells. *J. Exp. Med.* 162, 1294-1303.
- Barth C, Stachowski J, von Menges A, Lammerding P and Baldamus CA (1998). [Immunologic, alloantigen-dependent factors in chronic graft rejection]. *Med. Klin. (Munich)* 93, 1-5.
- Beiras-Fernandez A, Thein E and Hammer C (2003). Induction of immunosuppression with polyclonal antithymocyte globulins: an overview. *Exp. Clin. Transplant.* 1, 79-84.
- Berndt C, Mopps B, Angermuller S, Gierschik P and Krammer PH (1998). CXCR4 and CD4 mediate a rapid CD95-independent cell death in CD4(+) T cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 95, 12556-12561.
- Beyers AD, Spruyt LL and Williams AF (1992). Molecular associations between the T-lymphocyte antigen receptor complex and the surface antigens CD2, CD4, or CD8 and CD5. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 89, 2945-2949.
- Billingham RE, Brent L and Medawar PB (1953). Actively acquired tolerance of foreign cells. *Nature* 172, 603-606.
- Bjorkman PJ, Saper MA, Samraoui B, Bennett WS, Strominger JL and Wiley DC (1987). Structure of the human class I histocompatibility antigen, HLA-A2. *Nature* 329, 506-512.
- Bock HA, Gallati H, Zurcher RM, Bachofen M, Mihatsch MJ, Landmann J and Thiel G (1995). A randomized prospective trial of prophylactic immunosuppression with ATG-fresenius versus OKT3 after renal transplantation. *Transplantation* 59, 830-840.
- Bodmer JL, Burns K, Schneider P, Hofmann K, Steiner V, Thome M, Bornand T, Hahne M, Schroter M, Becker K, Wilson A, French LE, Browning JL, MacDonald HR and Tschopp J (1997). TRAMP, a novel apoptosis-mediating receptor with sequence homology to tumor necrosis factor receptor 1 and Fas(Apo-1/CD95). *Immunity* 6, 79-88.

- Bonnefoy-Berard N, Vincent C and Revillard JP (1991). Antibodies against functional leukocyte surface molecules in polyclonal antilymphocyte and antithymocyte globulins. *Transplantation* 51, 669-673.
- Bonnefoy-Berard N, Verrier B, Vincent C and Revillard JP (1992 A). Inhibition of CD25 (IL-2R alpha) expression and T-cell proliferation by polyclonal anti-thymocyte globulins. *Immunology* 77, 61-67.
- Bonnefoy-Berard N, Vincent C, Verrier B and Revillard JP (1992 B). Monocyte-independent T-cell activation by polyclonal antithymocyte globulins. *Cell Immunol.* 143, 272-283.
- Bonnefoy-Berard N, Flacher M and Revillard JP (1992 C). Antiproliferative effect of antilymphocyte globulins on B cells and B-cell lines. *Blood* 79, 2164-2170.
- Bonnefoy-Berard N, Genestier L, Flacher M, Rouault JP, Lizard G, Mutin M and Revillard JP (1994). Apoptosis induced by polyclonal antilymphocyte globulins in human B-cell lines. *Blood* 83, 1051-1059.
- Bonnefoy-Berard N and Revillard JP (1996). Mechanisms of immunosuppression induced by antithymocyte globulins and OKT3. *J. Heart Lung Transplant.* 15, 435-442.
- Bonnefoy-Berard N, Fournel S, Genestier L, Flacher M, Quemeneur L and Revillard JP (1998). In vitro functional properties of antithymocyte globulins: clues for new therapeutic applications? *Transplant. Proc.* 30, 4015-4017.
- Bonnefoy-Berard N, Genestier L, Preville X and Revillard J P (1999). TNF alpha and CD95-L contribute to apoptosis of activated lymphocytes triggered by ATGs. *Transplant. Proc.* 31, 775-777.
- Bourdage JS and Hamlin DM (1995). Comparative polyclonal antithymocyte globulin and antilymphocyte/antilymphoblast globulin anti-CD antigen analysis by flow cytometry. *Transplantation* 59, 1194-1200.
- Braun MY, McCormack A, Webb G and Batchelor JR (1993). Evidence for clonal anergy as a mechanism responsible for the maintenance of transplantation tolerance. *Eur. J. Immunol.* 23, 1462-1468.
- Brennan DC, Daller JA, Lake KD, Cibrik D and Del CD (2006). Rabbit antithymocyte globulin versus basiliximab in renal transplantation. *N. Engl. J. Med.* 355, 1967-1977.
- Brent L (1997). *A history of transplantation immunology.* Academic Press Limited, London, UK.
- Brochier J and Revillard JP (1971). In vitro stimulation or inhibition of lymphocyte activation by antilymphocyte serum. *Transplant. Proc.* 3, 788-792.

- Brown JH, Jardetzky TS, Gorga JC, Stern LJ, Urban RG, Strominger JL and Wiley DC (1993). Three-dimensional structure of the human class II histocompatibility antigen HLA-DR1. *Nature* 364, 33-39.
- Burk ML and Matuszewski KA (1997). Muromonab-CD3 and antithymocyte globulin in renal transplantation. *Ann. Pharmacother.* 31, 1370-1377.
- Burnet FM (1959). *The clonal selection theory of acquired immunity.* Cambridge Univ. Press, London, UK.
- Cardella CJ, Cattran D, Fenton SA, Albert S, Robinette M and Cole E (1997). Induction therapy with rabbit antithymocyte sera reduces rejection episodes in immunologically low-risk living donor renal transplant recipients. *Transplant. Proc.* 29, 29S-31S.
- Carrera AC, Sanchez-Madrid F, Lopez-Botet M, Bernabeu C and De Landazuri MO (1987). Involvement of the CD4 molecule in a post-activation event on T cell proliferation. *Eur. J. Immunol.* 17, 179-186.
- Carrier M, Leblanc MH, Perrault LP, White M, Doyle D, Beaudoin D and Guertin MC (2007). Basiliximab and rabbit anti-thymocyte globulin for prophylaxis of acute rejection after heart transplantation: a non-inferiority trial. *J. Heart Lung Transplant.* 26, 258-263.
- Cerottini JC, Nordin AA and Brunner KT (1970). Specific in vitro cytotoxicity of thymus-derived lymphocytes sensitized to alloantigens. *Nature* 228, 1308-1309.
- Chapman HA (1998). Endosomal proteolysis and MHC class II function. *Curr. Opin. Immunol.* 10, 93-102.
- Chapman TM and Keating GM (2003). Basiliximab: a review of its use as induction therapy in renal transplantation. *Drugs* 63, 2803-2835.
- Chatenoud L, Berrih S, Bene MC, Kreis H and Bach JF (1982). The effects of immunomodulation on peripheral T cell subsets. *J. Clin. Immunol.* 2, 61S-66S.
- Chew WB, Stephens DJ, Lawrence JS (1936). Antileucocytic serum. *J. Immunol.* 30, 301-318.
- Chinnaiyan AM, O'Rourke K, Yu GL, Lyons RH, Garg M, Duan DR, Xing L, Gentz R, Ni J, Dixit VM. (1996). Signal transduction by DR3, a death domain-containing receptor related to TNFR-1 and CD95. *Science* 274, 990-992.
- Chitilian HV and Auchincloss H Jr (1997). Studies of transplantation immunology with major histocompatibility complex knockout mice. *J. Heart Lung Transplant.* 16, 153-159.
- Cohen JJ, Duke RC, Fadok VA and Sellins KS (1992). Apoptosis and programmed cell death in immunity. *Annu. Rev. Immunol.* 10, 267-293.

- Conrad C, Kabelitz D and Schaffner G (1998). [Potency testing of anti-lymphocyte Globulins: In vitro alternatives for the monkey skin-graft assay]. *ALTEX*. 15, 27-30.
- Da Silva AJ, Janssen O, Rudd CE (1993). TCR/CD3-p59fyn associated p120/p130 binds to the SH2 domain of p59fyn(T). *J. Exp. Med.* 178, 2107-2113.
- dam-Klages S, Adam D, Janssen O and Kabelitz D (2005). Death receptors and caspases: role in lymphocyte proliferation, cell death, and autoimmunity. *Immunol. Res.* 33, 149-166.
- Davies JD, Martin G, Phillips J, Marshall SE, Cobbold SP, Waldmann H (1996). T cell regulation in adult transplantation tolerance. *J. Immunol.* 157, 529-533.
- Garcia-Calvo M, Peterson EP, Leiting B, Ruel R, Nicholson DW and Thornberry NA (1998). Inhibition of human caspases by peptide-based and macromolecular inhibitors. *J. Biol. Chem.* 273, 32608-32613.
- Genestier L, Paillot R, Bonnefoy-Berard N, Meffre G, Flacher M, Fevre D, Liu YJ, Le BP, Waldmann H, Engelhard VH, Banchereau J and Revillard JP (1997). Fas-independent apoptosis of activated T cells induced by antibodies to the HLA class I alpha1 domain. *Blood* 90, 3629-3639.
- Genestier L, Fournel S, Flacher M, Assossou O, Revillard JP and Bonnefoy-Berard N (1998). Induction of Fas (Apo-1, CD95)-mediated apoptosis of activated lymphocytes by polyclonal antithymocyte globulins. *Blood* 91, 2360-2368.
- Genestier L, Bonnefoy-Berard N and Revillard JP (1999). Apoptosis of activated peripheral T cells. *Transplant. Proc.* 31 , 33S-38S.
- Gorer PA (1936). The detection of antigenic differences in mouse erythrocytes by the employment of immune sera. *Brit. J. Exp. Biol.* 17, 42-46.
- Gorer PA (1937). The genetic and antigenic basis of tumour transplantation. *J. Pathology & Bacteriology* 44, 691-69.
- Gorczyca W, Gong J and Darzynkiewicz Z (1993). Detection of DNA strand breaks in individual apoptotic cells by the in situ terminal deoxynucleotidyl transferase and nick translation assays. *Cancer Res.* 53, 1945-1951.
- Gould DS and Auchincloss H Jr (1999). Direct and indirect recognition: the role of MHC antigens in graft rejection. *Immunol. Today* 20, 77-82.
- Grasbeck R, Nordman C and Delachapelle A (1963). Mitogenic action of antileucocyte immune serum on peripheral leucocytes in vitro. *Lancet* 2, 385-386.
- Gray JG, Monaco AP and Russell PS (1964). Heterologous mouse anti-lymphocyte serum to prolong skin homografts. *Surg. Forum* 15, 142-144.

- Gray JG, Monaco AP, Wood ML and Russell PS (1966). Studies on heterologous anti-lymphocyte serum in mice. I. In vitro and in vivo properties. *J. Immunol.* 96, 217-228.
- Grosse-Wilde H, Jakubowski HD, Eigler FW and Kuwert EK (1981). In vitro immunoresponsiveness in recipients of cadaveric renal allografts during ATG therapy. *Proc. Eur. Dial. Transplant. Assoc.* 18, 481-485.
- Guerette B, Gingras M, Wood K, Roy R and Tremblay JP (1996). Immunosuppression with monoclonal antibodies and CTLA4-Ig after myoblast transplantation in mice. *Transplantation* 62, 962-967.
- Hale DA (2004). Biological effects of induction immunosuppression. *Curr. Opin. Immunol.* 16, 565-570.
- Hall BM (1991). Cells mediating allograft rejection. *Transplantation* 51, 1141-1151.
- Hampel J, Chien YH and Davis MM (1997). CD4 augments the response of a T cell to agonist but not to antagonist ligands. *Immunity* 7, 379-385.
- Häyry P (1998). Common pathways in allograft arteriosclerosis and experimental vascular injury: new potential sites of inhibition. *Transplant. Proc.* 30, 685-686.
- Heidelberger M and Kendall FE (1935). The precipitin reaction between type III pneumococcus polysaccharide and homologous antibody: III. A quantitative study and a theory of the reaction mechanism. *J. Exp. Med.* 61, 563-591.
- Hirata H, Takahashi A, Kobayashi S, Yonehara S, Sawai H, Okazaki T, Yamamoto K and Sasada M (1998). Caspases are activated in a branched protease cascade and control distinct downstream processes in Fas-induced apoptosis. *J. Exp. Med.* 187, 587-600.
- Irvine DJ, Hue KA, Mayes AM and Griffith LG (2002). Simulations of cell-surface integrin binding to nanoscale-clustered adhesion ligands. *Biophys. J.* 82, 120-132.
- Iyer R and Holian A (1997). Involvement of the ICE family of proteases in silica-induced apoptosis in human alveolar macrophages. *Am. J. Physiol.* 273, L760-L767.
- Janeway CA, Travers P, Walport M, Shlomchik MJ (2005) *Immunobiology: The immune system in health and disease*, 6th ed. Garland Science Publishing, New York, USA.
- Janssen O, Wesselborg S and Kabelitz D (1992). Immunosuppression by OKT3 - induction of programmed cell death (apoptosis) as a possible mechanism of action. *Transplantation* 53, 233-234.
- Janssen O, Da Silva A, Rudd CE (1995). p56lck and p59fyn recognition of substrates: signaling via the TCR/CD3 complex leads to p59fyn SH2-recognition of ZAP-70. in: *Leukocyte typing V: White cell differentiation antigens*. Schlossmann SF, Boumsell L,

- Gilks W, Harlan JM, Kishimoto T, Morimoto C, Ritz J, Tedder TF, Todd RF (Ed.). Oxford University Press, New York: 68-70.
- Kabelitz D (1990). Do CD2 and CD3-TCR T-cell activation pathways function independently? *Immunol. Today* 11, 44-47.
- Kabelitz D and Wesselborg S (1992). Life and death of a superantigen-reactive human CD4+ T cell clone: staphylococcal enterotoxins induce death by apoptosis but simultaneously trigger a proliferative response in the presence of HLA-DR+ antigen-presenting cells. *Int. Immunol.* 4, 1381-1388.
- Kabelitz D, Pohl T and Pechhold K (1993). Activation-induced cell death (apoptosis) of mature peripheral T lymphocytes. *Immunol. Today* 14, 338-339.
- Kabelitz D, Oberg HH, Pohl T and Pechhold K (1994). Antigen-induced death of mature T lymphocytes: analysis by flow cytometry. *Immunol. Rev.* 142, 157-174.
- Kabelitz D (1998). Apoptosis, graft rejection, and transplantation tolerance. *Transplantation* 65, 869-875.
- Kabelitz D (2005). [Immunology - risk management in the body]. *Dtsch. Med. Wochenschr.* 130, 1563-1565.
- Kabelitz D (2006). [Immunology: new approaches to immuno-modulation and immunotherapy]. *Dtsch. Med. Wochenschr.* 131, 1471-1473.
- Kabelitz D, Wesch D and Oberg HH (2006). Regulation of regulatory T cells: role of dendritic cells and toll-like receptors. *Crit. Rev. Immunol.* 26, 291-306.
- Kabelitz D (2007). Expression and function of Toll-like receptors in T lymphocytes. *Curr. Opin. Immunol.* 19, 39-45.
- Kabelitz D and Medzhitov R (2007). Innate immunity - cross-talk with adaptive immunity through pattern recognition receptors and cytokines. *Curr. Opin. Immunol.* 19, 1-3.
- Kaden J, May G, Schonemann C, Müller P, Groth J, Seeger W, Seibt F, Henkert M and Lippert J (1992). Effect of ATG prophylaxis in sensitized and non-sensitized kidney graft recipients. *Transpl. Int.* 5 Suppl 1, S75-S78.
- Kaden J, Strobelt V, May G, Börner G (2001). Th2-type cytokine pattern induced by an intraoperative high-dose ATG-F bolus in kidney graft recipients. *ESOT 2001, Lisbon, Abstract.*
- Kane LP, Lin J and Weiss A. (2000). Signal transduction by the TCR for antigen. *Curr. Opin. Immunol.* 12, 242-249.

- Kasiske BL, Heim-Duthoy KL and Rao KV (1991). The clinical course of chronic declines in renal allograft function. *Transplant. Proc.* 23, 1271.
- Kawai T, Cosimi AB, Colvin RB, Powelson J, Eason J, Kozlowski T, Sykes M, Monroy R, Tanaka M and Sachs DH (1995). Mixed allogeneic chimerism and renal allograft tolerance in cynomolgus monkeys. *Transplantation* 59, 256-262.
- Klaus SJ, Sidorenko SP and Clark EA (1996). CD45 ligation induces programmed cell death in T and B lymphocytes. *J. Immunol.* 156, 2743-2753.
- Klein J (1977). Allograft reaction against H-2-region antigens. *Transplant. Proc.* 9, 847-852.
- Klein J (1979). The major histocompatibility complex of the mouse. *Science* 203, 516-521.
- Knechtle SJ, Vargo D, Fechner J, Zhai Y, Wang J, Hanaway MJ, Scharff J, Hu H, Knapp L, Watkins D and Neville DM Jr (1997). FN18-CRM9 immunotoxin promotes tolerance in primate renal allografts. *Transplantation* 63, 1-6.
- König R, Fleury S and Germain RN (1996). The structural basis of CD4-MHC class II interactions: coreceptor contributions to T cell receptor antigen recognition and oligomerization-dependent signal transduction. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 205, 19-46.
- König R (2002). Interactions between MHC molecules and co-receptors of the TCR. *Curr. Opin. Immunol.* 14, 75-83.
- Koulmanda M, Laufer TM, Auchincloss H Jr and Smith RN (2004). Prolonged survival of fetal pig islet xenografts in mice lacking the capacity for an indirect response. *Xenotransplantation.* 11, 525-530.
- Krammer PH (1999). CD95(APO-1/Fas)-mediated apoptosis: live and let die. *Adv. Immunol.* 71, 163-210.
- Krensky AM, Weiss A, Crabtree G, Davis MM and Parham P (1990). T-lymphocyte-antigen interactions in transplant rejection. *N. Engl. J. Med.* 322, 510-517.
- Krümmel MF, Sjaastad MD, WulfigC and Davis MM (2000). Differential clustering of CD4 and CD3zeta during T cell recognition. *Science* 289, 1349-1352.
- Krümmel MF and Davis MM (2002). Dynamics of the immunological synapse: finding, establishing and solidifying a connection. *Curr. Opin. Immunol.* 14, 66-74.
- Kunzendorf U, Ziegler E and Kabelitz D (2004). FTY720 - the first compound of a new promising class of immunosuppressive drugs. *Nephrol. Dial. Transplant.* 19, 1677-1681.
- Laemmli UK (1979). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227, 680-685.

- Lafferty KJ, Bootes A, Dart G and Talmage DW (1976). Effect of organ culture on the survival of thyroid allografts in mice. *Transplantation* 22, 138-149.
- Lance EM and Medawar PB (1969). Induction of tolerance with antilymphocytic serum. *Transplant. Proc.* 1, 429-432.
- Land WG (2005). The role of postischemic reperfusion injury and other nonantigen-dependent inflammatory pathways in transplantation. *Transplantation* 79, 505-514.
- Lanzavecchia A, Reid PA and Watts C (1992). Irreversible association of peptides with class II MHC molecules in living cells. *Nature* 357, 249-252.
- Larsen CP, Elwood ET, Alexander DZ, Ritchie SC, Hendrix R, Tucker-Burden C, Cho HR, Aruffo A, Hollenbaugh D, Linsley PS, Winn KJ and Pearson TC (1996). Long-term acceptance of skin and cardiac allografts after blocking CD40 and CD28 pathways. *Nature* 381, 434-438.
- Lee RS, Grusby MJ, Laufer TM, Colvin R, Glimcher LH and Auchincloss H Jr (1997). CD8+ effector cells responding to residual class I antigens, with help from CD4+ cells stimulated indirectly, cause rejection of "major histocompatibility complex-deficient" skin grafts. *Transplantation* 63, 1123-1133.
- Leimenstoll G, Zerrenthin N, Niedermayer W and Steinmann J (1991). An antithymocyte globulin of rabbit origin inhibits the antigen-induced activation of alloreactive T cells by blocking CD2. *Transplant. Proc.* 23, 982-984.
- Leist M and Jaattela M (2001). Four deaths and a funeral: from caspases to alternative mechanisms. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2, 589-598.
- Lemström K, Koskinen P and Hayry P (1995). Molecular mechanisms of chronic renal allograft rejection. *Kidney Int. Suppl* 52, S2-10.
- Lenschow DJ, Zeng Y, Hathcock KS, Zuckerman LA, Freeman G, Thistlethwaite JR, Gray GS, Hodes RJ and Bluestone JA (1995). Inhibition of transplant rejection following treatment with anti-B7-2 and anti-B7-1 antibodies. *Transplantation* 60, 1171-1178.
- Levey RH and Medawar PB (1966). Nature and mode of action of antilymphocytic antiserum. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 56, 1130-1137.
- Levings MK and Roncarolo MG (2000). T-regulatory 1 cells: a novel subset of CD4 T cells with immunoregulatory properties. *J. Allergy Clin. Immunol.* 106, S109-S112.
- Li Y, Li XC, Zheng XX, Wells AD, Turka LA and Strom TB (1999). Blocking both signal 1 and signal 2 of T-cell activation prevents apoptosis of alloreactive T cells and induction of peripheral allograft tolerance. *Nat. Med.* 5, 1298-1302.

- Liedert B, Bassus S, Schneider CK, Kalinke U, Löwer J (2007). Safety of phase I clinical trials with monoclonal antibodies in Germany - the regulatory requirements viewed in the aftermath of the TGN1412 disaster. *Int. J. Clin. Pharmacol. Ther.* 45, 1-9
- Lin CY, Graca L, Cobbold SP and Waldmann H (2002). Dominant transplantation tolerance impairs CD8+ T cell function but not expansion. *Nat. Immunol.* 3, 1208-1213.
- Löw-Friedrich I, Schoeppe W (1996). *Transplantation*. Wissenschaftliche Buchgesellschaft, Darmstadt.
- Luster AD (2002). The role of chemokines in linking innate and adaptive immunity. *Curr. Opin. Immunol.* 14, 129-135.
- Ma F, Zhang C, Prasad KV, Freeman GJ and Schlossman SF (2001). Molecular cloning of Porimin, a novel cell surface receptor mediating oncotic cell death. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 98, 9778-9783.
- Madrenas J, Chau LA, Smith J, Bluestone JA, Germain RN (1997). The efficiency of CD4 recruitment to ligand-engaged TCR controls the agonist/partial agonist properties of peptide-MHC molecule ligands. *J. Exp. Med.* 185, 219-229.
- Majno G and Joris I (1995). Apoptosis, oncosis, and necrosis. An overview of cell death. *Am. J. Pathol.* 146, 3-15.
- Marrack P, Hannum C, Harris M, Haskins K, Kubo R, Pigeon M, Shimonkevitz R, White J and Kappler J (1983). Antigen-specific, major histocompatibility complex-restricted T cell receptors. *Immunol. Rev.* 76, 131-145.
- Marshall SE, Cobbold SP, Davies JD, Martin GM, Phillips JM and Waldmann H (1996). Tolerance and suppression in a primed immune system. *Transplantation* 62, 1614-1621.
- Metchnikoff E (1899). Etudes sur la resorption des cellules. *Ann. Inst. Pasteur* 13, 737
- Medzhitov R and Janeway CA Jr (1997). Innate immunity: impact on the adaptive immune response. *Curr. Opin. Immunol.* 9, 4-9.
- Meuer SC, Cooper DA, Hodgdon JC, Hussey RE, Fitzgerald KA, Schlossman SF and Reinherz EL (1983). Identification of the receptor for antigen and major histocompatibility complex on human inducer T lymphocytes. *Science* 222, 1239-1242.
- Meuer SC, Hussey RE, Fabbi M, Fox D, Acuto O, Fitzgerald KA, Hodgdon JC, Protentis JP, Schlossman SF, Reinherz EL (1984). An alternative pathway of T-cell activation: a functional role for the 50 kd T11 sheep erythrocyte receptor protein. *Cell* 36, 897-906.
- Mollereau B, Deckert M, Deas O, Rieux-Laucat F, Hirsch F, Bernard A, Fischer A, Lynch DH, Charpentier B, Le DF and Senik A (1996). CD2-induced apoptosis in activated human

- peripheral T cells: a Fas-independent pathway that requires early protein tyrosine phosphorylation. *J. Immunol.* 156, 3184-3190.
- Monaco AP and Russell PS (1966) Role of the thymus in allograft immunity. *Adv. Surg.* 2, 137-156.
- Monaco AP, Abbott WM, Othersen HB, Simmons RL, Wood ML, Flax MH and Russell PS (1966). Antiserum to lymphocytes: prolonged survival of canine renal allografts. *Science* 153, 1264-1267.
- Monaco AP, Wood ML and Russell PS (1967). Some effects of purified heterologous antihuman lymphocyte serum in man. *Transplantation* 5, Suppl-14.
- Monaco AP (1999). Antilymphocyte serum, donor bone marrow and tolerance to allografts: the journey is the reward. *Transplant. Proc.* 31, 67-71.
- Mosmann T (1983). Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J. Immunol. Methods* 65, 55-63.
- Müller TF, Grebe SO, Neumann MC, Heymanns J, Radsak K, Sprenger H and Lange H (1997). Persistent long-term changes in lymphocyte subsets induced by polyclonal antibodies. *Transplantation* 64, 1432-1437.
- Murphy KM, Reiner SL (2002). The lineage decisions of helper T cells. *Nat. Rev. Immunol.* 2, 933-944.
- Nagata S (1997). Apoptosis by death factor. *Cell* 88, 355-365.
- Oberg HH, Lengl-Janssen B, Robertson MJ, Kabelitz D and Janssen O (1997 A). Differential role of tyrosine phosphorylation in the induction of apoptosis in T cell clones via CD95 or the TCR/CD3-complex. *Cell Death. Differ.* 4, 403-412.
- Oberg HH, Sanzenbacher R, Lengl-Janssen B, Dobmeyer T, Flindt S, Janssen O and Kabelitz D (1997 B). Ligation of cell surface CD4 inhibits activation-induced death of human T lymphocytes at the level of Fas ligand expression. *J. Immunol.* 159, 5742-5749.
- Oertel M, Sack U, Kohlhaw K, Lehmann I, Emmrich F, Berr F, Hauss J, Schwarz R (2002). Induction therapy including antithymocyte globulin induces marked alterations in T lymphocyte subpopulations after liver transplantation: results of a long-term study. *Transpl. Int.* 15, 463-471.
- Orlinick JR and Chao MV (1998). TNF-related ligands and their receptors. *Cell Signal.* 10, 543-551.
- Orosz CG (1994). Endothelial activation and chronic allograft rejection. *Clin. Transplant.* 8, 299-303.

- Pan G, Ni J, Wei YF, Yu G, Gentz R and Dixit VM (1997). An antagonist decoy receptor and a death domain-containing receptor for TRAIL. *Science* 277, 815-818.
- Paul WE and Seder RA (1994). Lymphocyte responses and cytokines. *Cell* 76, 241-251.
- Pechhold K, Pohl T and Kabelitz D (1994). Rapid quantification of lymphocyte subsets in heterogeneous cell populations by flow cytometry. *Cytometry* 16, 152-159.
- Pescovitz MD, Thistlethwaite JR Jr, Auchincloss H Jr, Ildstad ST, Sharp TG, Terrill R and Sachs DH (1984). Effect of class II antigen matching on renal allograft survival in miniature swine. *J. Exp. Med.* 160, 1495-1508.
- Pescovitz MD (1999). New usage paradigms in antibody therapy: safety of the new agents. *Transplant. Proc.* 31, 1201-1202.
- Peter ME, Kischkel FC, Scheuermann CG, Medema JP, Debatin KM and Krammer PH (1997). Resistance of cultured peripheral T cells towards activation-induced cell death involves a lack of recruitment of FLICE (MACH/caspase 8) to the CD95 death-inducing signaling complex. *Eur. J. Immunol.* 27, 1207-1212.
- Pistillo MP, Tazzari PL, Bonifazi F, Bandini G, Kato T, Matsui T, Nishioka K, Conte R and Ferrara GB (2002). Detection of a novel specificity (CTLA-4) in ATG/TMG globulins and sera from ATG-treated leukemic patients. *Transplantation* 73, 1295-1302.
- Preville X, Flacher M, LeMauff B, Beauchard S, Davelu P, Tiollier J and Revillard JP (2001). Mechanisms involved in antithymocyte globulin immunosuppressive activity in a nonhuman primate model. *Transplantation* 71, 460-468.
- Raefsky EL, Gascon P, Gratwohl A, Speck B and Young NS (1986). Biological and immunological characterization of ATG and ALG. *Blood* 68, 712-719.
- Revillard JP, Brochier J, Traeger J and Balner H (1970). In vitro assay of suppressive properties of antilymphocyte sera on lymphocyte stimulation. *Transplantation* 9, 592-597.
- Revillard JP and Brochier J (1971). Selective deficiency of cell-mediated immunity in humans treated with antilymphocyte globulins. *Transplant. Proc.* 3, 725-729.
- Revillard JP, Adorini L, Goldman M, Kabelitz D and Waldmann H (1998). Apoptosis: potential for disease therapies. *Immunol. Today* 19, 291-293.
- Rosenberg AS (1993). The T cell populations mediating rejection of MHC class I disparate skin grafts in mice. *Transpl. Immunol.* 1, 93-99.
- Ruggiero G, Racioppi L, Manzo C, Pirozzi G, D'Oro U, Ferrone S, Zappacosta S and Fontana S (1991). HLA class II molecules on monocytes regulate T cell proliferation through physical interaction in the CD3 activation pathway. *Eur. J. Immunol.* 21, 29-33.

- Russell PS and Monaco AP (1967). Heterologous antilymphocyte sera and some of their effects. *Transplantation* 5, Suppl-99.
- Sacks JH, Filippone DR, Hume DM (1964). Studies of immune destruction of lymphoid tissue. I. Lymphocytotoxic effect of rabbit-anti-rat-lymphocyte antiserum. *Transplantation* 2, 60-74.
- Sakaguchi S (2006). Regulatory T cells. *Springer Semin. Immunopathol.* 28, 1-2.
- Sawada M, Sun W, Hayes P, Leskov K, Boothman DA and Matsuyama S (2003). Ku70 suppresses the apoptotic translocation of Bax to mitochondria. *Nat. Cell Biol.* 5, 320-329.
- Sayegh MH, Akalin E, Hancock WW, Russell ME, Carpenter CB, Linsley PS and Turka LA (1995). CD28-B7 blockade after alloantigenic challenge in vivo inhibits Th1 cytokines but spares Th2. *J. Exp. Med.* 181, 1869-1874.
- Sayegh MH and Krensky AM (1996). Novel immunotherapeutic strategies using MHC derived peptides. *Kidney Int. Suppl* 53, S13-S20.
- Sayegh MH and Turka LA (1998). The role of T-cell costimulatory activation pathways in transplant rejection. *N. Engl. J. Med.* 338, 1813-1821.
- Schmoeckel M, Nollert G, Shahmohammadi M, Young VK, Knig W, White DJ, Hammer C and Reichart B (1996). Human decay accelerating factor successfully protects pig hearts from hyperacute rejection by human blood. *Transplant. Proc.* 28, 768-769.
- Screaton G and Xu XN (2000). T cell life and death signalling via TNF-receptor family members. *Curr. Opin. Immunol.* 12, 316-322.
- Serwold T, Gonzalez F, Kim J, Jacob R and Shastri N (2002). ERAAP customizes peptides for MHC class I molecules in the endoplasmic reticulum. *Nature* 419, 480-483.
- Sewell AK, Gerth UC, Price DA, Purbhoo MA, Boulter JM, Gao GF, Bell JI, Phillips RE, Jakobsen BK (1999). Antagonism of cytotoxic T-lymphocyte activation by soluble CD8. *Nat. Med.* 5, 399-404.
- Shepherd JC, Schumacher TN, shton-Rickardt PG, Imaeda S, Ploegh HL, Janeway CA Jr and Tonegawa S (1993). TAP1-dependent peptide translocation in vitro is ATP dependent and peptide selective. *Cell* 74, 577-584.
- Skov S, Klausen P and Claesson MH (1997). Ligation of major histocompatibility complex (MHC) class I molecules on human T cells induces cell death through PI-3 kinase-induced c-Jun NH2-terminal kinase activity: a novel apoptotic pathway distinct from Fas-induced apoptosis. *J. Cell Biol.* 139, 1523-1531.

- Smith AG, Prentice AG, Lucie NP and Dagg JH (1983). Meningeal relapse in Ph1-positive acute lymphoblastic and lymphoid blast crisis of chronic granulocytic leukemia. Is CNS-prophylaxis indicated? *Cancer* 51, 2031-2034.
- Snell GD (1948). Methods for the study of histocompatibility genes. *J. Genet.* 49, 87-108
- Stebbing R, Findlay L, Edwards C, Eastwood D, Bird C, North D, Mistry Y, Dilger P, Liefoghe E, Cludts I, Fox B, Tarrant G, Robinson J, Meager T, Dolman C, Thorpe SJ, Bristow A, Wadhwa M, Thorpe R, Poole S (2007). "Cytokine storm" in the phase I trial of monoclonal antibody TGN1412: better understanding the causes to improve preclinical testing of immunotherapeutics. *J. Immunol.* 179, 3325-3331.
- Stern LJ and Wiley DC (1994). Antigenic peptide binding by class I and class II histocompatibility proteins. *Structure* 2, 245-251.
- Strominger JL (2002). Human histocompatibility proteins. *Immunol. Rev.* 185, 69-77.
- Suthanthiran M and Strom TB (1998). Mechanisms and management of acute renal allograft rejection. *Surg. Clin. North Am.* 78, 77-94.
- Szczzech LA, Berlin JA, Aradhye S, Grossman RA and Feldman HI (1997). Effect of anti-lymphocyte induction therapy on renal allograft survival: a meta-analysis. *J. Am. Soc. Nephrol.* 8, 1771-1777.
- Thibaudin D, Alamartine E, de Filippis JP, Diab N, Laurent B and Berthoux F (1998). Advantage of antithymocyte globulin induction in sensitized kidney recipients: a randomized prospective study comparing induction with and without antithymocyte globulin. *Nephrol. Dial. Transplant.* 13, 711-715.
- Thomas JM, Neville DM, Contreras JL, Eckhoff DE, Meng G, Lobashevsky AL, Wang PX, Huang ZQ, Verbanac KM, Haisch CE and Thomas FT (1997). Preclinical studies of allograft tolerance in rhesus monkeys: a novel anti-CD3-immunotoxin given peritransplant with donor bone marrow induces operational tolerance to kidney allografts. *Transplantation* 64 , 124-135.
- Thon L, Mathieu S, Kabelitz D and Adam D (2006). The murine TRAIL receptor signals caspase-independent cell death through ceramide. *Exp. Cell Res.* 312, 3808-3821.
- Towbin H, Staehelin T and Gordon J (1979). Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 76, 4350-4354.
- Vidal K, Daniel C, Hill M, Littman DR and Allen PM (1999). Differential requirements for CD4 in TCR-ligand interactions. *J. Immunol.* 163, 4811-4818.

- Vincenti F, Kirkman R, Light S, Bumgardner G, Pescovitz M, Halloran P, Neylan J, Wilkinson A, Ekberg H, Gaston R, Backman L and Burdick J (1998). Interleukin-2-receptor blockade with daclizumab to prevent acute rejection in renal transplantation. Daclizumab Triple Therapy Study Group. *N. Engl. J. Med.* 338, 161-165.
- von Kiparski A, Frei D, Fierz W, Frei G, Uhlschmid G, Largiader F, Binswanger U (1990). [The effect of rejection crises and immunosuppressive therapy on the lymphocyte subpopulations of patients after kidney transplantation]. *Klin. Wochenschr.* 68, 408-414.
- Waksman BH, Arbouys S and Rnason BG (1961). The use of specific "lymphocyte" antisera to inhibit hypersensitive reactions of the "delayed" type. *J. Exp. Med.* 114, 997-1022.
- Waldmann H, Adams E, Fairchild P and Cobbold S (2006). Infectious tolerance and the long-term acceptance of transplanted tissue. *Immunol. Rev.* 212, 301-313.
- Wang JH, Meijers R, Xiong Y, Liu JH, Sakihama T, Zhang R, Joachimiak A and Reinherz EL (2001). Crystal structure of the human CD4 N-terminal two-domain fragment complexed to a class II MHC molecule. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 98, 10799-10804.
- Wells AD, Li XC, Li Y, Walsh MC, Zheng XX, Wu Z, Nunez G, Tang A, Sayegh M, Hancock WW, Strom TB and Turka LA (1999). Requirement for T-cell apoptosis in the induction of peripheral transplantation tolerance. *Nat. Med.* 5, 1303-1307.
- Wesselborg S, Prufer U, Wild M, Schraven B, Meuer SC and Kabelitz D (1993). Triggering via the alternative CD2 pathway induces apoptosis in activated human T lymphocytes. *Eur. J. Immunol.* 23, 2707-2710.
- Wong JT, Eylath AA, Ghobrial I and Colvin RB (1990). The mechanism of anti-CD3 monoclonal antibodies. Mediation of cytolysis by inter-T cell bridging. *Transplantation* 50, 683-689.
- Woodle ES, Smith DM, Bluestone JA, Kirkman WM, III, Green DR and Skowronski EW (1997). Anti-human class I MHC antibodies induce apoptosis by a pathway that is distinct from the Fas antigen-mediated pathway. *J. Immunol.* 158, 2156-2164.
- Woodruff MFA and Anderson NF (1963). Effect of lymphocyte depletion by thoracic duct fistula and administration of anti-lymphocyte serum on the survival of skin homografts in rats. *Nature* 200, 702.
- Woodruff MFA and Anderson NF (1964). The effect of lymphocyte depletion by thoracic duct fistula and administration of anti-lymphocyte serum on the survival of skin homografts in rats. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 120, 119-128.
- Wu H, Kwong PD and Hendrickson WA (1997). Dimeric association and segmental variability in the structure of human CD4. *Nature* 387, 527-530.

- Wu Z, Bensinger SJ, Zhang J, Chen C, Yuan X, Huang X, Markmann JF, Kassaei A, Rosengard BR, Hancock WW, Sayegh MH and Turka LA (2004). Homeostatic proliferation is a barrier to transplantation tolerance. *Nat. Med.* 10, 87-92.
- Zhang C, Xu Y, Gu J and Schlossman SF (1998). A cell surface receptor defined by a mAb mediates a unique type of cell death similar to oncosis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 95, 6290-6295.
- Zheng L, Fisher G, Miller RE, Peschon J, Lynch DH, Lenardo MJ (1995). Induction of apoptosis in mature T cells by tumour necrosis factor. *Nature* 377, 348-351.
- Zheng XX, Sanchez-Fueyo A, Domenig C and Strom TB (2003). The balance of deletion and regulation in allograft tolerance. *Immunol. Rev.* 196, 75-84.
- Zhu H, Fearnhead HO and Cohen GM (1995). An ICE-like protease is a common mediator of apoptosis induced by diverse stimuli in human monocytic THP.1 cells. *FEBS Lett.* 374, 303-308.
- Zinkernagel RM and Doherty PC (1974). Restriction of in vitro T cell-mediated cytotoxicity in lymphocytic choriomeningitis within a syngeneic or semiallogeneic system. *Nature* 248, 701-702.

DANKSAGUNG

Die vorliegende Arbeit wurde am Paul-Ehrlich-Institut, Bundesamt für Sera und Impfstoffe, in der Abteilung Immunologie unter Anleitung von Prof. Dr. Dieter Kabelitz durchgeführt. An dieser Stelle möchte ich allen Menschen danken, die mich in dieser Zeit unterstützt und zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben:

Der Leitung des Paul-Ehrlich-Institutes, Herrn Prof. Dr. Reinhard Kurth und Prof. Dr. Johannes Löwer danke ich für die Bereitstellung des Arbeitsplatzes.

Herrn Prof. Dr. Dieter Kabelitz danke ich für die Möglichkeit, die vorliegende Arbeit in seiner Abteilung anfertigen zu dürfen, seine wissenschaftliche Betreuung und Unterstützung sowie für die Übernahme des Erstreferates.

Herrn Prof. Dr. Roland Prinzinger danke ich für die Betreuung dieser Arbeit am Fachbereich Biowissenschaften der Johann Wolfgang Goethe-Universität Frankfurt am Main.

Frau Dr. Gabriele Schöffner danke ich für ihre Hilfe und Unterstützung bei der Einordnung der vorliegenden Arbeit in das Feld der Regulation und Qualitätskontrolle von Arzneimitteln.

Frau Dr. Daniela Wesch und Prof. Dr. Ottmar Janssen danke ich für ihre Bereitschaft zur Diskussion und ihre Unterstützung im Labor.

Außerdem möchte ich allen Mitgliedern und Gästen der Arbeitsgruppe 3/0 für ihre gute Zusammenarbeit danken. Besonders erwähnen möchte ich Dr. Andrea Glatzel, Dr. Ralf Sanzenbacher, Sibylle Marx, Dr. Annette Sedlmeyer und Dipl. Chem. Sven Flindt.

Abschließend möchte ich ganz besonders meinen Eltern, Geschwistern und Freunden danken; ihre Geduld, ihr Verständnis und ihre Unterstützung waren ein unverzichtbares Umfeld für die Anfertigung dieser Arbeit.

LEBENS LAUF

Christoph Conrad, Dipl. Biol.

Adresse

Mainstraße 1
65203 Wiesbaden

Persönliche Daten

Geburtsdatum: 25.01.1967
Geburtsort: Mainz, Deutschland
Staatsangehörigkeit: Deutsch

Ausbildung

Diplom in Biologie, April 1995
Technische Universität Darmstadt
Schwerpunkte: Botanik, Biochemie, Immunologie und Psychologie
Diplomarbeit in Immunologie, angefertigt an der McGill University of Montreal, Kanada
Akademische Lehrer: Prof. Dr. Nixdorf, TU Darmstadt
Prof. Dr. Zänker, Universität Witten-Herdecke
Peter Noble, PhD, McGill University of Montreal, Kanada

Beruf

1996 Wissenschaftlicher Mitarbeiter am Universitätsklinikum Essen im Institut für Zellbiologie (Tumorforschung)

seit 1996 wissenschaftlicher Mitarbeiter am Paul-Ehrlich-Institut

1996–2000 in der Abteilung für Immunologie mit dem Projekt:

Ersatzmethoden zum Tierversuch (Affenhaut-Transplantationstest zur Wirksamkeitsprüfung von Anti-T-Lymphozyten-Globulinen)

Akademische Lehrer: Prof. Dr. Prinzinger, Johann Wolfgang Goethe-Universität
Prof. Dr. Kabelitz, Universitätsklinikum Schleswig-Holstein

seit 2000 in der Abteilung für Virologie, Fachgebiet virale Impfstoffe:

Bearbeitung von Zulassungen und Betreuung der Chargenprüfung