

Aus der Klinik für Allgemein-, Viszeral- und Transplantationschirurgie
Klinik der Ludwig- Maximilians- Universität München
Vorstand: Prof. Dr. Jens Werner

Etablierung eines Spender-spezifischen IgG ELISpot Assay für das Immunomonitoring nach Organtransplantation

Dissertation
zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin
an der Medizinischen Fakultät der
Ludwig- Maximilians- Universität
zu München

vorgelegt von

Hemma Kripp

aus Bozen

2021

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter:	Prof. Dr. Jens Werner
Mitberichterstatter:	Prof. Dr. Ralph Mocikat Prof Dr. Ludger Klein
Dekan:	Prof. Dr. med. dent. Reinhard Hickel
Tag der mündlichen Prüfung:	10.06.21

Meinen Eltern

1 Inhaltsverzeichnis

1	Inhaltsverzeichnis	4
2	Abkürzungsverzeichnis	7
3	Einleitung	9
3.1	Transplantation solider Organe	9
3.2	Selbst- und Fremderkennung des Immunsystems	10
3.3	Die angeborene und adaptive Immunantwort	10
3.3.1	Die angeborene Immunantwort	10
3.3.2	Die adaptive Immunantwort.....	11
3.4	Die B-Lymphozyten.....	12
3.4.1	Entwicklung der B-Lymphozyten	12
3.4.2	Affinitätsreifung.....	13
3.5	Immunologisches Gedächtnis.....	13
3.6	Die sekundäre Immunreaktion	14
3.7	Die Impfung.....	14
3.8	Transplantationsimmunologie.....	15
3.8.1	HLA und nicht-HLA.....	15
3.8.2	HLA- und Nicht-HLA-Antikörper.....	15
3.8.3	Zelluläre Abstoßungsreaktion	16
3.8.4	Antikörper-vermittelte Abstoßungsreaktion	18
3.8.5	Die B-Zelle in der Transplantationsimmunologie	20
3.8.6	Diagnostik in der Transplantationsimmunologie	22
3.8.7	Immunsuppressive Therapie in der Transplantationsimmunologie.....	25
4	Hypothese.....	27
5	Zielsetzung.....	29
6	Materialien	30
7	Methoden	34
7.1	Zellpräparation	34
7.1.1	Präparation mononukleärer Zellen aus CPDA-Blut	34
7.1.2	Präparation mononukleärer Zellen aus Spendermilz-Stücken	34
7.2	Zellzahlbestimmung.....	35
7.3	Zellen einfrieren	36
7.4	Zellen auftauen.....	37

7.5	Der ELISpot	37
7.5.1	Antigen- bzw. Spender-spezifischer total-IgG ELISpot	37
7.5.2	Der HBsAg-spezifische total-IgG ELISpot.....	39
7.5.3	Der Spender-spezifische total-IgG ELISpot.....	41
7.5.4	Auswertung des ELISpot-Assays	43
7.6	Der Bestrahlungsversuch.....	45
7.6.1	Die Gamma-Bestrahlung.....	45
7.7	FACS-Analyse der PBMCs nach PI- Färbung	45
7.8	Statistische Auswertung	46
7.9	Ethikantrag	46
8	Ergebnisse	47
8.1	Testetablierung des HBsAg-spezifischen total-IgG ELISpot.....	47
8.2	Testvalidierung des HBsAg-spezifischen total-IgG ELISpot	50
8.3	Testetablierung des Spender-spezifischen total-IgG ELISpot.....	53
8.3.1	Bestrahlungsversuche.....	54
8.3.2	Durchführung eines Spender-spezifischen total-IgG ELISpot.....	57
8.4	Testvalidierung des Spender-spezifischen total-IgG ELISpot	59
9	Diskussion	65
9.1	Etablierung des HBsAg-spezifischen total-IgG ELISpot.....	66
9.2	Validierung des HBsAg-spezifischen total-IgG ELISpot.....	67
9.3	Etablierung des Spender-spezifischen total-IgG ELISpot	68
9.4	Validierung des Spender-spezifischen total-IgG ELISpot.....	69
9.5	Stellenwert des ELISpot-Assays	71
9.6	Limitationen des Spender- und HBsAg-spezifischen total-IgG ELISpots.....	73
9.6.1	Cut off Wert der Negativkontrolle	73
9.6.2	Variabilität der Spotzahlen	73
9.6.3	Limitationen in der Auswertung der ELISpot-Platten.....	73
9.6.4	Limitationen des Spender-spezifischen total-IgG ELISpot.....	74
9.7	Klinische Relevanz	75
9.8	Fazit	76
10	Ausblick	78
11	Abstrakt	80
12	Abbildungs- und Tabellenverzeichnis	81
13	Literaturverzeichnis	82
	Danksagung	102

Eidesstattliche Versicherung	103
---	------------

2 Abkürzungsverzeichnis

ADCC	Antikörperabhängige zellvermittelte- Zytotoxizität
Ak	Antikörper
APC	Antigen präsentierende Zellen
ATG	Anti- Thymozyten- Globulin
BSA	Bovines Serumalbumin
BZR	B- Zell- Rezeptor
Ca	Calcium
CD40L	CD40 Ligand
CNI	Calcineurin- Inhibitoren
CPDA	Citrat- Phosphat- Dextrose- Adenin
DAMP	Damage associated molecular pattern
DMSO	Dimethylsulfoxid
DPBS	Dulbecco's Phosphate-Buffered Saline
DSA	Donor- spezifische Antikörper
ELISA	Enzyme-linked Immunosorbent Assay
ELISpot	Enzyme-linked immunospot
FACS	Fluorescence Activated Cell Sorting
FBS	Fetal bovine serum
Gy	Gray
HBsAg	Hepatitis B surface- Antigen
HLA	Humanes Leukozyten Antigen
HRP	Horseradish peroxidase
IFN- γ	Interferon Gamma
IgD	Immunglobulin D
IgG	Immunglobulin G
IgM	Immunglobulin M
IL	Interleukin
IMPDH	Inosinmonophosphat-Dehydrogenase
L- Glut	L- Glutamin
LZT	Lymphozytotoxizitätstest
M	Mittelwert
MAC	Membranangriffskomplex

Mg	Magnesium
MHC	Major Histocompatibility Complex
MMF	Mycophenolat- Mofetil
mTOR	Mammalian Target Of Rapamycin
NK- Zelle	Natürliche Killerzelle
PAMP	Pathogen associated molecular pattern
PBMC	Peripheral blood mononuclear cell
PBS	Phosphate buffered saline
PenStrep	Penicillin/Streptomycin
PI	Propidiumiodid
PRR	Pattern recognition receptor
PZ	Plasmazellen
ROS	reaktive Sauerstoffspezies
RT	Raumtemperatur
SHM	somatische Hypermutation
TLR	Toll- like Rezeptor
TMB	Tetramethylbenzidin
TD	Thymus dependent, Thymus- abhängig
TI	Thymus independent, Thymus- unabhängig
TNF	Tumornekrosefaktor
TZR	T- Zell- Rezeptor
UV	Ultraviolett

3 Einleitung

Da das Thema meiner Dissertation die Etablierung eines Spender-spezifischen IgG ELISpot Assays zum Immunomonitoring nach Transplantation war, möchte ich zu Beginn einen Überblick über die Transplantation solider Organe, das Immunsystem und über die Entstehung und den Ablauf einer Abstoßungsreaktion verschaffen. Des Weiteren möchte ich vor allem die Rolle der B-Lymphozyten und die Transplantationsimmunologie hervorheben.

3.1 Transplantation solider Organe

Die Organtransplantation stellt die beste Therapie für Patienten mit terminalem Organversagen dar (Abecassis et al. 2008; Pascher et al. 2013; Hartert et al. 2014; Boilson et al. 2010). Das Kurzzeitüberleben der Transplantate hat sich in den letzten Jahrzehnten stark verbessert. Grund hierfür sind neben besseren immunsuppressiven Therapien vor allem Fortschritte im chirurgischen und intensivmedizinischen Bereich und eine passendere Spenderauswahl. Das Langzeitüberleben der Organe ist jedoch immer noch unzufriedenstellend: Etwa 40- 50% der transplantierten Nieren verlieren ihre Funktion im Mittel- und Langzeitverlauf durch die Abstoßungsreaktion des Empfängers oder durch die Nebenwirkungen der verwendeten Medikamente trotz des Einsatzes moderner Immunsuppressiva (Organ Procurement and Transplantation Network/ Scientific Registry of Transplant Recipients OPTN/SRTR). Es ist daher nötig, eine bessere und individualisierte Therapie zu ermöglichen. Dazu ist ein besseres Verständnis der immunologischen Vorgänge rund um die Transplantation und die Identifikation von prognostisch relevanten Risikokonstellationen erforderlich (Levitsky 2011; Clatworthy 2014).

Die akute Abstoßungsreaktion ist hauptsächlich T-Zell vermittelt. Sie ist bereits gut erforscht und mit gut wirksamen T-Zell spezifischen Medikamenten, wie Calcineurin- und mTOR-Inhibitoren, behandelbar. Die Relevanz und Rolle der B-Zellen in der Transplantat-Abstoßung sind hingegen weiterhin unklar. Zwar können B-Zellen das Transplantat einerseits durch die Produktion von Alloantikörpern schädigen, andererseits spielen sie auch eine wichtige Rolle in der Transplantationsimmunologie als Gedächtnis-, Antigenpräsentierende- und Costimulierende-Zellen (Shiu und Dorling 2014). Allerdings sind prognostisch relevante Dynamiken und Konstellationen noch größtenteils unerforscht (Clatworthy 2014; Levitsky 2011; Worthington et al. 2003).

3.2 Selbst- und Fremderkennung des Immunsystems

Die Fähigkeit zwischen fremd und eigen unterscheiden zu können ist eine der wichtigsten Voraussetzungen des Immunsystems. B-Lymphozyten werden während ihrer Entwicklung vor dem Verlassen des Knochenmarkes auf Autoreaktivität getestet. Nur wenn die B-Zelle Toleranz gegenüber Selbst-Antigenen aufweist, darf sie das Knochenmark verlassen. Ist die B-Zelle jedoch autoreaktiv, wird sie in ihrer Entwicklung gestoppt und geht je nach Affinität zum Autoantigen einen der drei möglichen Wege: entweder die B-Zelle wird apoptotisch oder ihr autoreaktiver B-Zell-Rezeptor (BZR) wird modifiziert und durch einen neuen, nicht autoreaktiven BZR ersetzt, oder sie wird anerg und inaktiviert. T-Lymphozyten werden im Thymus auf Eigenreaktivität getestet. In der positiv-Selektion werden diejenigen T-Lymphozyten ausgewählt, welche mit ihrem T-Zell-Rezeptor (TZR) körpereigene Peptide, gebunden an körpereigenen Major-Histocompatibility-Complexes (MHCs), an Thymusepithelzellen erkennen und nicht stark binden. Erfüllen T-Zellen nicht dieses Kriterium, werden sie aussortiert. Anschließend folgt die negativ-Selektion. Hier werden diejenigen T-Lymphozyten aussortiert, welche stark an körpereigene MHCs mit gebundenen körpereigenen Peptiden binden. Erst nach diesen Selektionsverfahren können die T-Lymphozyten als immunkompetente Zellen im Blut zirkulieren. Diese Selektionsverfahren der B- und T-Zellen werden als zentrale Toleranz verstanden. Daneben gibt es noch die periphere Toleranz. Hier spielt das angeborene Immunsystem eine wichtige Rolle. Als periphere Toleranz versteht man eine Minderung der adaptiven Immunreaktion außerhalb der lymphatischen Organe durch das Ausbleiben costimulatorischer Signale. Der autoreaktive Lymphozyt wird durch das Ausbleiben der costimulatorischen Signale inaktiviert. Das angeborene Immunsystem selbst erkennt fremde Strukturen an ihren Pathogen-assoziierten molekularen Strukturen (PAMPs), welche auf vielen Mikroorganismen, aber nicht auf körpereigenen Zellen vorkommen (Janeway 2008).

3.3 Die angeborene und adaptive Immunantwort

3.3.1 Die angeborene Immunantwort

In den menschlichen Körper eingedrungene Pathogene werden durch „Pattern recognition receptors“ (PRRs) erkannt. Sie werden vor allem von Antigen-präsentierenden Zellen (APC), wie Makrophagen und Dendritischen Zellen, aber auch von anderen Immun- und nicht-Immunzellen exprimiert (Takeuchi und Akira 2010). PRRs erkennen sogenannte „Pathogen associated molecular patterns“ (PAMPs)

(Medzhitov und Janeway, JR 2000) und binden sie. PAMPs sind essenziell für das Überleben des Mikroorganismus und kommen gehäuft bei Pathogenen vor (Medzhitov und Janeway, JR 2000; Hoffmann et al. 1999). Im Wirt kommen sie physiologisch nicht vor. In der unspezifischen Immunantwort werden die an die PRR gebundenen Pathogene meistens phagozytiert und eliminiert. Das angeborene Immunsystem kann somit Pathogene bereits bei erstem Kontakt erkennen und bekämpfen. Die Immunzellen sezernieren verschiedene Zytokine und Mediatoren, welche als Chemokine weitere Immunzellen anlocken. Durch Chemokine werden Blutgefäße erweitert, weitere Immunzellen angelockt und eine Entzündungsreaktion findet statt (Proost et al. 1996). APC prozessieren Antigene des Pathogens und präsentieren sie auf ihren MHC-Molekülen, um das adaptive Immunsystem zu aktivieren und eine spezifische Immunantwort zu ermöglichen (Fearon und Locksley 1996; Janeway 2008).

3.3.2 Die adaptive Immunantwort

In der adaptiven oder spezifischen Immunantwort können Pathogene im Vergleich zur angeborenen Immunantwort effizienter bekämpft und es kann ein immunologisches Gedächtnis gebildet werden (Janeway 2008). B- und T-Lymphozyten spielen dabei eine wichtige Rolle. Im Gegensatz zu den Zellen des angeborenen Immunsystems besitzen sie Oberflächenrezeptoren, die für ein einzelnes Antigen des Pathogens spezifisch sind. Diese Spezifität wird in der Entwicklung der Zellen im Knochenmark und im Thymus festgelegt (Janeway 2008). Das Erkennen von spezifischen Antigenen ermöglicht gezielte zelluläre Abwehrmechanismen und die Antikörperproduktion. Erkennt eine T-Zelle durch ihren TZR ihr spezifisches Antigen auf einem MHC-Molekül, so bindet sie daran. CD4⁺ T-Zellen binden an MHC-II-Moleküle, CD8⁺ T-Zellen binden an MHC-I-Moleküle. Durch costimulatorische Signale, hervorgerufen durch eine Bindung von Oberflächenmolekülen der APC (CD80, CD86, CD58, CD54, CD134L, CD137L) an ihre entsprechenden Oberflächenrezeptoren der T-Zelle (CD28, CD2, CD5, CD30, 4-1BB, OX40), wird die T-Zelle aktiviert (Smith-Garvin et al. 2009; Sharpe und Abbas 2006). CD4⁺ T-Zellen differenzieren sich zu T-Helferzellen, welche B-Zellen aktivieren, CD8⁺ T-Lymphozyten differenzieren sich zu T-Killerzellen und können Pathogen-befallene Zellen erkennen und eliminieren.

B-Lymphozyten benötigen für ihre Aktivierung zwei Signale. Das erste Signal stellt die Bindung des BZR an das Antigen dar. Das zweite Signal kommt entweder von der T-Zelle (Thymus-abhängige Antigene, TD) oder vom gebundenen Antigen selbst (Thymus-unabhängige Antigene, TI) (Liu et al. 1991). B-Lymphozyten können mit ihrem BZR direkt an Antigene binden, sie benötigen keine Interaktion mit MHC-Molekülen (Janeway 2008). Sie nehmen das Antigen auf, prozessieren es und präsentieren dessen Strukturen auf ihren eigenen MHC-II-Molekülen. TD-Antigene erfordern zur Aktivierung der B-Zelle eine Interaktion mit einer T-Helfer Zelle. Trifft eine solche T-Helfer Zelle auf die entsprechende B-Zelle, so bindet der TZR an das MHC-II-Molekül der B-Zelle. Durch diese Bindung und durch weitere

costimulatorische Signale der T-Zelle kann sich die B-Zelle in eine Antikörper-sezernierende Plasmazelle (PZ) oder in eine Memory-B-Zelle differenzieren und klonal expandieren (Nutt et al. 2015). TI-Antigene können B-Lymphozyten ohne T-Zell Hilfe aktivieren. TI-Antigene sind B-Zell Mitogene, welche eine unspezifische und polyklonale B-Zell Aktivierung auslösen, oder große Moleküle mit repetitiven biochemischen Strukturen, wobei durch das gleichzeitige Binden mehrerer BZR ein Crosslinking dieser stattfindet und so das zweite Aktivierungssignal generiert wird (Lesinski und Westerink 2001; Jeurissen et al. 2004; Medzhitov und Janeway, JR 2000). Die von den entstandenen PZ sezernierten Antikörper binden an Pathogene und können diese über verschiedene Mechanismen eliminieren (Metzger und Kinet 1988; Janeway 2008).

Gleichzeitig mit den o.g. Entwicklungen bildet sich während des ersten Antigenkontakts ein immunologisches Gedächtnis, bestehend aus langlebigen B- und T-Lymphozyten, sogenannten Gedächtnis- oder Memoryzellen (Janeway 2008) (siehe „Immunologisches Gedächtnis“).

3.4 Die B-Lymphozyten

3.4.1 Entwicklung der B-Lymphozyten

Alle Blutzellen entwickeln sich aus hämatopoietischen Stammzellen im Knochenmark. Lymphoide Zellen (B-, T- und NK-Zellen) entwickeln sich aus den frühen lymphozytären Vorläuferzellen (Akashi et al. 1999). Die B-Zell Entwicklung kann in drei Phasen eingeteilt werden. In der ersten Phase entsteht im Knochenmark aus der gemeinsamen lymphoiden Vorläuferzelle die erste B-Zelllinie, die pro-B-Zelle. Durch die Entdeckung verschiedener Oberflächenmarker ist es möglich, B-Zellen in unterschiedlichen Reifungsstadien zu erfassen (Rolink et al. 2001). In der ersten Phase kommt es zu verschiedenen Genumlagerungen, welche Antigen-unabhängig im Knochenmark stattfinden und bei der Entstehung einer unreifen B-Zelle enden (Carsetti 2000). Diese trägt IgM-Immunglobuline auf ihrer Oberfläche und kann vor Verlassen des Knochenmarks auf Autoreaktivität getestet werden. Im Falle einer Autoreaktivität werden die Zellen in der zweiten Phase ausgesiekt (Pieper et al. 2013). In der dritten Phase der B-Zell Entwicklung wandern die übrig gebliebenen unreifen B-Zellen in die Milz aus. Dort differenzieren sie sich zu reifen (IgM+ und IgD+) B-Zellen (Loder et al. 1999). Sie können durch ihr spezifisches Antigen aktiviert werden und sich in PZ oder Memory-B-Zellen differenzieren (Zhang et al. 2016).

3.4.2 Affinitätsreifung

Sobald B-Lymphozyten aktiviert werden, können sie sich zu PZ differenzieren oder als aktivierte B-Lymphozyten in einen Lymphfollikel wandern (Liu et al. 1988). Dort bilden sie zusammen mit ihren assoziierten T-Zellen das Keimzentrum (MacLennan 1994; Berek und Ziegner 1993). In diesem Zentrum proliferierende B-Zellen erfahren eine Affinitätsreifung (Berek und Ziegner 1993) durch die somatische Hypermutation (SHM) (Janeway 2008; MacLennan 1994; Jacob et al. 1991b; Berek et al. 1991; Jacob et al. 1991a). In der SHM wird die V-Region des BZR verändert. Dabei finden in den entsprechenden Genen multiple Punktmutationen statt, die gegebenenfalls eine höhere Affinität der variablen Region des BZR bzw. des produzierten Immunglobulins bewirken (MacLennan 1994; WEIGERT et al. 1970; Griffiths et al. 1984; Rajewsky 1996). B-Zellen, welche nach der SHM einen stärker affinen BZR präsentieren, werden durch Costimulation der keimzentrumständigen T-Helferzellen selektiert und überleben. Ist der BZR nach der SHM weniger affin, so wird die Zelle apoptotisch (Janeway 2008). Diese hochaffinen B-Zellen können sich in Memory-B-Zellen oder in PZ differenzieren und verlassen anschließend das Keimzentrum (Zhang et al. 2016). Im Verlauf der Immunantwort findet auch ein Klassenwechsel der Immunglobuline statt. Der CD40L der T-Zelle und Interleukine bestimmen, in welche Richtung der Klassenwechsel stattfindet (Shinomiya et al. 1989). Diese Form der Diversifikation modifiziert die Antikörperaktivität und Effektorkapazität, jedoch nicht die Antigenspezifität (Kracker und Radbruch 2004; Janeway 2008).

3.5 Immunologisches Gedächtnis

Das immunologische Gedächtnis ist ein sehr wichtiger Bestandteil des adaptiven Immunsystems. Es besteht aus Antigen-spezifischen Immunzellen, welche den Körper vor der Reinfektion mit einem bestimmten Pathogen schützen. Das Immunsystem kann sich an früher eingedrungene Pathogene erinnern und bei einem Zweitkontakt effizienter und schneller reagieren (Janeway 2008; Ahmed und Gray 1996). Solche sekundären Immunantworten werden auch Gedächtnisantworten genannt. Während des ersten Kontakts mit dem Pathogen entstehen so genannte T- und B-Gedächtnis- oder Memoryzellen (Janeway 2008; Ahmed und Gray 1996; Klein et al. 2003). Die Gedächtniszellen können auch ohne regelmäßigen Antigenkontakt im Körper überleben und lassen sich im Falle einer Reinfektion schnell aktivieren (Maruyama et al. 2000; Black und Rosen 1962; McHeyzer-Williams und Ahmed 1999). T-Gedächtniszellen sind langlebige Antigen-spezifische CD4+ oder CD8+ T-Lymphozyten (MacLeod et al. 2010; Obar und Lefrançois 2010). B-Gedächtniszellen sind Antigen-spezifisch (McHeyzer-Williams und McHeyzer-Williams 2005), aber sezernieren im Unterschied zu PZ keine Antikörper (Janeway 2008). Memory-B-Zellen können ins Blut wandern (Klein et al. 1997; Klein et al.

1998; Paramithiotis und Cooper 1997) oder in sekundär lymphatischen Organen verweilen (Liu et al. 1988; Dunn-Walters et al. 1995; Tangye et al. 1998; Liu et al. 1995).

3.6 Die sekundäre Immunreaktion

Unter der sekundären Immunreaktion versteht man die Immunreaktion eines Körpers bei erneutem Kontakt mit einem Antigen, also nach stattgehabter Sensibilisierung. Die sekundäre Immunreaktion unterscheidet sich sehr stark von der primären. Sie ist stärker und läuft spezifischer ab (Tangye et al. 2003). Während des ersten Antigenkontaktes reagiert der Körper mit einer schnellen IgM-Ausschüttung. Die IgG-Sekretion hinkt aufgrund des Klassenwechsels leicht hinterher. Im Gegensatz zur primären Antwort werden beim sekundären Antigenkontakt in den ersten Tagen relativ kleine Mengen IgM ausgeschüttet, gefolgt von einer schnellen und hohen Sekretion von hochaffinen IgG- und IgA-Antikörpern (Janeway 2008). Grund dafür sind Gedächtniszellen, welche nach dem primären Antigenkontakt gebildet wurden (Tangye et al. 2003). Außerdem gibt es nach sekundärem Antigenkontakt eine bessere Interaktion zwischen Memory-B-Zellen und T-Helferzellen im Vergleich zu aktivierten B-Zellen und T-Helferzellen. Memory B-Zellen sind affiner für das Antigen, können es somit besser aufnehmen und aufgrund ihrer gesteigerten Anzahl an MHC-II-Molekülen besser präsentieren. Sie besitzen zudem eine vermehrte Anzahl an costimulatorischen Moleküle für die T-Zell Interaktion (Oliver et al. 1999; Liu und Arpin 1997). Das bedeutet, dass die B-Zell Aktivierung und Antikörperproduktion wesentlich schneller vonstattengeht.

3.7 Die Impfung

Die Aktivimpfung macht sich das Prinzip der sekundären Immunreaktion nach Sensibilisierung zunutze. Mit der Impfung soll die Infektion mit einem bestimmten Erreger verhindert werden. Dazu werden bei der Aktivimpfung dem Körper abgeschwächte, abgetötete Erreger oder auch künstlich hergestellte Antigene injiziert (Ada 2001). Diese abgeschwächten Stoffe können im Körper keine Infektion mehr verursachen, sie rufen dennoch eine Immunreaktion hervor. Dabei werden Antigen-spezifische B-Lymphozyten aktiviert, welche sich entweder zu Memory-B-Zellen oder langlebigen hochaffinen PZ differenzieren. Diese sezernieren im Gegensatz zu den ruhenden Memory-B-Zellen dauerhaft Antikörper gegen den jeweiligen Erreger, welche im Körper zirkulieren. Die zirkulierenden Antikörper können gemessen werden und die Immunität gegenüber dem Pathogen nachweisen. Sollte der Körper ein zweites Mal mit demselben Antigen infiziert werden, so können die zirkulierenden Antikörper

dieses abfangen und die Memoryzellen werden aktiviert (Janeway 2008). Sie können sich nach erneutem Antigenkontakt zu IgG-produzierenden PZ differenzieren. Genau diesen Mechanismus machen wir uns beim HBsAg-spezifischen total-IgG-ELISpot zu Nutze, indem wir PBMCs mit HBsAg stimulieren. Durch diese Stimulation sollen sich HBsAg-spezifischen Memory B-Zellen zu PZ differenzieren und IgGs ausschütten.

3.8 Transplantationsimmunologie

3.8.1 HLA und nicht-HLA

Der Major Histocompatibility Complex (MHC) ist eine Gruppe von Genen, welche Proteine kodieren, die für die Antigenpräsentation wichtig sind (Choo 2007). Beim Menschen werden diese Komplexe Human-Leucocyte-Antigens (HLA) genannt und können in Klasse I und II eingeteilt werden. Sie sind hochpolymorphe Moleküle, deren primäre Funktion die Vermittlung der Selbsttoleranz des Immunsystems gegenüber körpereigenem Gewebe und Zellen ist. Sie sind aber auch ausschlaggebend für die Initiation der adaptiven Immunantwort und somit in der Transplantationsimmunologie wichtig. HLA bilden einen körpereigenen Antigenkomplex auf der Oberfläche verschiedener Zellen. HLA Klasse I-Moleküle werden in HLA-A, -B und -C eingeteilt, HLA Klasse II in HLA-DP, -DQ und – DR. HL Klasse I-Antigene werden auf allen kernhaltigen Zellen und Thrombozyten exprimiert und sind mit intrazellulär synthetisierten Proteinen beladen. HL Klasse II-Antigene werden nur von APC und B-Lymphozyten präsentiert. Sie präsentieren auf ihren HLA II-Molekülen extrazelluläre Pathogene, welche sie zuvor internalisieren und in Fragmente proteolysieren. Die von HLA Klasse II präsentierten Antigene aktivieren CD4+ T-Lymphozyten und regen sie zur Differenzierung an (Krensky 1997; Touraine et al. 1989). Neben HLA existieren auch sogenannte nicht-HLA. Nicht-HLA finden sich beispielsweise auf Endothel- und Epithelzellen, aber auch Parenchym- und Immunzellen (Dragun et al. 2012; Zhang et al. 2011; Dragun 2008; Zou et al. 2007; Zou und Stastny 2010). Bekannte Beispiele für nicht-HLA sind MICA, Perlecan, Kollagen Typ V, Endothelin Typ A Rezeptor und Angiotensin II Typ I Rezeptor (Kauke et al. 2009; Dragun et al. 2016; Dragun 2008). Nicht-HLA spielen eine wichtige Rolle in der Transplantationsmedizin. Sie können sowohl als Auto-, als auch als Allogene die Produktion von nicht-HLA-Antikörpern im Rahmen einer Transplantation hervorrufen.

3.8.2 HLA- und Nicht-HLA-Antikörper

Werden B-Lymphozyten durch körperfremde Antigene aktiviert, so können sie Antikörper gegen die fremden Strukturen, wie z.B. fremde HL-Antigene bilden. Der Körper kann fremde HLA-Moleküle erkennen und Antikörper bilden, sogenannte HLA-Antikörper (Waßmuth 2005). Sie spielen in der Transplantationsreaktion eine wichtige Rolle (Trivedi et al. 2007). Die Existenz von HLA-Antikörpern

geht im Rahmen einer Transplantation mit einem schlechteren Outcome einher (Everly 2011; Maccarone et al. 2005; Gloor et al. 2010; Zhang et al. 2005; Mao et al. 2007). Durch Bluttransfusionen, Schwangerschaften und Transplantationen können HLA-Antikörper gebildet werden (Waßmuth 2005). Existieren HLA-Antikörper bereits vor der Transplantation, so spricht man von präformierten HLA-Antikörpern. Patienten mit präformierten HLA-Antikörpern weisen ein höheres Risiko für eine Abstoßung auf (Lefaucheur et al. 2010; Itescu et al. 1998). Der Transplantatempfänger kann bereits vor der Transplantation Donor-spezifische-Antikörper (DSA) besitzen, welche spezifisch gegen Donorantigene gerichtet sind. Sogenannte präformierte Donor-spezifische HLA-Antikörper können eine Antikörper-vermittelten Rejektion, eine progressive Organdysfunktion oder sogar den Tod des Patienten hervorrufen (Fidler et al. 2013b). DSA und nicht-DSA-Antikörper können auch erst nach Transplantation auftreten (Cai et al. 2006). Sie gehen mit einem schlechteren Outcome einher (Fidler et al. 2013a). Es existieren verschiedene Tests, welche HLA-Antikörper im Blut des Empfängers vor Transplantation und im Verlauf messen können (3.8.6 Diagnostik in der Transplantationsimmunologie). Allerdings gibt es noch keine reliablen reproduzierbaren und standardisierten Tests zur Messung von nicht-HLA-Antikörpern. Ein großes Hindernis ist die hohe Vielfalt der nicht-HLA-Moleküle (Praprotnik et al. 2001; Aird 2007a, 2007b; Bates et al. 2003). Nicht-HLA-Antikörper gehen mit einer chronischen Abstoßung und einem geringeren Transplantatüberleben einher (Sumitran-Holgersson et al. 2002; Mizutani et al. 2005). Nicht-HLA-Antikörper können als Allo- aber auch als Autoantikörper auftreten (Dragun et al. 2013). Angriffspunkt für nicht-HLA-Antikörper können Endothel- und Epithelzellen sein, aber auch Parenchym- und Immunzellen (Dragun et al. 2012; Zhang et al. 2011; Dragun 2008; Zou et al. 2007; Zou und Stastny 2010). Nicht-HL-Autoantigene können im Rahmen der Transplantatschädigung exponiert werden (Thaunat et al. 2012; Zhang und Reed 2016). Der Mechanismus der Entstehung solcher Autoantikörper im Rahmen der Abstoßungsreaktion muss noch weiter abgeklärt werden (Zhang und Reed 2016).

3.8.3 Zelluläre Abstoßungsreaktion

Eine Abstoßungsreaktion kann zum Transplantatversagen führen (Arakelov und Lakkis 2000). Der Körper erkennt das transplantierte Organ als fremd und greift es an. Die akute zelluläre Abstoßung ist vor allem T-Zell vermittelt. Eine akute zelluläre Rejektion zeigt sich pathologisch beispielsweise an der Niere mit einer Akkumulation mononukleärer Zellen im Interstitium mit einer begleitenden Tubulitis und Arteritis. Histopathologisch kommt es zu einer Endothelschädigung mit Zellschwellung, Mikrothrombenbildung, Neutrophileninfiltration und einem interstitiellen Ödem (Trpkov et al. 1996). Den größten Anteil an mononukleären Zellen im Transplantat stellen CD4+ und CD8+ T-Lymphozyten dar. Das angeborene Immunsystem aktiviert das adaptive Immunsystems, jedoch ist es auch selbst für einen gewissen Teil der Transplantatschädigung

verantwortlich (Li 2010). Die Abstoßungsreaktion, welche vom angeborenen Immunsystem ausgeht, ist Antigen-unabhängig. Die Reaktion des angeborenen Immunsystems wird durch „Damage-associated molecular patterns“ (DAMPs) und PAMPs hervorgerufen, welche im Rahmen der Operation durch Ischämie-Reperfusionsschäden und Infektionen auftreten (Chong und Alegre 2012). Es kommt zu einer Entzündungsreaktion und Komplement-Aktivierung, sowie zur Ausschüttung proinflammatorischer Zytokine. Zusätzlich werden Leukozyten rekrutiert und das adaptive Immunsystem wird miteinbezogen. Aktivierte Makrophagen unterstützen die lokale Entzündungsreaktion. Sie produzieren Enzyme, welche vaskuläre Endothel- und Parenchymzellen schädigen. Zusätzlich sezernieren sie Chemokine und Wachstumsfaktoren, welche weitere Immunzellen anlocken. Die angelockten Zellen des angeborenen Immunsystems sind als APC für das angeborene Immunsystem wichtig. Über das angeborene Immunsystem kann das Komplementsystem aktiviert werden, welches zu einer Lyse der Zielzelle führt. Neutrophile erreichen eine Gewebsschädigung durch die Sekretion verschiedener Chemokine. Sie produzieren zudem reaktive Sauerstoffspezies (ROS) und erreichen damit eine vaskuläre Leckage, welche die Diapedese weiterer Entzündungszellen ermöglicht. Natürliche Killerzellen (NK) werden auch im Rahmen der Entzündung aktiviert und können Zielzellen töten (Pratschke et al. 2009). CD8+ zytotoxische T-Lymphozyten können nach ihrer Aktivierung im Transplantat zytotoxische Granula freisetzen, welche Perforin und Granzym-B enthalten. Perforin ist in der Lage eine Pore in der Zielzelle zu erzeugen, durch welche die Protease Granzym-B in die Zelle eindringt und in dieser die Apoptose initiiert. Aktivierte zytotoxische-T-Zellen exprimieren auch verstärkt den Fas-Liganden. Der Ligand bindet an den Fas-Rezeptor der Zielzelle und triggert so die Induktion der Apoptose. CD4+ aktivierte T-Lymphozyten lösen in der Effektorphase eine verzögerte Hypersensitivitätsreaktion aus. Dabei werden proinflammatorische Zytokine, wie Interleukin (IL)-1, Tumornekrosefaktor (TNF)- α und Interferon (IFN)- γ ausgeschüttet. Sie erzeugen eine Transplantatschädigung durch die hervorgerufene Infiltration von aktivierten Leukozyten und die Freisetzung von unspezifischen Mediatoren, wie Stickstoffmonoxid, Leukotriene, Thromboxan. Diese Prozesse beeinträchtigen die Transplantatfunktion durch eine Veränderung der Zellpermeabilität und des Muskeltonus der glatten Gefäßmuskulatur (Bedi et al. 2010). Aktivierte CD4+ T-Lymphozyten unterstützen die B-Zell Proliferation, Antikörperproduktion und Affinitätsreifung.

T-Zellen können auf drei unterschiedliche Art und Weisen durch das Spenderorgan aktiviert werden: auf dem direkten, dem indirekten und dem semidirekten Weg (Benichou et al. 2011).

3.8.3.1 Direkter Weg der T-Zell Aktivierung

In durchbluteten Organen befinden sich nach Transplantation so genannte „Passenger Leukozyten“ des Spenders (Talmage et al. 1976). Sie können im Empfängerkörper das Transplantat verlassen und in Lymphknoten migrieren (Larsen et al. 1990), wo sie auf Empfängerzellen treffen.

CD4+ und CD8+ T-Lymphozyten können nach Organtransplantation aktiviert werden. Dabei erkennen die Empfänger T-Zellen Donor-MHC-Moleküle, welche von Spender APC präsentiert werden. Die fremden MHC-Moleküle sind denen des Empfängers zwar nicht identisch, jedoch ausreichend ähnlich, sodass der TZR sie erkennt (Kaye und Hedrick 1988; Daniel et al. 1998). Der Grund hierfür könnte in einer Kreuzreaktivität in der Erkennung zwischen Eigen- und Fremd MHC-Molekülen liegen (Lombardi et al. 1990). Es ist möglich, dass alloreaktive T-Zellen strukturell verschiedene Donor-MHC-Moleküle unabhängig davon erkennen können, welches Peptid sie gebunden haben (Berkowitz und Braunstein 1992). Sind die MHC-Moleküle zwischen Empfänger und Spender strukturell ähnlich, so erkennt die T-Zelle die fremde MHC/ Peptid Kombination (Catipovic et al. 1992). Nach Aktivierung der Empfänger T-Zelle im Lymphfollikel durch Spenderzellen, wandert sie als Effektorzelle in das Transplantat und zerstört das fremde Gewebe.

Die durch Donor-APC ausgelöste Immunantwort ist zwar sehr stark, jedoch kurzlebig (Nadazdin et al. 2011). Die Donor-APC sind nach einiger Zeit aufgebraucht und die Donorantigene werden von Empfängerzellen über den indirekten Weg präsentiert (Auchincloss, JR et al. 1993).

3.8.3.2 Indirekter Weg der T-Zell Aktivierung

Befinden sich im Spenderorgan keine Spender-APC mehr, so müssen die Empfänger T-Lymphozyten über einen anderen Mechanismus aktiviert werden. Empfänger-APC prozessieren Spenderantigene und präsentieren sie ihren T-Lymphozyten (Fangmann J, Dalchau R, Fabre JW. 1992; Benichou G, Takizawa PA, Olson CA, Mcmillan M, Sercarz EE. 1992; Liu et al. 1992). Zu den APC zählen auch B-Lymphozyten (Pierce et al. 1988).

Jedes Donorprotein, welches sich vom Empfängerprotein unterscheidet, kann als Antigen fungieren. Die auf diesem Weg aktivierten T-Helferzellen können die Aktivierung von CD8+ zytotoxischen T-Zellen fördern und die Produktion von Alloantikörpern anregen (Liu et al. 1996). Der indirekte Weg spielt in der Entstehung der chronischen Abstoßungsreaktion eine wichtige Rolle (Baker et al. 2001).

3.8.3.3 Semidirekter Weg der T-Zell Aktivierung

Der semidirekte Weg ist eine Mischung aus dem indirekten und dem direkten Weg. Hier können ganze MHC-Moleküle von Spender- auf Empfänger-APC transferiert werden (Smyth et al. 2006), wohingegen im indirekten Weg ausschließlich Fragmente von Donor-MHC präsentiert werden. Empfänger-APC können sowohl Alloantigene präsentieren und T-Zellen über den indirekten Weg, als auch direkt T-Zellen mit dem fremden MHC-Molekül aktivieren.

3.8.4 Antikörper-vermittelte Abstoßungsreaktion

B-Zellen und Alloantikörper spielen sowohl in der akuten, als auch in der chronischen Abstoßung eine wichtige Rolle (Hippen et al. 2005; Lehnhardt et al. 2006; Clatworthy 2011; Dijke et al. 2016; Zeng et al. 2014; Mao et al. 2007; Sis et al. 2007). Alloantikörper richten sich gegen HLA I- und II-Moleküle

(Erich et al.) und gegen nicht-HLA (Zou et al. 2007; Carter et al. 2005; Kekomaki et al. 2001; Zhang et al. 2011). DSA binden spezifisch an Donor-HLA oder Donor-nicht-HLA (Valenzuela und Reed 2013). DSA-, HLA- und nicht-HLA-Antikörper gehen mit einem erhöhten Risiko von Organversagen einher (Gaston et al. 2010; Kauke et al. 2009). Nicht-HLA sind z.B. MICA, Angiotensin II Typ I Rezeptoren, Vimentin und andere (Dragun et al. 2016). MICA ist ein MHC-Klasse I verwandtes Antigen A und wird von Endothel-, Epithelzellen und Fibroblasten exprimiert (Kauke et al. 2009). Das Vorkommen von Anti-MICA-Antikörpern ist bei Herztransplantationen mit einem höheren Risiko von akuter Transplantatabstoßung und Vaskulopathie (Kauke et al. 2009) und bei Nierentransplantationen mit einem schlechteren Transplantatüberleben assoziiert (Mizutani et al. 2006; Zou et al. 2006).

Viele Studien (Dragun und Hegner 2009; Kauke et al. 2009; Zhang et al. 2011; Sumitran-Holgersson et al. 2002) weisen darauf hin, dass nicht-HLA-Antikörper eine Rolle in der Transplantatabstoßung spielen. Der genaue Wirkmechanismus und die Interaktion zwischen nicht-HLA-Antikörpern, HLA-Antikörpern und Effektorzellen sind noch nicht genau verstanden. Es gibt noch keine routinemäßig durchgeführten standardisierten Methoden nicht-HLA-Antikörper zu erfassen. Zur Risikostratifizierung nach Organtransplantation sollten neben der Detektion von HLA-Antikörpern auch nicht-HLA-Antikörper detektiert werden (Zhang und Reed 2016; Kauke et al. 2009; Dragun und Hegner 2009; Sumitran-Holgersson et al. 2002).

Von PZ sezernierten Antikörper können das Organ über einen Komplement-vermittelten und einen Komplement-unabhängigen Weg schädigen (Miltenburg et al. 1989; Stegall et al. 2009). In der Antikörper-vermittelten Abstoßung sind vor allem Gefäßendothelzellen betroffen. Antikörper, welche Komplement-abhängig agieren, weisen eine höhere Rate an akuten und chronischen Rejektionen auf. Die Komplement-vermittelte Abstoßung ist vor allem in der akuten und hyperakuten Abstoßung relevant. Komplement bindende DSA können an das Endothel binden und durch ihr Fc-Fragment das Komplementsystem aktivieren (Valenzuela und Reed 2013). Im Verlauf der Komplementkaskade entsteht das Molekül C4d durch Inaktivierung von C4b. C4d bleibt kovalent an das Gewebe gebunden und kann deshalb als in situ Marker für eine Komplementaktivierung dienen (Feucht et al. 1991). Das Auftreten von DSA korreliert mit dem Auftreten von C4d Ablagerungen (Mauiyyedi et al. 2001; Cardarelli et al. 2005). Am Ende der Komplementkaskade steht der Membranangriffskomplex (MAC). Der MAC ist eine durch Komplementfaktoren gebildete Pore in der Zellmembran, welche zur Zellyse führt. Die Komplementspaltprodukte wirken als Chemotaxine (Hartmann et al. 1997) und opsonieren fremde Zellen (Merle et al. 2015; Hughes und Cohn 2011). Die Antikörper-vermittelte Komplementaktivierung hat eine Endothelschädigung zur Folge, welche zu einer Plättchenaktivierung und Thrombenbildung führt (Janicek et al. 1990). Pathologisch finden sich fokale Ischämien, Gefäßzerstörungen und diffuse Koagulation.

Antikörper können das Transplantat auch Komplement-unabhängig über eine direkte Bindung der Antikörper an das Endothel auf verschiedene Arten schädigen (Zhang und Reed 2009). Dieser Komplement-unabhängige Weg ist vermutlich hauptsächlich in der chronischen Abstoßung wichtig (Rahimi et al. 1999; Akiyoshi et al. 2012; Yuan et al. 2004). Antikörper gegen MHC-I-Moleküle aktivieren beispielsweise Endothelzellen und glatte Muskelzellen, was eine Zellproliferation und Transplantat-Vaskulopathie zur Folge hat (Jin et al. 2005; Harris et al. 1997; Zhang et al. 2010; Galvani et al. 2009). Außerdem induzieren sie zytoskelettale Veränderungen, welche eine Zellmigration und eine gesteigerte Endothelpermeabilität auslösen (Li et al. 2011). Aktiviertes Endothel begünstigt eine Inflammation und Koagulation (Saadi et al. 1995; Saadi et al. 2002; Saadi et al. 2004). Diese Vorgänge führen zu einer Minderdurchblutung des Transplantats und zu einer Verschlechterung der Organfunktion. Antikörper können über den Komplement-unabhängigen Weg auch durch die Antikörperabhängige zellvermittelte-Zytotoxizität (ADCC) das Transplantat schädigen. In der ADCC interagieren die Immunglobuline über ihren Fc-Teil mit NK-Zellen und Makrophagen (Lee et al. 2007). Dieser Mechanismus nennt sich Opsonierung. Durch die Bindung der Immunglobuline an die Donorzellen werden diese für Killerzellen und Makrophagen leichter auffindbar. NK-Zellen erkennen die mit Antikörpern markierten Zellen und können Endothelschäden oder eine Zellyse hervorrufen (Hidalgo et al. 2010).

Präformierte Antikörper gegen Donorantigene sind Ursache für eine hyperakute Transplantatrejektion (Patel und Terasaki 1969; Della-Guardia et al. 2008; Kissmeyer-Nielsen et al. 1966). Innerhalb von Minuten bis Stunden findet das Organversagen statt. Ausgelöst wird die hyperakute Abstoßung durch Antikörper, welche an das Endothel der Blutgefäße binden und das Komplementsystem aktivieren (Platt et al. 1990). Durch die Komplementaktivierung kommt es zur Plättchenaktivierung und Thrombenbildung. Histopathologisch finden sich schwere Endothel- und Gefäßschädigungen, ein interstitielles Ödem und Ischämien.

3.8.5 Die B-Zelle in der Transplantationsimmunologie

Während sich das Kurzzeitüberleben der transplantierten Organe gebessert hat, ist das Langzeitüberleben noch nicht zufrieden stellend. Die Pathogenese des chronischen Organversagens ist multifaktoriell. Ein wichtiger Teil ist die immunologisch vermittelte Rejektion. Von B-Zellen sezernierte Antikörper, welche sich gegen gegen Donor-spezifische Antigene oder nicht-HLA-Moleküle richten, sind für einen Teil der Organschädigung verantwortlich. Die Entstehung von de novo DSA korreliert mit einem schlechteren Transplantatoutcome (Wiebe et al. 2012). Wiebe et al zeigen jedoch, dass der Einfluss von nicht Donor-spezifischen de novo HLA-Antikörpern oder bereits prätransplant existierenden HLA-Antikörpern auf das Transplantatoutcome noch nicht ausreichend geklärt ist (Wiebe et al. 2012). Oft geht dem Organversagen das Auftreten von DSA voran. Demnach

können DSA als wichtige prognostische Biomarker gelten (Worthington et al. 2003; Lee et al. 2002; Terasaki 2003). Allerdings werden bei Patienten mit chronischem Transplantatversagen manchmal keine Donor-spezifischen de novo HLA-Antikörper nachgewiesen. Man vermutet, dass die DSA womöglich vom Transplantat vollständig absorbiert wurden und somit nicht messbar waren (Terasaki 2003). Um dennoch eine Spender-spezifische Reaktion messen zu können, könnten anstatt der Antikörper Spender-spezifische Memory-B- und Plasmazellen detektiert werden. Bis jetzt gibt es noch keinen Assay, der die Detektion und Quantifizierung von Spender-spezifischen Memory-B- und Plasmazellen ermöglicht.

B-Zellen schädigen das Transplantat nicht nur durch die Produktion von Alloantikörpern, sondern sie dienen im indirekten Weg auch als APC für alloreaktive T-Zellen (Alegre et al. 2007; Zeng et al. 2014; Noorchashm et al. 2006). Im Tiermodell gelang es Zeng et al. zu zeigen, dass eine chronische Rejektion in Abwesenheit von Antikörpern auftreten kann, allerdings nicht in Abwesenheit von B-Lymphozyten (Zeng et al. 2014). B-Lymphozyten bieten T-Zellen starke Aktivierungs- und Proliferationssignale (Shiu und Dorling 2014; Ng et al. 2010). Die T-Lymphozyten können sich durch die B-Zellen in Effektorzellen differenzieren und eine Rejektion hervorrufen (Janeway 2008).

Für die T-Zell Proliferation reicht die Interaktion mit DC nicht aus. In einer Studie von Crawford et al. teilten sich die T-Zellen in Abwesenheit von Ag-Präsentation durch B-Lymphozyten weniger häufig (Crawford et al. 2006). Lanzavecchia und Sallusto behaupten, dass die T-Zell Differenzierung von der Signalstärke reguliert werde. Die Stärke des Signals kann die Differenzierung der T-Zellen entweder in Effektor- oder Memory-T-Zellen beeinflussen (Lanzavecchia und Sallusto 2002). Hierzu zeigen die Ergebnisse von Crawford et al., dass B-Zellen eine bedeutende Rolle besitzen, die Stärke des Signals zu beeinflussen (Crawford et al. 2006). B-Zellen regen außerdem die Entwicklung von dendritischen Zellen an (Golovkina et al. 1999; Fu und Chaplin 1999) und beeinflussen die Entwicklung und Zusammensetzung von Lymphorganen (Colombo et al. 2014; Fu und Chaplin 1999). B-Zellen sind an der Entstehung von B-Zell Follikeln beteiligt (Gonzalez et al. 1998), T-Zell Zonen in der Milz (Ngo et al. 2001) und bei der Entwicklung und Aufrechterhaltung der Milzarchitektur (Nolte et al. 2004). Ohne intakte Architektur kann die Milz ihre Funktion in der Immunabwehr nicht effizient ausüben.

B-Lymphozyten und polyklonale Immunglobuline sind für die große TZR-Variabilität mitverantwortlich (Joao et al. 2004). Eine größere Variabilität bedeutet, dass das Immunsystem eine größere Anzahl an Fremdantigenen spezifisch erkennen und eine vermehrte Interaktion zwischen T- und B-Lymphozyten stattfinden kann. B-Zellen können weiterhin die IFN- γ Ausschüttung von T-Zellen verstärken (Menard et al. 2007) und fördern die Differenzierung und Aktivierung von regulatorischen T-Zellen (Carter et al. 2011; Tu et al. 2008; Groot et al. 2008). Auch im Erhalt des T-Zell Gedächtnisses sind B-Lymphozyten wichtig (Morales-Aza et al. 2009; Crawford et al. 2006; Ng et al. 2010).

B-Zellen können das Immunsystem durch die Sekretion von verschiedenen Interleukinen regulieren (DiLillo et al. 2010). Einige der B-Zell sezernierten Zytokine können die Immunantwort verstärken (Harris et al. 2000), während andere hingegen die Immunantwort supprimieren (Fillatreau et al. 2002; Sugimoto et al. 2007; Caver et al. 1996).

B-Zellen spielen eine Rolle in der Bekämpfung von Antigenen, aber auch im Erhalt der Selbsttoleranz (Matsushita et al. 2008). B-Zellen sind nicht nur in der Rejektion, sondern wohl auch in der Transplantattoleranz von Bedeutung (Newell et al. 2010; Sagoo et al. 2010). Als regulatorische B-Zellen können sie die Immunpathogenität unterdrücken (Rosser und Mauri 2015). B-Lymphozyten sind also nicht nur für die Antikörperproduktion von Bedeutung, sondern auch in vielen weiteren Bereichen. Ihre zahlreichen Funktionen bei der Alloimmunität und Transplantation sind noch nicht ausreichend bekannt und müssen noch näher untersucht werden. Mit einem umfassenderen Verständnis können Immunantworten und Abstoßungsreaktionen besser kontrolliert und reguliert werden.

3.8.6 Diagnostik in der Transplantationsimmunologie

3.8.6.1 *Komplementabhängiger Lymphozytotoxizitätstest (LZT)*

Der von Terasaki entwickelte Mikrolymphozytotoxizitätsassay war der erste Assay, welcher HLA-Antikörper im Empfängerblut nachweisen konnte (Terasaki und McCLELLAND 1964). Vom Spender isolierte Lymphozyten werden auf eine Platte gegeben und dort mit Antikörper-haltigem Serum des Empfängers inkubiert. So können HLA-Antikörper vom Empfänger an HLA-Moleküle des Spenders binden. Nach der Bindung wird Komplement dazu pipettiert. Dieses wird durch die Antikörper-Lymphozyten Bindung aktiviert und tötet die mit dem Antikörper markierte Zelle ab. Diese Zytotoxizität wird mittels eines hinzugefügten Farbstoffes sichtbar gemacht. In diesem Assay wird also nicht die reine Antikörperreaktivität gegenüber dem Spender sichtbar gemacht, sondern die Komplement-Aktivierung durch den Antikörper. Das bedeutet, dass nur Antikörper erfasst werden können, welche in der Lage sind, Komplement zu aktivieren.

Mit diesem Assay lässt sich auch der Grad der HLA-Immunisierung des Patienten bestimmen. Auf einer Platte werden Lymphozyten von bis zu 50 gesunden Blutspendern mit bekanntem HLA zusammen mit dem Patientenserum inkubiert. Enthält das Empfängerserum Antikörper gegen die vorliegenden HLA der Blutspender, so werden die Lymphozyten der Spender mithilfe von Komplement lysiert und sichtbar gemacht. Anhand der positiven Proben kann der Immunisierungsgrad des Empfängers im Sinne der Panelreaktivität (PRA) prozentual definiert werden.

Dieser Assay eignet sich auch zur Durchführung einer präoperativen Kreuzprobe mit Spender- und Empfängermaterial, um eine mögliche Abstoßungsreaktion voraussagen zu können (Claas und Doxiadis 2009).

Antikörper gegen nicht-HLA, sowie nicht Komplement-bindende Antikörper können mit diesem Test nicht erfasst werden. Im Falle einer Absorption aller Donor-spezifischen Antikörper durch das Transplantat kann es trotz einer vorhandenen immunologischen Reaktion zu einem negativen Testergebnis kommen.

3.8.6.2 Enzyme linked immuno-sorbent Assay (ELISA)

Im ELISA werden über Enzym-markierte Antikörper Antigen-Antikörper-Komplexe nachgewiesen. Auf einer Platte befinden sich aufgereinigte HLA I- und II-Moleküle. Zu diesen Molekülen wird Patientenserum hinzugegeben. Nach der Bindung der HLA-Antikörper an die HL-Antigene werden Enzym-markierte anti-human-Antikörper, meistens gegen IgG gerichtet, dazu pipettiert. Sie binden an den entstandenen Antikörper-Antigenkomplex und machen nach Zugabe eines Substrates diese Bindung durch eine Farbreaktion sichtbar (Mehra et al. 2013).

Dieser Assay ermöglicht ausschließlich eine Aussage darüber, ob HLA-Antikörper vorhanden sind oder nicht. Eine Antikörper-Spezifisierung ist nicht möglich.

3.8.6.3 Festphasen-Immunoassay: Luminex

Eine wichtige Entwicklung in der Bestimmung der Alloreaktivität ist der Luminex-Assay (Biotechnology Corporation, Austin, Texas, United States). Er ermöglicht mittels durchflusszytometrischer Messungen sowohl eine qualitative als auch eine quantitative Erfassung von HLA-Antikörpern.

In dieser Technik werden Polystyrolkügelchen, sogenannte Beads (3-6µm im Durchmesser), eingesetzt, welche mit einer Mischung aus zwei Farbstoffen gepaart sind. Die Beads sind mit einem gereinigten, spezifischen Antigen (z.B. HL-Antigen) gekoppelt. Durch die spektrale Überlappung von zwei Farbstoffen ist die Differenzierung einer großen Anzahl verschiedener Beads möglich. Wird zu den Beads Empfängerserum gegeben, binden HLA-spezifische IgG-Antikörper des Empfängers an ihre zugehörigen Beads. Am Ende wird ein fluoreszenzmarkierter anti-human-Detektionsantikörper dazugegeben. Er markiert die entstandene Antikörper-Antigen Bindung auf dem Bead. Mittels der Durchflusszytometrie kann diese Markierung detektiert und erfasst werden. Mithilfe von Lasern kann außerdem die Spezifität des Antikörpers durch die Farbstoffmischung auf dem jeweiligen Bead ausfindig gemacht werden. Ein Laser detektiert dabei die farbcodierten Beads, während der andere Laser den daran gebundenen fluoreszierenden Sekundärantikörper erfasst (Colombo et al. 2007). Mit der Luminex-Methode kann ein Screening-Test durchgeführt werden, in dem Beads eingesetzt werden, welche mit Antigenen der Klasse HLA-I (A, B und C) und der Klasse HLA-II (DQB1, DRB1 und

DQA) beladen sind. Dieser Screening-Test ermöglicht eine Aussage darüber, ob HLA-Antikörper vorhanden sind (Haarberg und Tambur 2014). Für spezifischere Analysen gibt es das single-antigen-bead-System. Dabei werden die Beads mit einem bestimmten Antigen beladen. So können die Antikörper auf eine bestimmte Spezifität untersucht werden (El-Awar et al. 2007).

Dieser Test ist somit sensitiver als der LCT oder der ELISA. Er kann neben der Detektion von HLA-Antikörpern auch Auskunft über deren Spezifität geben und somit zum Beispiel zwischen Donor-spezifischen und nicht Donor-spezifischen Antikörpern unterscheiden.

3.8.6.4 HLA-spezifischer ELISpot

Heidt et. al entwickelte einen HLA-spezifischen ELISpot. Zum Immunomonitoring nach Transplantation können im Empfänger donorspezifische HLA-Antikörper detektiert werden. Die Messung von HLA-Antikörpern erfasst allerdings nicht die gesamte Immunantwort. Im Rahmen einer Transplantation kann es z.B. auch zur Absorption von HLA-Antikörpern im Transplantat kommen. In einem solchen Fall können keine HLA-Antikörper nachgewiesen werden. Um dieses Problem zu umgehen, entwickelte Heidt einen ELISpot, in dem nicht die Donor-spezifischen HLA-Antikörper, sondern die Frequenz der zirkulierenden HLA-spezifischen Memory-B-Zellen gemessen wird. In seinem ELISpot Ansatz werden unspezifisch B-Zellen stimuliert. Durch die Stimulation werden sie aktiviert und zur Differenzierung zu IgG-sezernierenden PZ angeregt. Die ELISpot Platte ist mit bestimmten HLA-Monomeren beschichtet. PZ, welche IgGs spezifisch gegen die aufgetragenen HLA-Moleküle sezernieren, können mit ihren BZR an die HLA-Monomere auf der Platte binden. Die detektierten Spots entsprechen somit der Anzahl der zirkulierenden HLA-spezifischen Memory-B-Zellen (Heidt et al. 2012).

Heidt et al. ist es gelungen, eine Methode zur Identifikation von HLA-spezifischen B-Zellen zu etablieren. Da jedoch die Immunreaktion des Empfängers gegen eine große Anzahl von HLA und nicht-HLA des Spenders erfolgt (Aguilera et al. 2008; Sun et al. 2011; Dragun et al. 2013; Kauke et al. 2009; Kaczmarek et al. 2008), ist eine Detektion aller Spender-spezifischen B-Zellen nicht möglich.

3.8.6.5 Spender-spezifischer IFN- γ release ELISpot

Die Spender-spezifischen T-Lymphozyten im Empfängerblut können mit dem Spender-spezifischen IFN- γ release ELISpots gemessen und quantifiziert werden. In diesem Assay werden Empfänger-PBMCs mit inaktivierten Spender-PBMCs stimuliert. Erhalten Spender-spezifische T-Zellen einen adäquaten Stimulus, werden sie aktiviert und sezernieren IFN- γ (Bestard et al. 2013). Die im ELISpot gemessenen Spots werden als aktivierte, IFN- γ sezernierende Spender-spezifische T-Lymphozyten gewertet. Die ELISpot Platte ist mit einem anti-human IFN- γ Antikörper beschichtet und kann von den Zellen sezerniertes IFN- γ binden. Empfänger und inaktivierte Spenderzellen werden nach einer

Inkubationszeit auf die ELISpot Platte gesetzt, bis der Antikörper auf der ELISpot Platte das IFN- γ bindet. Die Zellen werden von der Platte gewaschen und ein sekundärer biotinylierter Antikörper, welcher gegen humanes IFN- γ gerichtet ist, wird auf die Platte pipettiert. Dieser Antikörper bleibt nur auf jenen Stellen der Platte gebunden, an welchen IFN- γ durch eine T-Zelle sezerniert wurde. Sobald dieser gebunden hat, kommt das Enzym Streptavidin-HRP auf die Platte. Das Streptavidin bindet mit hoher Affinität an das Biotin des Antikörpers und bleibt somit auch auf der Platte gebunden. Das HRP, welches an das Streptavidin gekoppelt ist, interagiert schließlich mit dem Substrat TMB. Dies zeigt sich durch einen Farbumschlag. Durch diese Reaktionen werden Spots auf der Platte sichtbar, welche anhand eines ELISpot Readers erfasst werden. Dieser Spender-spezifische T-Zell ELISpot diente als Vorlage für die Etablierung des Spender-spezifischen total-IgG-ELISpot.

3.8.7 Immunsuppressive Therapie in der Transplantationsimmunologie

Um eine langfristige Transplantatfunktion gewährleisten zu können, ist die konsequente Einnahme von Immunsuppressiva unerlässlich. Sie verhindern die Abstoßung des Transplantates durch das eigene Immunsystem. Immunsuppressiva können in verschiedene Substanzklassen eingeteilt werden: Kortikosteroide, Calcineurininhibitoren (CNI), mTOR-Inhibitoren und Antimetabolite. Die Substanzklassen beeinflussen das Immunsystem auf unterschiedliche Art und haben dadurch verschiedene Nebenwirkungen. Immunsupprimierte leiden an erhöhter Infektanfälligkeit und an gehäuftem Auftreten von Malignomen (Dunn 1990; Sheil et al. 1993).

Kortikosteroide werden aufgrund ihres entzündungshemmenden und immunsuppressiven Effekts nach Transplantation eingesetzt. Sie bewirken eine verminderte Zytokinbildung und -freisetzung und somit eine verminderte B- und T-Zell Immunantwort (Post et al. 2005). Allerdings sind sie mit zahlreichen Nebenwirkungen verbunden. Unter Einnahme kann es zu erhöhter Infektanfälligkeit, arterieller Hypertonie, Hyperlipidämie, Diabetes mellitus, Osteoporose, Muskelatrophie, Kataraktentstehung, Depression und zu einer Wachstumsverzögerung bei Kindern kommen (Buchman 2001).

Zu den CNI gehören Tacrolimus und Cyclosporin A. Sie blockieren das Enzym Calcineurin und greifen so in die Signaltransduktion und Aktivierung von T-Zellen ein. Calcineurin spielt eine Schlüsselrolle in der Regulation der Immunantwort (Molkentin et al. 1998). Durch die Inhibierung von Calcineurin kommt es zu einer verminderten Produktion von IL-2 sowie von anderen Zytokinen und dadurch zu einer geringeren Aktivierung von T-Lymphozyten. Die zelluläre Immunantwort wird reduziert. Die Nebenwirkungen der CNI sind erhöhte Infektanfälligkeit, Nephro-, Neuro- und Hepatotoxizität,

Hypertrichose, Diabetes mellitus, arterielle Hypertonie und Gingivahyperplasie. Außerdem besteht unter Einnahme von CNIs ein erhöhtes Risiko für die Entstehung von Malignomen (Wiseman 2016).

mTOR-Inhibitoren wie Sirolimus und Everolimus hemmen die mTOR-Kinase. Dadurch kommt es zu einer Blockade der Signaltransduktion, welche für die Proliferation der T-Lymphozyten zuständig ist. Somit wird durch die Einnahme von mTOR-Inhibitoren die T-Zell vermittelte Abstoßungsreaktion unterdrückt. Die Nebenwirkungen von mTOR-Inhibitoren sind Myelosuppression, Lymphödeme, Fertilitätsstörungen bei Männern, Stomatitis, Hyperlipidämie, Diarrhö und Hautausschläge (Kaplan et al. 2014).

Mycophenolat-Mofetil (MMF) hemmt als Antimetabolit die Proliferation der Lymphozyten. MMF wird im Körper zu Mycophenolsäure umgewandelt, welche die Inosinmonophosphat-Dehydrogenase (IMPDH) hemmt und somit die Synthese von Guanosin verhindert. Durch das Fehlen von Purin ist die Zellteilung der Lymphozyten gehemmt (Villarreal et al. 2009). Nebenwirkungen von MMF betreffen vor allem den Gastrointestinaltrakt (Behrend 2001) und Blutbildveränderungen (Sobiak et al. 2013). Azathioprin wirkt auch als Antimetabolit hemmend auf die Proliferation von Lymphozyten. Azathioprin wird im Körper zu 6-Mercaptopurin verstoffwechselt. Dieses ist ein Purinanalogen, welches die DNA- und RNA-Synthese hemmt und somit die Zellteilung verhindert. Die Nebenwirkungen von Azathioprin sind Myelosuppression und gastrointestinale Beschwerden (Wiseman 2016).

In der immunsuppressiven Therapie gibt es verschiedene Phasen: man unterscheidet die Induktions- von der Erhaltungstherapie. Dabei wird in jeder Phase die Therapie an das Risikoprofil des Empfängers angepasst. Als Induktionstherapie bezeichnet man die perioperative Gabe von hochdosierten Immunsuppressiva. Die Therapie besteht entweder aus einer hochdosierten Gabe von mehreren Immunsuppressiva oder aus einer Antikörpertherapie. In der Antikörpertherapie werden beispielsweise das Anti-Thymozyten-Globulin (ATG), der CD52-Antikörper Alemtuzumab oder der IL-2 Rezeptor Basiliximab eingesetzt (Enderby und Keller 2015). Die initiale Erhaltungstherapie wird meist als Triple-Therapie begonnen. Durch die Kombination lässt sich die Wirksamkeit der Immunsuppression verbessern und die Verträglichkeit der Immunsuppressiva steigern. Die Dosierung der einzelnen Wirkstoffe kann bei gleichbleibendem immunsuppressivem Effekt reduziert und die Nebenwirkungen können damit verringert werden. In der Langzeit-Erhaltungstherapie wird die Dosis der Immunsuppressiva nach Möglichkeit reduziert und meist eine Substanzklasse abgesetzt (Türk et al. 2010; Enderby und Keller 2015). Wegen der starken Nebenwirkungen der Medikamente und insbesondere der de novo Entstehung von Malignomen gibt es bereits Daten zur Entwöhnung von der Immunsuppression für spezielle Patientengruppen (Mazariegos et al. 1995; La Garza et al. 2013; Orlando 2010). Aufgrund der starken Nebenwirkungen wird weiterhin nach neuen Ansatzpunkten für die Immunsuppression und alternativen Wirkmechanismen geforscht.

4 Hypothese

Die zelluläre Abstoßungsreaktion ist schon gut untersucht und verstanden. Für den Nachweis dieser ist die Biopsie des Transplantats der Goldstandard. Für die Antikörper-vermittelte Abstoßung gibt es in der Nierenbiopsie klare histopathologische Veränderungen und Diagnosekriterien (Loupy et al. 2017), wie z.B. die C4d Ablagerung (Feucht et al. 1991). Allerdings kann in der Leber- und Lungentransplantation durch die Biopsie eine humorale Abstoßung noch nicht definitiv ausgeschlossen werden, die Diagnosekriterien für eine Antikörper-vermittelte Rejektion sind noch nicht definiert (Bellamy et al. 2007; Lee 2017; Mengel et al. 2012; Glanville 2010; Roux et al. 2018).

Die T-Lymphozyten spielen eine wichtige Rolle in der Abstoßungsreaktion und sind bereits sehr gut erforscht. Die Rolle der B-Zellen hingegen ist noch nicht abschließend geklärt und soll besser untersucht werden (Clatworthy 2014; Worthington et al. 2003; Lee et al. 2002). Es gibt immer mehr Hinweise, dass B-Lymphozyten in der akuten und chronischen Abstoßung eine Rolle spielen.

Der Spender-spezifische IFN- γ release ELISpot ermöglicht es bereits Spender-spezifische T-Zell Antworten zu messen (Nickel et al. 2004). Für die B-Zellen gibt es bisher noch kein äquivalentes Modell. Heidt et al. entwickelte einen Assay, welches HLA-spezifische B-Zellen messen kann (Heidt et al. 2012). Allerdings besteht die Alloimmunität nicht ausschließlich gegen ein einziges HLA-Molekül, sondern umfasst viele HLA und nicht-HLA-Antigene. Daher zeigt dieser Assay nur einen Teil der gesamten Spender-spezifischen Reaktion. Eine Studie beweist außerdem, dass zur Erfassung des gesamten Donor-spezifischen B-Zell Repertoires die alleinige Detektion von Spender-spezifischen Antikörpern nicht ausreicht. Grund hierfür ist eine bestimmte Kreuzreaktivität von Memory-B-Zellen mit Donorantigenen: während Donor-spezifischen Antikörper nur ein bestimmtes Donorantigen erkennen, zeigen Memory-B-Zellen eine Kreuzreaktivität mit mehreren Donorantigenen. Durch die alleinige Detektion von Donor-spezifischen Antikörpern kann aufgrund der möglichen Kreuzreaktivität der Memory B-Zellen also nicht die Gesamtheit aller Donor-spezifischen B-Zellen erfasst werden (Purtha et al. 2011).

Mittels Luminex können zum Immunomonitoring nach Transplantation DSA im Empfängerblut detektiert werden, allerdings können dabei keine Spender-spezifischen B-Lymphozyten identifiziert werden. Um eine individuelle Immunsuppression ermöglichen zu können, ist es wichtig sowohl zelluläre als auch humorale Parameter der Spender-spezifischen Reaktion zu kennen. Mit einem zellulären B-Zell-Assay könnten Donor-spezifische B-Zellen bereits vor der Produktion von Donor-spezifischen Antikörpern erfasst werden und somit womöglich eine Antikörper-vermittelte Rejektion frühzeitig behandelt oder verhindert werden.

Hypothese

Bisher gibt es keinen geeigneten Assay, der es ermöglicht Spender-spezifische Memory-B-Zellen im Empfängerblut zu detektieren und quantifizieren. Wir nehmen an, dass analog zum Spender-spezifischen IFN- γ release ELISpot durch die Stimulation mit bestrahlten Spender-PBMCs nur Spender-spezifische Memory-B-Zellen des Empfängers aktiviert werden. Durch die Aktivierung differenzieren sich die Spender-spezifischen Memory-B-Zellen des Empfängers zu PZ und schütten IgGs aus. Die PZ können im IgG-ELISpot mittels ihrer IgG-Produktion sichtbar gemacht werden. Jeder Spot steht für eine Spender-spezifische Memory-B-Zelle, welche durch bestrahlte Spenderzellen aktiviert wurde.

Für die Entwicklung eines Spender-spezifischen Assays musste zunächst die Testmethodik etabliert werden. Um die immunsupprimierten Patienten vor unnötigen Blutentnahmen zu schützen und vorerst die Testmethode zu etablieren, entwickelten wir als „proof-of-principle“ den HBsAg-spezifischen total-IgG ELISpot. Zur Etablierung des Assays wird mit einem IgG ELISpot die Impfantwort gegen den Impfstoff Hepatitis B surface-Antigen (HBsAg) von gegen Hepatitis-B ungeimpften und geimpften Probanden gemessen. PBMCs der Probanden werden isoliert und mit HBsAg stimuliert. Wir nehmen an, dass durch die HBsAg-spezifische Stimulation nur HBsAg-spezifische Memory-B-Zellen aktiviert und durch ihre IgG-Ausschüttung messbar gemacht werden. Somit ist durch eine spezifische Stimulation eine spezifische Aktivierung von Antigen-spezifischen Memory-B-Zellen möglich. Wir glauben, dass der HBsAg-spezifische IgG-ELISpot anhand der detektierten Spots zwischen Geimpften und Ungeimpften unterscheiden kann. Nach erfolgreicher Etablierung des Assays wenden wir diesen im Transplantationssetting an. Wir vermuten, dass im Spender-spezifischen IgG ELISpot nur Spender-spezifische Memory-B-Zellen aktiviert und detektiert werden können.

5 Zielsetzung

Der menschliche Körper ist nach einer Transplantation einer Mannigfaltigkeit an Alloantigenen ausgesetzt, gegen welche er Alloantigen-spezifische B-Zell-Klone bildet. Es genügt daher nicht einen Assay zu entwickeln, welcher einen B-Zell-Klon detektiert, welcher für ein einzelnes Antigen spezifisch ist. Ziel dieser Doktorarbeit ist vielmehr, einen Spender-spezifischen IgG-ELISpot zu entwickeln. Dabei sollen alle Memory-B-Zellen erfasst und quantifiziert werden, welche gegen das Transplantat gerichtet sind.

Dieser Assay soll perspektivisch dazu dienen, die Rolle der Memory-B-Lymphozyten nach Organtransplantation besser zu verstehen.

Durch parallele Verwendung des bereits etablierten, Spender-spezifischen T-Zell ELISpot und dem Spender-spezifischen B-Zell-ELISpot wäre so ein umfassendes, longitudinales, immunologisches Monitoring von Patienten nach Transplantation möglich. Durch die Identifikation von prognostisch relevanten Konstellationen und Dynamiken könnten Ansatzpunkte für eine individualisierte Therapie gefunden werden.

Die Ziele dieser Doktorarbeit sind:

- I. Testetablierung eines HBsAg-spezifischen IgG-ELISpots
 - a. Testvalidierung an gegen Hepatitis-B -geimpften und -ungeimpften Probanden
- II. Testetablierung eines Spender-spezifischen IgG-ELISpots
- III. Testvalidierung des Spender-spezifischen IgG-ELISpots
 - a. Korrelation der Ergebnisse mit der Entwicklung von Donor-spezifischen HLA-Antikörpern
 - b. Korrelation der Ergebnisse mit dem klinischen Verlauf

6 Materialien

Aqua dest	BRAUN
PBS Dulbecco w/o Ca ²⁺ w/o Mg ²⁺ low endotoxin	Merck Millipore
Ficoll- Paque TM PLUS	GE Healthcare
Ibidi Freezing Medium Classic	Ibidi
Trypan Blue Stain 0,4%	gibco by Life Technologies
Ethanol, absolute	Fisher Chemical
Propidium Iodide Staining Solution	BD Pharmingen TM
Filter Smart Strainers (30µm)	MACS [®]
CELLSTAR [®] Tubes, 50ml, PP, graduated, conical bottom, blue screw cap, sterile	greiner bio- one
Tube 15ml 120x 17mm, PP	Sarstedt
CryoTube TM Vials	Thermo scientific
Filter Tips steril 0,1- 10µl	Brand
Filter Tips steril 2-200µl, 2- 20µl, 100- 1000µl	Biosphere, Sarstedt
Eppendorf Tubes Safe Lock 1,5ml	Eppendorf
C- Chip Neubauer Improved / DHC- N01	NanoEnTek
Parafilm „M“	Parafilm
Einmal Skalpell (Surgical Disposable Scalpel)	BRAUN
Einmal Pinzette chirurgisch nach Semken, fein, steril	Fuhrmann
Petrischale 92x 16mm ohne Nock steril	Sarstedt
Freezing Container	NALGENE
Serologische Pipette 5ml, 10ml, 25ml	Costa

Materialien

Pipetman 50-200µl, 2-20µl, 0,1-10µl,	Gilson
Pipette Eppendorf reference 100-1000µl	Eppendorf
Accu- jet por	Brandt
8- Kanal Pipette 30-300µl	Sartorius
Engerix- B Erwachsene	GalaxoSmithKline GmbH& Co. KG
24well Platte für Suspensionskultur transparent	Greiner bio- one
6well Platte, unbehandelt, transparent	CytoOne®
Multiscreen Filter Plates 96well Polyvenylmembran Cat. MAIPN 4550	Millipore
FACS- Tubes 5ml Polystyrene Round- Bottom Tubes	FALCON
Spritzflasche 250ml	behr

Zellkulturmedium:

RPMI 1640 Medium w 2.0g/l NaHCO ₃ w stable glutamine low endotoxin	500ml	Merck Millipore
+ HEPES- Buffer (1M)		Merck Millipore
+ FBS, EU professional filtrated bovine serum	50ml	PAN Biotech
+ Pen Strep	5ml	gibco
+ L- Glutamine solution	5ml	Sigma

Total- IgG- ELISpot- Kit:

TMB Substrate	Mabtech
Human IgG ELISpot BASIC Product Code 3850- 2H	Mabtech

Materialien

Monoclonal antibodies MT91/145	Mabtech
Concentration 0,5mg/ml	

Biotinylated monoclonal antibodies MT78/145	Mabtech
Concentration 0,5mg/ml	

Streptavidin- Horseradish Peroxidase	Mabtech
Polyclonal activator: R848	Mabtech
Concentration 1mg/ml	

Lyophilised recombinant human IL- 2 (1µg)	Mabtech
---	---------

FACS- Puffer:

NaN ₃ (Natriumazid) 10% in PBS	2ml	Morphisto
BSA (Bovine Serum Albumin)	5g	Biomol
DPBS	1000ml	Pan Biotech
w/o Ca and Mg		

Geräte:

Zentrifuge Eppendorf 5804R	Eppendorf
ELISpot- Reader	Cellular Technology Ltd.
C.T.L. S6ALPHA- 00-1000	
ELISpot- Reader Software	Cellular Technology Ltd.
ImmunoSpot. SC Suite Immuno Capture 6.5.5.	
Sicherheitswerkbank HERA SAFE KS	Thermo Scientific
Brutschrank HERA cell vios 160i	Thermo Scientific
Lichtmikroskop	Olympus, Japan
Vortexer	Scientific Industries
Vortex Genie 2	
Stickstofftank	Air Liquide
Arpege 170	

Materialien

FACS- Gerät
FACS- Calibur

BD Biosciences

FACS- Software
CellQuest Pro

BD Biosciences

Röntgenbestrahlungsgerät
RS225

X- Strahl

UV- Bestrahlungsgerät
UV- Crosslinker 1800

Stratagene

7 Methoden

7.1 Zellpräparation

7.1.1 Präparation mononukleärer Zellen aus CPDA-Blut per Ficoll-Gradientenzentrifugation

Ficoll ermöglicht durch eine Dichte-Gradienten-Zentrifugation die Auftrennung des Blutes. Die Dichte menschlicher Erythrozyten und Granulozyten ist höher, die Dichte menschlicher mononukleärer Zellen ist niedriger als die Dichte von Ficoll. Zur Zellpräparation der PBMCs eines Probanden wurden drei Röhrchen CPDA à 8ml Blut entnommen. Das Blut wurde dann in einem Verhältnis von 1:2 mit RPMI-Medium mit den Zusätzen von 1% L-Gutamin, 1% Pen Strep, 1% HEPES Buffer und 10% FCS in einem 50ml Tube gemischt. Um mononukleäre Zellen zu isolieren, wurde das Blut-Medium-Gemisch im Verhältnis von 1:2 vorsichtig auf Ficoll- Paque (1.077 ± 0.001 g/ml) geschichtet. Das Tube wurde anschließend bei 1650xg für 20min ohne Bremse bei Raumtemperatur zentrifugiert. Durch die Zentrifugation bildeten sich vier Schichten. Zuunterst legten sich die Erythrozyten und Granulozyten als Zellpellet ab. Dann folgte eine Schicht Ficoll, auf dieser legten sich die mononukleären Zellen als ein dünner, weißlich-trüber Ring ab. Über dieser dritten Schicht gab es noch eine weitere mit Plasma und Medium. Nach dieser Auftrennung war es möglich die mononukleären Zellen mit einer Transferpipette abzusaugen und in ein neues 50ml Tube zu überführen. Das Tube mit den Zellen wurde mit frischem Medium auf 50ml aufgefüllt und bei 413xg für 10min bei Raumtemperatur mit Bremse zentrifugiert, um eventuelle Reste von Ficoll zu entfernen. Der Überstand wurde daraufhin abgenommen und verworfen und der Waschvorgang wurde noch einmal wiederholt. Das Zellpellet wurde am Ende in 1ml Medium resuspendiert.

Alle Schritte wurden unter der Sicherheitswerkbank unter semi-sterilen Bedingungen ausgeführt. Alle benötigten Reagenzien und Materialien waren steril, um eine Kontamination zu vermeiden.

7.1.2 Präparation mononukleärer Zellen aus Spendermilz-Stücken

Die Präparation der Spender-PBMCs aus Milzstücken erfolgte zur Durchführung der klinisch indizierten Kreuzprobe vor Organtransplantation. Zur Stimulation der Empfängerzellen wurden übrig gebliebene, nicht benötigte PBMCs verwendet. Das Milzstück des Organspenders wurde mit einer anatomischen Pinzette aus einem Behälter mit Kulturmedium entnommen und in eine Petrischale gelegt, welche mit 20ml RPMI- Medium (10% FCS, 1% HEPES- Buffer, 1% Pen Strep, 1% L-Glut) gefüllt war. Die Milzkapsel wurde mit einem Skalpell leicht rasterförmig eingeritzt, um die PBMCs unter der Kapsel herauszulösen. Mit der Pinzette wurde das Milzstück leicht im Medium geschwenkt, bis die klare Flüssigkeit trüb

wurde. Das Milzstück wurde wieder in den vorgesehenen Behälter gelegt und entsorgt. Die trübe Zellsuspension musste anschließend durch einen Filter (Porengröße 30µm) laufen, der auf einem 50ml Tube positioniert wurde. Die Flüssigkeit wurde dabei mit einer Stripette aufgesogen und über dem Filter abgegeben. Die Petrischale wurde auch noch mit 20ml frischem Medium gespült, um auch eventuell zurückgebliebene PBMCs in das Tube zu überführen. Auch diese Zellsuspension wurde mit einer Stripette aufgesogen und über dem Filter abgegeben. Im Tube erhielt man so eine Zellsuspension aus Milz-PBMCs ohne Milzgewebeteile. Die Zellsuspension konnte nun im Verhältnis 1:2 auf Ficoll-Paque geschichtet werden. Die weiteren Schritte erfolgten identisch zur Präparation mononukleärer Zellen aus CPDA-Blut.

7.2 Zellzahlbestimmung

Nachdem PBMCs isoliert und gewaschen wurden, wurden sie am Ende in 1ml RPMI Medium resuspendiert. 10µl dieser Zellsuspension wurden entnommen und in ein kleines Eppendorff-Gefäß überführt. Diese 10µl Zellsuspension wurde dann mit 10µl Trypanblau vermischt, damit die Zellen unter einem Durchlichtmikroskop gezählt werden konnten. Trypanblau ist ein Perforationsfarbstoff. Die Farbe kann in beschädigte Zellen eindringen und färbt sie blau. Nicht perforierte Zellen hingegen lassen den Farbstoff nicht eindringen und erscheinen unter dem Mikroskop transparent. 10µl der Mischung aus Zellsuspension und Trypanblau (Verdünnungsfaktor 2) wurden in eine Neubauer Zählkammer gefüllt. Die Neubauer Zählkammer besteht aus neun Großquadraten und vier Eckquadraten. Diese Eckquadrate sind noch einmal in 4x4 kleinere Quadrate unterteilt. Ein solches Eckquadrat besitzt eine Kantenlänge von 1mm und eine Tiefe von 0,1mm. Das Volumen in einem solchen Quadrat ist also 0,1µl oder auch 10^{-4} ml. Um die Zellzahl/ml zu errechnen, wurden im linken oberen Eckquadrat und im rechten unteren Eckquadrat diagonal 4 Kleinquadrate ausgezählt. Dabei wurden nur weiße, also intakte Zellen gezählt. Daraus wurde der Mittelwert gebildet, mit 16 multipliziert, um die Zellzahl eines gesamten Eckquadrates zu erhalten, mit dem o.g. Verdünnungsfaktor und schließlich den 10^{-4} ml multipliziert.

Zur Veranschaulichung:

$$\text{Zellzahl/ ml} = \frac{\text{Zellen in 8 Kleinquadraten}}{8} \times 16 \times \text{Verdünnungsfaktor} \times 10^4 \text{ (Volumenfaktor)}$$

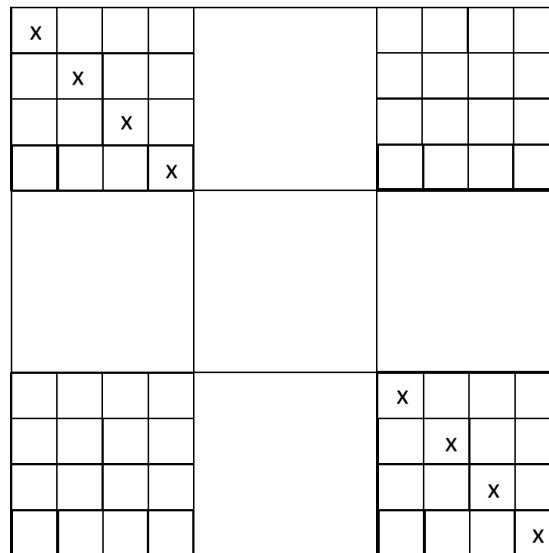


Abbildung 1: Neubauer Zählkammer.
Die mit „x“ gekennzeichneten Quadrate wurden zur Zellzahlbestimmung ausgezählt.

7.3 Zellen einfrieren

Um PBMCs länger aufzubewahren, ist es nötig sie in flüssigem Stickstoff, bei etwa -172°C ohne starke Temperaturschwankungen zu lagern (Germann et al. 2013, 2013). Diese Art der Lagerung nennt sich Kryokonservierung. Hierzu müssen die PBMCs mit verschiedenen Reagenzien vermischt werden, damit sie während des Einfrierens nicht zerstört werden und während des Wiederauftauens nicht absterben oder verklumpen. Würde man die Zellen mit reinem Medium einfrieren, käme es zu Kristallbildungen sowohl im Medium als auch in den Zellen. Diese Kristalle würden die Zellmembran perforieren und die Zelle würde absterben. Dimethylsulfoxid (DMSO) verhindert Zellschäden beim Einfrieren (LOVELOCK und BISHOP 1959). Allerdings wirkt DMSO bei Zimmertemperatur auch stark zytotoxisch (Robab Nazarpour et al. 2012). Deshalb ist es wichtig die Zellsuspension nach Zugabe des Gefrierschutzmittels abzukühlen. Das Einfrieren erfolgt in zwei Etappen: zuerst werden die Zellen in den Gefrierbehälter gegeben und bei -80°C gelagert, später dann im Stickstofftank bei -172°C. Die Zellsuspension wurde hierfür in spezielle Kryo-Röhrchen abgefüllt, welche kältebeständig sind.

Zum Einfrieren von PBMCs wurde das Einfriermedium Ibidi Freezing Medium verwendet. In Kryovials, welche ein Volumen von 2ml umfassten, wurde 1ml des Einfriermediums vorgelegt. Auf die 1ml Einfriermedium wurden 1ml Zellsuspension gegeben. Dabei durften pro Kryovial maximal nur 10×10^6 isolierte PBMCs dazu gegeben werden. Die Vials wurden dann in einen Gefrierbehälter gegeben, welcher mit Ethanol absolute gefüllt war. Dieser Behälter ermöglichte es, Zellen mit einer

Kühlrate von 1°C/min schonend hinunterzukühlen. Der Gefrierbehälter wurde dann mit den Zellen für mindestens 24h bei -80°C gelagert. Anschließend wurden die PBMCs in den Stickstofftank umgelagert.

7.4 Zellen auftauen

Das Auftauen fand einen Tag vor dem geplanten Versuchsbeginn statt, damit die Zellen Zeit hatten, sich in Kulturmedium im Inkubator bei 37°C unter 5%CO₂ Atmosphäre zu regenerieren. Beim Auftauen war es wichtig, dass das Einfriermedium möglichst schnell verdünnt wurde. Die Zellen durften nämlich nicht bei Raumtemperatur zu lange in Kontakt mit dem DMSO kommen. Das Kryovial wurde also im gefrorenen Zustand aufgeschraubt und die Oberfläche des gefrorenen Blocks wurde ständig mit warmen Zellkulturmedium über einem Tube, welcher ebenfalls halb mit Medium gefüllt war, gespült. Die weggespülten Zellen wurden im Falcon aufgefangen und zugleich mit dem vorgelegten Medium verdünnt. Das Spülen mit einer 1ml Pipette wurde so lange wiederholt, bis sich der Block gefrorener Zellen aus dem Kryoröhrchen löste und ins Falcon überführt werden konnte. Die Zellsuspension wurde dann bei 413xg für 10 Minuten bei Raumtemperatur mit Bremse zentrifugiert, um die Zellen vom DMSO zu trennen. Der Überstand wurde abgenommen und verworfen. Das Zellpellet wurde in 50ml neuem Medium resuspendiert und bis zum nächsten Tag in den Inkubator gestellt. Am nächsten Tag wurden die Zellen erneut bei 350rpm für 10 Minuten zentrifugiert, in 1ml RPMI- Medium resuspendiert und die Zellen konnten für den Versuch verwendet werden.

7.5 Der ELISpot

7.5.1 Antigen- bzw. Spender-spezifischer total-IgG ELISpot

Mit unserem Assay sollten die HBsAg- bzw. Spender-spezifischen B-Zellen mittels IgG-ELISpot detektiert werden. Im Antigen- bzw. Spender-spezifischen total-IgG ELISpot werden PBMCs mit HBsAg bzw. inaktivierten Spender-PBMCs stimuliert und sezernieren daraufhin auf der ELISpot-Platte IgGs. Die ELISpot Platte ist mit anti-human-IgG-Antikörpern beschichtet. Die von den aktivierten HBsAg- bzw. Spender-spezifischen B-Lymphozyten sezernierten IgG-Antikörper wurden von den auf der Platte gebundenen anti-human-IgG Antikörpern fixiert. Die Zellen werden von der Platte gewaschen und ein sekundärer biotinylierter Antikörper, welcher gegen humanes IgG gerichtet ist, wird auf die Platte pipettiert. Dieser Antikörper bleibt nur auf jenen Stellen der Platte gebunden, an welchen IgGs durch eine B-Zelle sezerniert wurde. Sobald dieser gebunden hat, kommt das Enzym Streptavidin-HRP auf

die Platte. Das Streptavidin bindet mit hoher Affinität an das Biotin des sekundären Antikörpers und bleibt somit auch auf der Platte gebunden. Das HRP, welches an das Streptavidin gekoppelt ist, interagiert schließlich mit dem Substrat TMB. Dies zeigt sich durch einen Farbumschlag. An der Stelle, an der eine aktivierte B-Zelle IgG gebildet hat, entsteht ein farbiger Punkt. Die Anzahl der Punkte entspricht der Anzahl HBsAg- bzw. Spender-spezifischer B-Zellen.

Um den Spender-spezifischen IgG-ELISpot zu etablieren, erprobten wir das Modell an einem HBsAg-spezifischen IgG-ELISpot. Hier sollte analysiert werden, wie B-Zellen spezifisch stimuliert und aktiviert werden können, welche Zellzahlen nötig sind und ob es eine eventuelle Co-Stimulation benötigt. In diesem Ansatz wurden PBMCs von freiwilligen Probanden isoliert, welche im Vorfeld aus klinischer bzw. präventiver Indikation mit dem Impfstoff Engerix-B, welcher rekombinantes HBsAg enthält, immunisiert wurden. In der nachträglich durchgeführten anti-HBs-Antikörper-Messung (Impfkontrolle) bei den Probanden konnten bei allen bis auf zwei Probanden (Proband 11 und 14) ein ausreichender Impftiter nachgewiesen werden. Durch die Impfung wurden HBsAg-spezifische Memory-B-Zellen gebildet. Durch die in vitro Stimulation der PBMCs mit HBsAg sollten sich nur HBsAg-spezifische Memory-B-Zellen in vitro zu PZ differenzieren und IgG produzieren. Die PZ konnten dann wie oben beschrieben im IgG-ELISpot sichtbar gemacht werden.

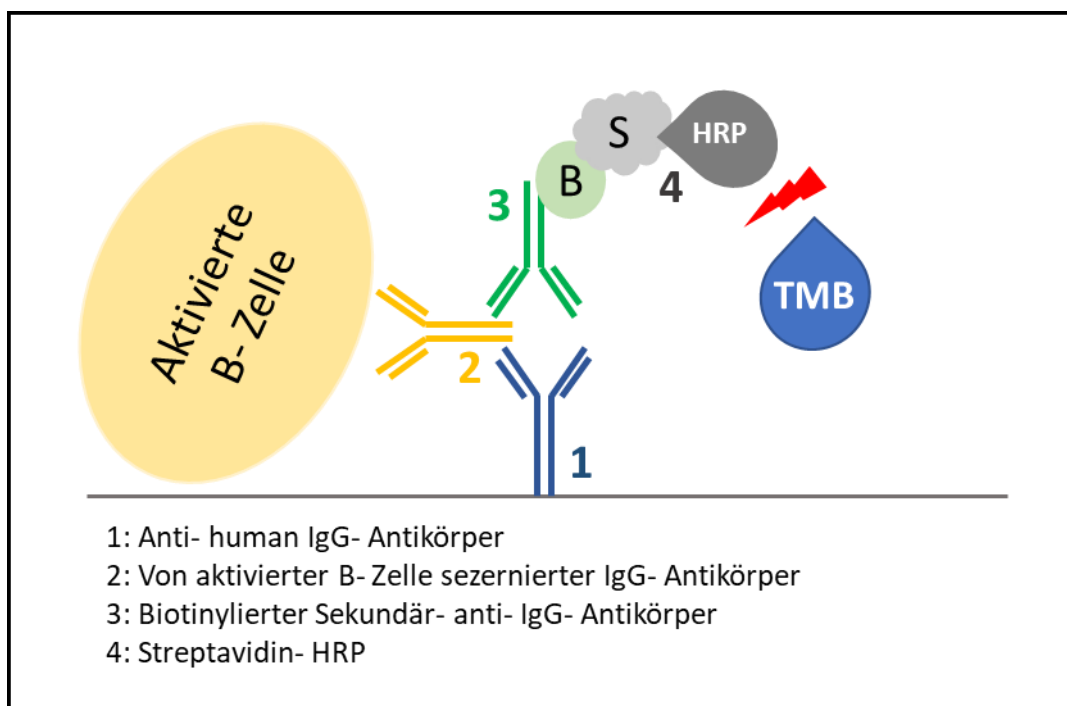


Abbildung 2: Schematischer Aufbau des total-IgG-ELISpots.

Die von der aktivierten B-Zelle sezernierten IgG-Antikörper (2) werden von dem an der ELISpot-Platte gebundenen anti-human IgG-Antikörper (1) gebunden. Ein zweiter, biotinylierter anti-IgG Antikörper (3) wird hinzugegeben, welcher wieder an den sezernierten Antikörper bindet. Das Biotin bindet nach Zugabe von Streptavidin-HRP (4) an selbes. Das HRP interagiert zuletzt mit dem TMB, was durch einen Farbumschlag sichtbar wird. Der Farbumschlag wird als Spot auf der ELISpot-Platte sichtbar.

7.5.2 Der HBsAg-spezifische total-IgG ELISpot

Vorbereitung: Den Probanden wurden drei CPDA Röhrchen à 8ml mit Blut entnommen. Daraufhin wurden PBMCs isoliert und gezählt. Die Zellen mussten vor dem Pipettieren auf die ELISpot-Platte stimuliert werden. Dabei wurden die PBMCs mit verschiedenen Stimuli für drei Tage im Brutschrank bei 37°C und 5%CO₂ Atmosphäre inkubiert (Jahnmatz et al. 2013). In dieser Zeit sollten sich die Memory-B-Zellen in IgG-sezernierende PZ differenzieren.

Beim Antigen spezifischen ELISpot wurden pro Well 500.000 PBMCs eingesetzt. Es gab von jedem Probanden einen Ansatz mit einer Negativ- und einer Positivkontrolle zusätzlich zum Antigen-spezifischen Ansatz. Die Negativkontrolle entsprach einer Inkubation der PBMCs mit reinem Kulturmedium. In der Positivkontrolle wurden die Zellen mit einem polyklonalem B-Zell Stimulator aktiviert. Diese globale Antwort wird z.B. mit einer Mischung aus IL-2 und R848 hervorgerufen. Diese Kombination aktivierte unspezifisch alle Memory-B-Zellen, sodass sie sich zu PZ differenzierten (Pinna et al. 2009). IL-2 wurde in einer Konzentration von 10ng/ml verwendet, der TLR-7 Ligand R848 in einer Konzentration von 1µg/ml.

Im HBsAg-spezifischen total-IgG ELISpot wurden die Zellen mit HBsAg stimuliert. Dessen Konzentration im Well betrug 2µg/ml, die Konzentration der Stocklösung lag bei 20µg/ml. HBsAg wurde bei 4-8°C im Kühlschrank aufbewahrt. R848 und IL-2 wurden beide bei -20°C gelagert. Die Stocklösung von R848 hatte eine Konzentration von 1mg/ml und wurde mit Hilfe von Kulturmedium auf eine Konzentration von 1µg/ml gebracht. IL-2 wurde als Lyophilisat geliefert und wurde in 1ml PBS gelöst. Daraufhin hatte es eine Konzentration von 1µg/ml. Je 100µl der Interleukinsuspension wurden in Eppendorff Gefäßen abgefüllt und bei -20°C weggefroren, da IL-2 ist nicht sehr stabil ist und vermehrtes Auftauen und Einfrieren vermieden werden sollte.

Für die Vorinkubation wurden die Zellen nach Belegschema auf eine sterile 24 Well Platte pipettiert. In diesen Platten konnte den Zellen ausreichend Medium zugefügt werden, sodass sie drei Tage ohne weitere Arbeitsschritte im Inkubator bleiben konnten. 500.000 PBMCs wurden in der Negativkontrolle in 1ml Kulturmedium resuspendiert. In der Positivkontrolle wurden die Zellen mit IL-2 und R848 in 1ml Medium inkubiert, im Ansatz mit dem HBsAg genauso. In jedem Well durfte sich insgesamt nur 1ml Flüssigkeit befinden. Vor der Inkubation wurde das Zellgemisch durch Auf- und Abpipettieren gut vermischt. Die positive und negative Kontrolle wurde jeweils in dreifacher Ausführung angesetzt, um später einen Mittelwert bilden zu können. Der Ansatz mit dem HBsAg wurde mindestens in dreifacher, manchmal auch in sechsfacher Ausführung angesetzt. Waren alle Kavitäten gefüllt, wurde der Deckel auf die 24 Well Platte gelegt und die Platte wurde für drei Tage in den Inkubator gestellt. Alle Schritte wurden bis zur Lagerung der Platte im Inkubator unter halbsterilen Bedingungen durchgeführt, um eine Kontamination zu vermeiden.

1. Tag: Der erste Tag, an dem mit der ELISpot-Platte gearbeitet wurde, entsprach dem letzten Inkubationstag. Die Zellen standen schon seit zwei Tagen im Brutschrank. Am ersten Tag des ELISpot-Assays wurde die Membran der ELISpot-Platte aktiviert und beschichtet. Die Membran musste für Proteine zugänglich werden. Dazu wurden in jede Kavität 35µl 35%iger Alkohol pipettiert. Da der Alkohol maximal eine Minute einwirken sollte, wurde mit einer Acht-Kanalpipette gearbeitet. Sobald alle Membranen benetzt waren, wurde die Platte mit Aqua dest 5-mal gespült. Für die Spülvorgänge wurde eine Spritzflasche verwendet. Der Spülstrahl wurde mit einer gleichmäßigen Bewegung von einer Reihe in die andere geführt, sodass alle Kavitäten mit Aqua dest gefüllt waren. Zwischen den 5 Spülzyklen wurde das Wasser ausgeschlagen. Am Ende wurde die ELISpot-Platte auf Papiertüchern trocken geklopft. Nun mussten 100µl vom primären Antikörper in jedes Well pipettiert werden. Beim primären Antikörper handelte es sich um einen goat anti-human-IgG Antikörper (mAb MT91/145). Dieser wurde steril im Kühlschrank bei 4°- 8°C aufbewahrt. Die Stocklösung hatte eine Konzentration von 0,5mg/ml. Mit PBS wurde der Antikörper unter der Flow auf eine Konzentration von 15µg/ml gebracht. Die hergestellte Antikörper-Lösung musste vor dem Pipettieren auf die Platte gut gemischt werden. Sobald in allen Kavitäten 100µl der Antikörper-Lösung vorhanden waren, wurde die Platte über Nacht mit Deckel in den Kühlschrank gestellt.

2.Tag: Am zweiten Tag wurden die in den 24 Well Platten vorstimulierten Zellen auf die ELISpot Platte übertragen. Hierfür wurden sie von der Vorinkubationsplatte in 15ml Tubes überführt, um die Zellen zu waschen und die gegebenenfalls bereits produzierten IgG-Antikörper von den Zellen zu trennen und um die Zellen in einem kleineren Volumen, nämlich 200µl, zu resuspendieren. Die Tubes wurden nummeriert und dem jeweiligen Well zugeordnet. Die Vorinkubationsplatte wurde aus dem Brutschrank geholt und unter die Flow gestellt. Mit einer 1000µl Pipette wurde der Inhalt eines Wells ins Tube überführt. Die leere Kavität wurde dann mit 1ml frischem Zellkulturmedium ausgespült und in das Tube überführt. Die 15ml Röhrchen waren nun mit jeweils 2ml Zellsuspension gefüllt und konnten für 10min bei 413xg zentrifugiert werden. Nach der Zentrifugation wurden die Tubes unter die Sicherheitsbank gestellt und der Überstand wurde abgenommen. Das Zellpellet wurde in 200µl warmem Zellkulturmedium resuspendiert. Dies 200µl Zellsuspension wurden nun auf die ELISpot-Platte überführt.

Die ELISpot-Platte wurde am zweiten Tag aus dem Kühlschrank genommen und der überschüssige primäre Antikörper wurde ausgeschlagen. Die Kavitäten wurden fünf Mal mit PBS gespült und auf Papiertüchern trocken geklopft. Um unspezifische Proteinbindungsstellen zu blocken, wurde in jede Kavität 200µl Zellkulturmedium pipettiert und die Platte bei Raumtemperatur (RT) für eine Stunde inkubiert. Nach der Inkubation wurde das Medium ausgeschlagen und die 200µl Zellsuspensionen aus den Tubes gemäß Vorlage auf die ELISpot-Platte pipettiert. Sobald alle Zellen überführt waren, wurde

die ELISpot Platte über Nacht in den Brutschrank gestellt. Während dieser Inkubation sollten die in der Vorinkubation entstandenen Plasmazellen IgG-Antikörper ausschütten, die dann vom primären Antikörper auf der Membran der ELISpot- Platte gebunden werden konnten.

3. Tag: Die ELISpot-Platte wurde aus dem Brutschrank entnommen und die darauf inkubierten Zellen ausgeschlagen. Daraufhin wurde die Platte fünf Mal mit PBS gespült und auf Papiertüchern trocken geklopft. Daraufhin wurde in jede Kavität 100µl der sekundären Antikörper-Lösung pipettiert und die Platte wurde 2 Stunden bei RT inkubiert. Der biotinylierte sekundäre Antikörper mAbs MT 78/145 wurde von seiner Stockkonzentration von 0,5mg/ml auf eine Endkonzentration von 1µg/ml mit PBS (0,5% FCS) verdünnt. Nach zwei Stunden Inkubationszeit wurde der Antikörper ausgeschlagen und die Platte wieder fünf Mal mit PBS gespült und am Ende mit Papiertüchern trocken geklopft. Anschließend wurden 100µl Streptavidin-HRP Lösung auf die Platte pipettiert. Die Streptavidin-HRP Lösung wurde im Kühlschrank bei 4°- 8°C aufbewahrt. Vor dem Überführen auf die ELISpot Platte wurde es mit PBS (0,5% FCS) in einem Verhältnis von 1:1000 verdünnt. Die ELISpot Platte wurde mit der Streptavidin-Lösung für eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde die Flüssigkeit auf der Platte ausgeschlagen und die Platte mit PBS fünf Mal gespült und trocken geklopft.

Als letztes musste noch der Farbstoff auf die Platte pipettiert werden, damit er vom Streptavidin gespalten und somit sichtbar gemacht werden konnte. Als Farbstoff wurde TMB verwendet. Dieses ist lichtsensibel und wurde in einer dunklen Flasche im Kühlschrank gelagert. Bevor es auf die Platte pipettiert werden konnte, musste die Flüssigkeit auf RT gebracht werden. 50µl TMB wurden mit Hilfe einer Multikanal-Pipette zügig in jede Vertiefung der ELISpot- Platte gegeben. Dies geschah im Dunkeln, da der Farbstoff lichtsensibel ist. Innerhalb von 10 Sekunden entwickelten sich kleine blaue Punkte, so genannte Spots. Sobald die ersten Spots erkennbar waren, wurde die Platte umgehend mit Aqua dest ausgiebig gespült, um die Farbreaktion zu stoppen und somit „overdeveloped Spots“ zu vermeiden. Eine Reaktion gilt als „overdeveloped“, wenn einzelne Spots nicht mehr voneinander unterschieden werden können. Bei diesem Spülen wurde auch der Plastikboden der ELISpot-Platte entfernt und die Unterseite der Membranen ebenfalls mit Aqua dest gespült. Anschließend wurde die ELISpot- Platte zum Trocknen im Dunkeln gelagert.

4. Tag: Sobald die Platte getrocknet war, konnte sie mit Hilfe des ELISpot-Readers von C.T.L. eingescannt und ausgewertet werden.

7.5.3 Der Spender-spezifische total-IgG ELISpot

Im Spender-spezifischen Ansatz erfolgte eine Stimulation der Empfänger-PBMCs mit inaktivierten Spender-PBMCs. Im Gegensatz zur positiv-Kontrolle, wo sich unspezifisch alle Memory-B-Zellen zu PZ verwandeln, sollten hier ausschließlich Spender-spezifische Memory-B-Zellen aktiviert werden.

Einziger Stimulus für die Empfängerzellen waren inaktivierte Spenderzellen.

Vorbereitung: Beim Spender-spezifischen total-IgG ELISpot wurden sowohl dem Empfänger als auch dem Spender bei Lebendspenden 3 CPDA Röhrchen Blut abgenommen. Bei Kadaverspendern wurden Spender-Milzstücke verwendet. PBMCs wurden isoliert und gezählt (siehe 7.1.1,7.1.2,7.2). Die Empfängerzellen wurden anschließend im Brutschrank mit isolierten und inaktivierten Spenderzellen oder der Positivkontrolle für drei Tage im Brutschrank inkubiert. Während dieser Vorinkubation im Brutschrank bei 37°C und 5%CO₂ Atmosphäre sollten sich Spender-spezifischen Memory-B-Zellen zu IgG-sezernierenden Plasmazellen differenzieren. Für die Vorinkubation wurden 24 Well Platten mit Deckel verwendet, wie auch im Antigen-spezifischen total-IgG-ELISpot. Es wurden vom Empfänger 500.000 PBMCs pro Well eingesetzt. In jedem Versuch gab es eine positiv und negativ Kontrolle, welche mit denselben Stimulantien in derselben Konzentration erfolgte, wie im Antigen-spezifischen total-IgG ELISpot. Zur Stimulation der Empfängerzellen wurden pro Well 500.000 inaktivierte Spenderzellen verwendet. Auf die 24 Well Platte wurden 500.000 Empfänger-PBMCs pipettiert, anschließend kamen 500.000 inaktivierte Spender-PBMCs dazu. In jedem Well sollte sich insgesamt 1ml Flüssigkeit, bestehend aus Zellsuspension und Medium, bzw. Zellsuspension, IL-2, R848 und Medium befinden. Die Flüssigkeit im Well wurde mit einer 1000µl Pipette durch Auf- und Abpipettieren vermengt. Die positiv und negativ Kontrolle wurde jeweils in dreifacher Ausführung angesetzt. Der Ansatz mit den inaktivierten Spenderzellen wurde mindestens in dreifacher, je nach verfügbarer Zellzahl auch in sechsfacher Ausführung pipettiert. Waren alle Kavitäten gefüllt, wurde der Deckel auf die 24 Well Platte gelegt und die Platte wurde für die nächsten drei Tage in den Inkubator gestellt. Alle Schritte wurden bis zur Lagerung der Platte im Inkubator unter halbsterilen Bedingungen durchgeführt, um eine Kontamination vor der Inkubation zu vermeiden.

1.- 4. Tag: Die Arbeitsschritte vom ersten bis zum vierten Tag waren beim Spender-spezifischen total-IgG ELISpot identisch mit den Arbeitsschritten des Antigen-spezifischen total-IgG ELISpots.

7.5.3.1 Bestrahlung von Spender PBMCs für den Spender-spezifischen total-IgG ELISpot

Um die Spenderzellen zu inaktivieren, wurden sie mit 30Gy bestrahlt. Hierzu wurde nach der Zellisolation und Zellzählung die benötigte Zellzahl in eine sterile 6 Well Platte überführt und etwas Zellkulturmedium hinzugegeben. Pro Well wurden etwa 1- 2 Millionen PBMCs in 2ml Medium pipettiert. Die 6 Well Platte wurde mit einem Parafilm luftdicht verschlossen und in das Bestrahlungsgerät gestellt. Die Bestrahlungsdosis betrug 30 Gy. Nach der Bestrahlung wurde die Zellsuspension in ein 50ml Tube überführt. Das Tube wurde mit Medium auf 30ml aufgefüllt und für 10min bei 413xg zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und die Zellen in 1ml Zellkulturmedium resuspendiert. Die Zellzahl pro Milliliter wurde berechnet. Nach dem Bestrahlen konnten die inaktivierten Spenderzellen mit den Empfängerzellen vermischt werden.

7.5.4 Auswertung des ELISpot-Assays

Die Auswertung der ELISpot-Platten erfolgte mittels einem ELISpot-Reader von C.T.L. mit der zugehörigen Software von C.T.L. ImmunoSpot. SC Suite Immuno Capture 6.5.5.. In der Software wurden unter „Smart Count“ durch den Benutzer die Einstellungen bezüglich Spotgröße und Spottrennbarkeit gewählt. Für die Einstellung zur Spotgröße musste ein minimaler und maximaler Wert (mm^2) angegeben werden, damit die Software die Spots auf der Membran der ELISpot-Platte erfassen konnte. Spots wurden in unseren Versuchen ab einem Minimum von $0,0024\text{mm}^2$ bis zu einem Maximum von $0,0408\text{mm}^2$ als Spots erfasst. Die Spottrennbarkeit lag bei 3. Im „Quality Control“ wurde überprüft, ob die von der Software gezählten Spots auch richtige Spots sind und es sich dabei nicht um Artefakte handelte. Ein Spot ist durch ein dunkles Zentrum, umgeben von einem helleren Saum gekennzeichnet. Dieser Saum wird durch Diffusion der sezernierten Immunglobuline hervorgerufen.

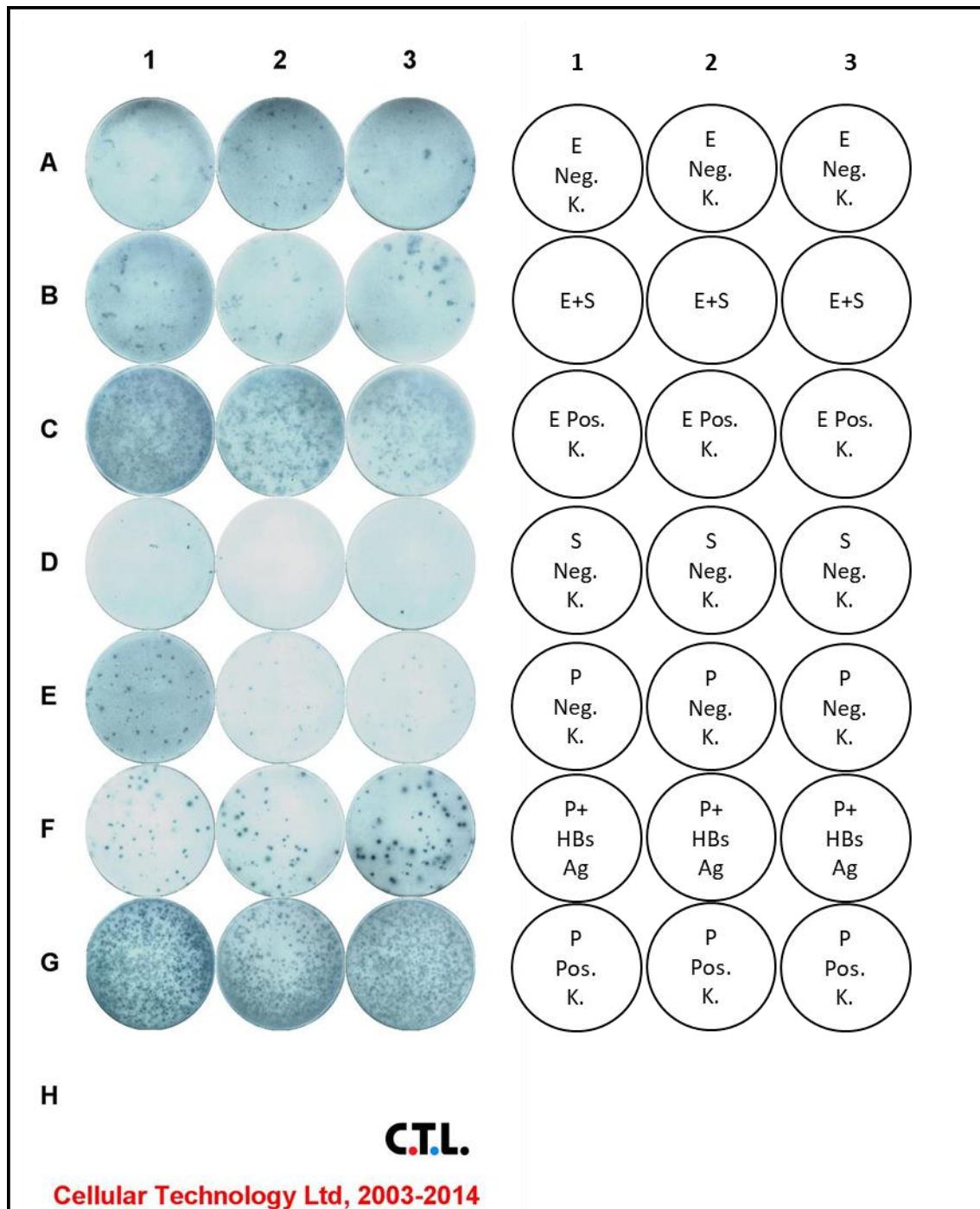


Abbildung 3: Gescannte total-IgG ELISpot-Platte mit zugehörigem Belegschemata.
E= Empfängerzellen; S= Spenderzellen; P= Probandenzellen; Abgebildet sind verschiedene Ansätze mit Negativ- und Positivkontrollen, sowie Ansätze mit HBsAg und Spender-spezifische Ansätze.

7.6 Der Bestrahlungsversuch

Beim Bestrahlungsversuch wurden PBMCs mit unterschiedlichen Bestrahlungsintensitäten behandelt. Ziel des Versuches war es, herauszufinden, welche Dosis für eine vollständige Inaktivierung der Spender-PBMCs bei erhaltener Zellintegrität zur Antigenpräsentation notwendig war. Dazu wurden die Zellen an mehreren Tagen (3- 5 Tage) nach der Bestrahlung mittels FACS analysiert und mittels PI-Färbung auf ihre Vitalität untersucht.

Zu Beginn des Versuches wurden verschiedene Bestrahlungsdosen festgelegt. PBMCs wurden von einem Probanden isoliert und gezählt und in eine sterile 6 Well Platte überführt. Zu den Zellen wurden je 2ml warmes Zellkulturmedium pipettiert. Für den Transport zum Bestrahlungsgerät wurde Parafilm um die Platte gewickelt, um eine Kontamination zu verhindern. Während des Transportes musste sichergestellt werden, dass die Platte möglichst gerade gelagert wurde, damit die Zellsuspension nicht aus der Vertiefung austreten konnte.

7.6.1 Die Gamma-Bestrahlung

Je 2 Millionen PBMCs des Probanden wurden mit einer unterschiedlich hohen Dosis an Gammastrahlung behandelt. Die Stufen waren 0, 10, 20, 30, 50, 70 und 80Gy. Die Platten wurden nacheinander ins Bestrahlungsgerät gestellt und die Dosis wurde eingestellt. Während der Bestrahlung wurden der Deckel und der Parafilm auf der Platte gelassen. Eine Kontamination während des Bestrahleins konnte dadurch verhindert werden. Nach der erfolgten Bestrahlung wurden die Zellen wieder in den Brutschrank gestellt.

7.7 FACS-Analyse der PBMCs nach PI- Färbung

Die PBMCs wurden am selben Tag direkt nach der Bestrahlung mittels Fluoreszenz aktivierter Zellsortierung (FACS) untersucht. Dazu wurde ein Teil der Zellsuspension (100.000 PBMCs) aus der 6 Well Platte in FACS-Tubes überführt und zweimal mit PBS gewaschen mit 500xg für 5min. Der Überstand wurde abgekippt und das Zellpellet wurde in 300µl FACS-Puffer resuspendiert. 1 Minute bevor die Zellen mittels FACS untersucht wurden, wurden 10 µl Propidium Iodid (PI) dazu pipettiert. Es färbt nur diejenigen Zellen an, welche keine intakte Membran mehr besitzen und somit beschädigt sind. Alle Zellen, welche als gefärbt gezählt wurden, galten als tot. Die PBMCs wurden nicht nur hinsichtlich ihrer Viabilität beurteilt, sondern auch der Anteil der Lymphozyten an den PBMCs wurde gemessen. Die Zellen wurden auch am ersten, zweiten und dritten Tag nach Bestrahlung mittels FACS

analysiert, um mehrere Messzeitpunkte zu erhalten. Im zweiten Bestrahlungsversuch wurden die PBMCs sogar über 5 Tage mittels FACS untersucht.

7.8 Statistische Auswertung

Die verwendeten Daten wurden statistisch mit dem Programm „IBM SPSS Statistics 25“ ausgewertet. Zur Testung einer Normalverteilung der Werte wurde der Shapiro-Wilk-Test angewandt. Lag eine Normalverteilung der Werte vor, wurde zum Vergleich zwischen zwei Gruppen der Students-t-Test angewandt. Lag keine Normalverteilung vor, so wurde zum Vergleich zwischen zwei Gruppen der Mann-Whitney-U Test angewandt.

7.9 Ethikantrag

Für das Studienvorhaben „Etablierung und Validierung eines Spender-spezifischen B-Zell ELISpot-Assays zum Immunmonitoring nach Nierentransplantation“ wurde der Ethikantrag mit der Nummer 425-16 durch die Ethikkommission bei der LMU München genehmigt. Die Studie war prospektiv und beobachtend angelegt. Insgesamt wurden 12 Patienten, welche zwischen 04/2016 Und 06/2017 im Klinikum Großhadern in München eine Nierentransplantation erhielten, eingeschlossen.

8 Ergebnisse

8.1 Testetablierung des HBsAg-spezifischen total-IgG ELISpot

Das erste Ziel war es, einen HBsAg-spezifischen total-IgG ELISpot zu etablieren. Dabei sollten durch Stimulation nur HBsAg-spezifische Memory-B-Zellen aktiviert werden. Diese sollten sich dann zu Plasmazellen differenzieren und durch die IgG-Sekretion mittels total-IgG ELISpot detektiert und quantifiziert werden. Im ersten Versuch wurde untersucht, wie eine ideale und möglichst spezifische Stimulation von HBsAg-spezifischen Memory-B-Zellen erreicht werden kann. Die PBMCs der Probanden wurden dazu mit verschiedenen Stimuli inkubiert und anschließend wurde ein total-IgG ELISpot durchgeführt.

Im ersten Versuch wurden PBMCs von fünf gesunden, gegen Hepatitis-B geimpften Probanden isoliert und mit verschiedenen Kombinationen aus HBsAg und IL-2 inkubiert. Zusätzlich gab es zu jedem Probanden eine positive Kontrolle, bei der die PBMCs mit IL-2 und R848 inkubiert wurden und eine negative Kontrolle, bei der die PBMCs in Zellkulturmedium inkubiert wurden. Jeder Ansatz wurde jeweils in dreifacher Ausführung (Triplett-Ansatz) angelegt. Abbildung 4 zeigt schematisch den Versuchsaufbau.

Die entstandenen Spots wurden mittels dem C.T.L. ELISpot Reader gezählt. In der Auswertung wurde der Mittelwert der Triplett-Ansätze mit Standardabweichung berechnet.

Ergebnisse

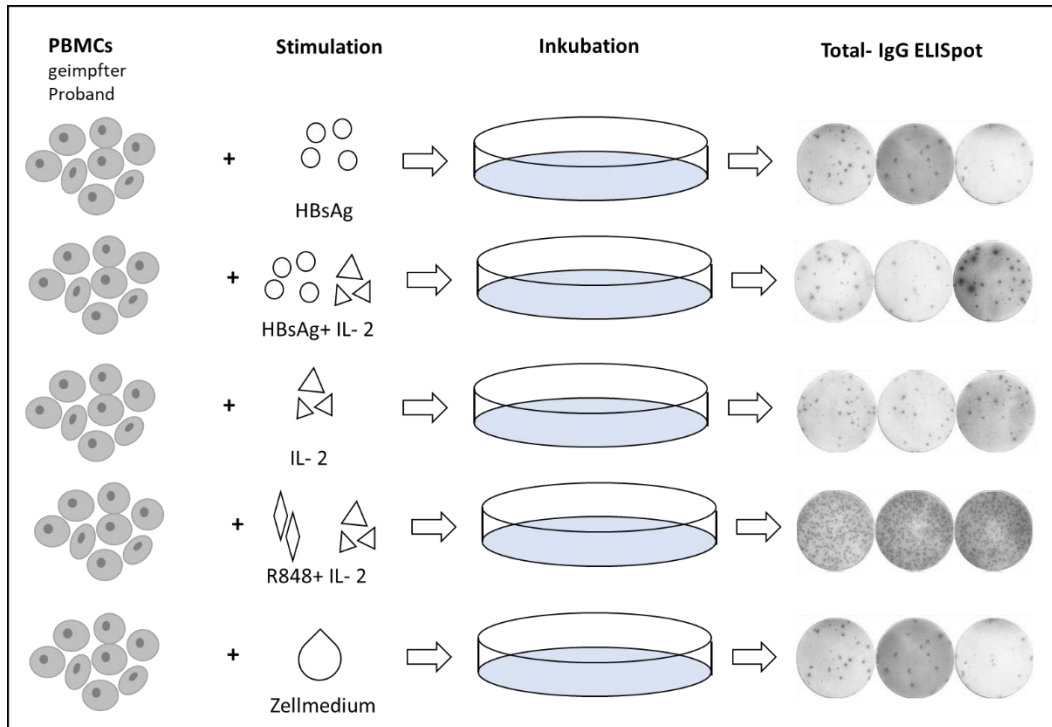


Abbildung 4: Versuchsaufbau der Testetablierung des HBsAg-spezifischen total-IgG ELISpots. In der Testetablierung wurden PBMCs eines geimpften Probanden mit verschiedenen Stimuli inkubiert. Anschließend wurden die stimulierten Zellen in einem total-IgG ELISpot eingesetzt (die ELISpot-Platten rechts sind Beispielbilder, keine realen Ergebnisse).

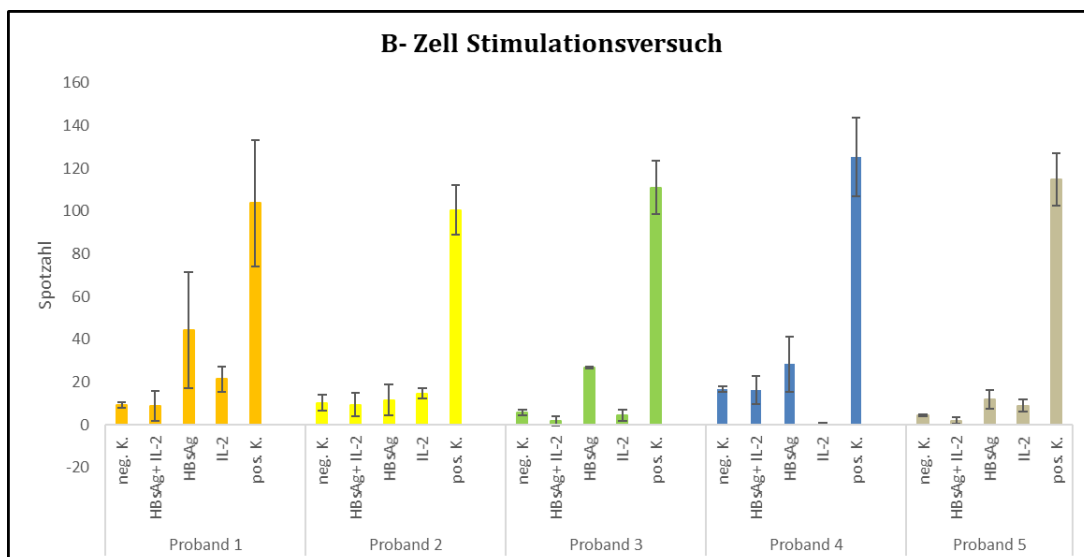


Abbildung 5: Ergebnisse der Testetablierung des HBsAg-spezifischen total-IgG ELISpot. Darstellung der Ergebnisse der Testetablierung des HBsAg-spezifischen total-IgG ELISpot der einzelnen Probanden in einem Säulendiagramm mit Standardabweichung. Die Werte der y-Achse stehen für die durchschnittliche Spotzahl/ Well.

In der negativen Kontrolle waren bei allen fünf Probanden nur sehr wenige Spots auf der Platte zu zählen (Proband 1: M= 9,3; Proband 2: M= 10,3; Proband 3: M= 5,7; Proband 4: M= 16,7; Proband 5: M= 4,3 Spots; M= Mittelwert). Im Vergleich dazu erzielte die positive Kontrolle bei den fünf Probanden deutlich höhere Spotzahlen (Proband 1, M= 103,7; Proband 2, M= 100,3; Proband 3, M= 111; Proband 4: M= 125,3; Proband 5: M= 114,7;). Dieses Ergebnis zeigt, dass die Methode technisch gut funktioniert. Die Spotzahl des Ansatzes mit PBMCs, IL-2 und Hepatitis-B Impfstoff erzielte bei allen fünf Probanden weniger Spots als der alleinige Ansatz von PBMCs und Hepatitis-B Impfstoff.

In Abbildung 6 sind die Mittelwerte aller Ansätze einander gegenübergestellt. In die Berechnung der Mittelwerte fließen jeweils die Spotzahlen der Einzelansätze jedes Probanden mit ein. Vergleicht man die Spotzahlen der negativen Kontrolle mit den Spotzahlen des Ansatzes von PBMCs mit HBsAg, so ergibt sich ein signifikanter Unterschied (Mann-Whitney-U-Test: $Z = -3,137$; $p = 0,001$). Im Vergleich der positiven Kontrolle mit der negativen Kontrolle gab es einen deutlich signifikanten Unterschied (Students-t Test: $p < 0,000$). Der Vergleich zwischen den Spotzahlen der negativen Kontrolle und den Spotzahlen des Ansatzes HBsAg und IL-2 war nicht signifikant ($p = 0,500$), auch der Vergleich zwischen Spotzahlen der negativen Kontrolle mit dem Ansatz mit IL-2 war nicht signifikant ($p = 0,771$).

HBsAg- spezifischer B- Zell Stimulationsversuch		
n= 5		
Ansatz	Mittelwert	SD
Neg. Kontrolle	7,72	5,24
HBsAg+ IL- 2	6,39	5,66
HBsAg	20,50	14,36
IL- 2	8,33	7,68
Pos. Kontrolle	92,50	42,14

Tabelle 1: Ergebnisse der Testetablierung des HBsAg-spezifischen total-IgG ELISpot.

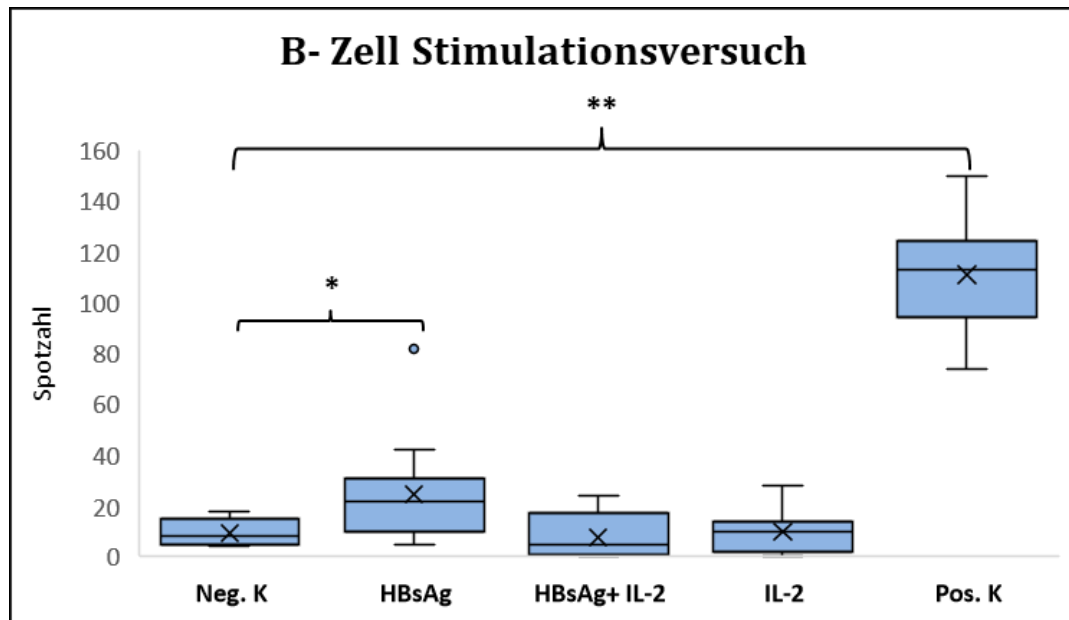


Abbildung 6: Testetablierung des HBsAg-spezifischen total-IgG ELISpot mit p-Werten. Darstellung der durchschnittlichen Spotzahl/ Well in den unterschiedlichen Ansätzen aller Probanden. Die verschiedenen Ansätze sind im Säulendiagramm gegenübergestellt. Die statistisch signifikanten p-Werte sind eingezeichnet: * = $p = 0,001$; ** = $p = 0,001$;

8.2 Testvalidierung des HBsAg-spezifischen total-IgG ELISpot

Nachdem der HBsAg-spezifische total-IgG ELISpot etabliert war, ging es um die Testvalidierung. In der Testvalidierung wurde geprüft, ob der etablierte HBsAg-spezifische IgG ELISpot gegen Hepatitis-B geimpfte Probanden erfolgreich von ungeimpften unterscheiden kann.

In diesem Versuch wurde ein HBsAg-spezifischer total-IgG ELISpot mit sieben gegen Hepatitis-B geimpften und sieben nicht gegen Hepatitis-B geimpften Probanden durchgeführt. Dazu wurden PBMCs der Probanden isoliert und mit dem HBsAg für drei Tage inkubiert. Außerdem wurde eine positive Kontrolle mit IL-2 und R848, sowie eine negative Kontrolle mit Zellkulturmedium ohne Zellstimulation angesetzt. Anschließend wurde ein total-IgG ELISpot angesetzt.

Nach Durchführung und Auswertung des HBsAg-spezifischen IgG-ELISpots konnten verschiedene Spotzahlen zwischen gegen Hepatitis-B-Geimpften und gegen Hepatitis-B-Geimpften detektiert werden, siehe Tabelle 2.

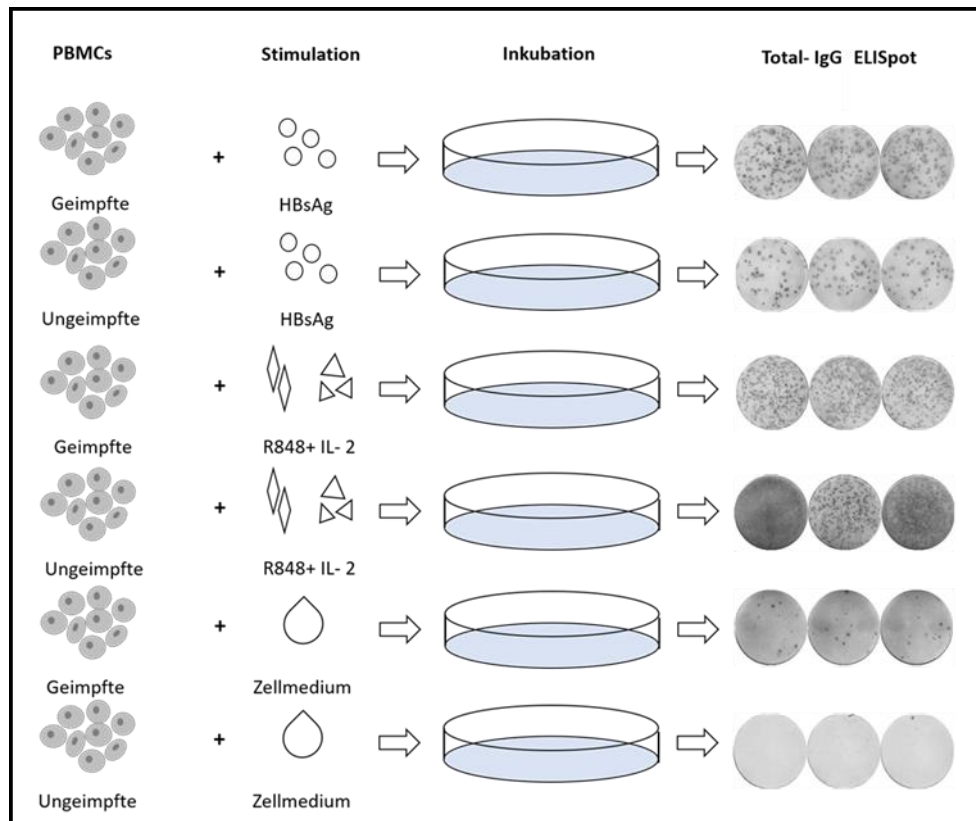


Abbildung 7: Schematischer Versuchsaufbau der Testvalidierung des HBsAg-spezifischen total-IgG ELISpots. PBMCs von geimpften und ungeimpften Probanden wurden mit unterschiedlichen Stimuli inkubiert und anschließend in einem total-IgG ELISpot eingesetzt (die ELISpot-Platten rechts sind Beispielbilder, keine realen Ergebnisse).

Validierung des HBsAg- spezifischen total- IgG ELISpot				
	Probanden	Ansätze		
		neg. Kontrolle	HBsAg	pos. Kontrolle
HBsAg- ungeimpft	P1	0,00	28,75	363,00
	P2	25,67	36,20	475,67
	P3	35,67	41,00	450,00
	P4	21,67	40,00	950,67
	P5	35,00	69,67	739,67
	P6	55,33	55,67	364,33
	P7	17,33	13,67	384,67
HBsAg- geimpft	P8	69,67	164,50	422,67
	P9	51,67	103,83	495,67
	P10	30,00	92,33	319,33
	P11	44,00	47,67	697,00
	P12	217,67	305,00	514,00
	P13	48,67	176,00	451,33
	P14	2,00	24,67	310,67

Tabelle 2: Ergebnisse der Testvalidierung des total-IgG ELISpots. In der Tabelle sind die durchschnittlichen Spotzahlen/ Well in den verschiedenen Ansätzen bei geimpften und ungeimpften Probanden angegeben.

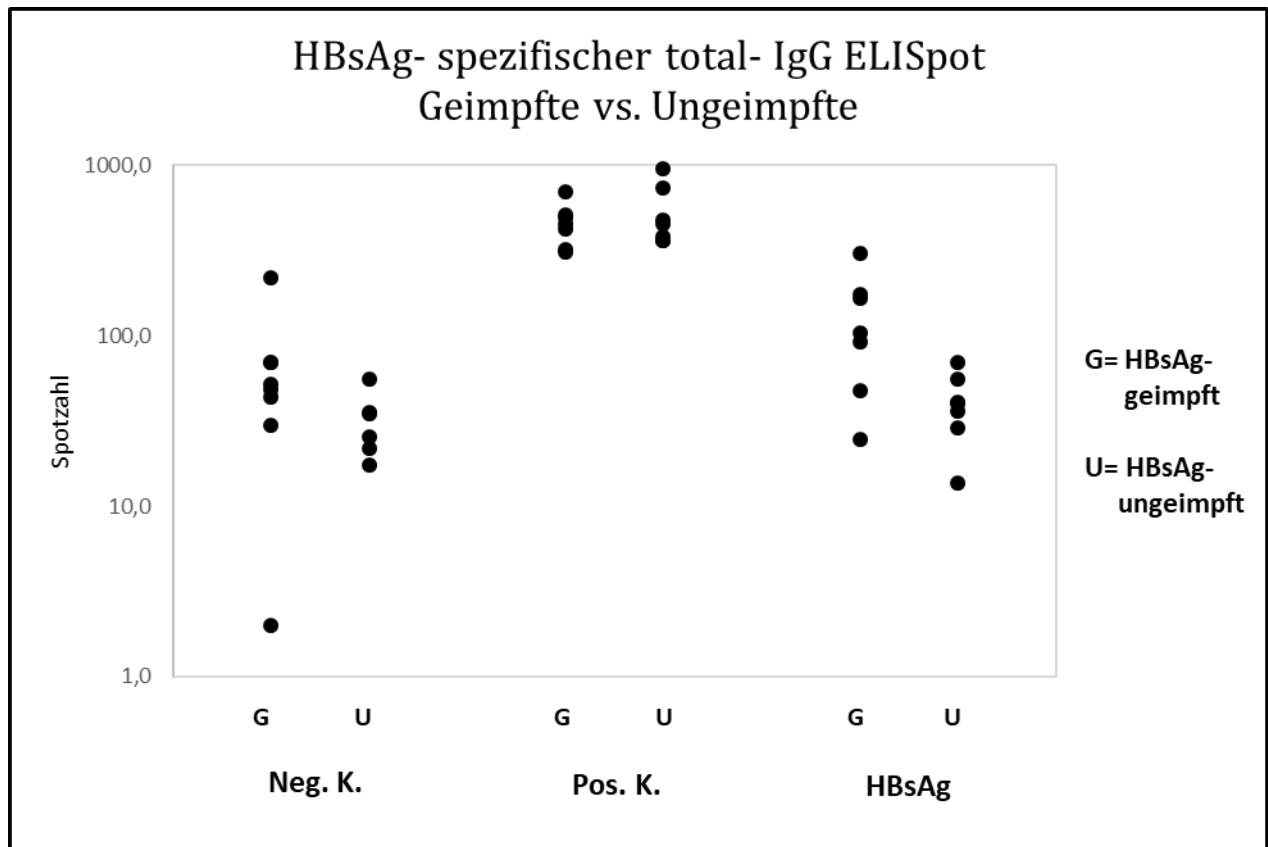


Abbildung 8: Ergebnisse der Testvalidierung des HBsAg-spezifischen total-IgG ELISpot.

G= Gegen Hepatitis-B geimpfter Proband; U= Gegen Hepatitis-B nicht geimpfter Proband; Die verschiedenen Ansätze des total-IgG ELISpots (negativ Kontrolle, positiv Kontrolle und Ansatz mit HBsAg) sind auf der x-Achse dargestellt. Die Ergebnisse der geimpften und ungeimpften Probanden sind in jedem Ansatz einander gegenübergestellt. Die Werte der y-Achse entsprechen der durchschnittlichen Spotzahl/ Well eines Probanden.

Der Ansatz aus PBMCs mit HBsAg zeigte einen signifikanten Unterschied zwischen Geimpften und Ungeimpften (exakter Mann-Whitney-U-Test: $Z = -4,880$; $p = <.000$). Bei zwei der gegen Hepatitis-B geimpften Probanden fielen niedrige Spotzahlen auf (Proband 11 und 14). Eine retrospektive Kontrolle des anti-HBsAg-Antikörpertiters (Impfkontrolle) zeigte bei Proband 14 einen nicht nachweisbaren Titer, was für eine fehlende Immunisierung gegen HBsAg spricht. Beim selben Probanden wurde im HBsAg-spezifischen IgG-ELISpot eine durchschnittliche Spotzahl von 24,67 Spots/Well detektiert. Bei dem Probanden 11 wurde ebenfalls eine geringe durchschnittliche Spotzahl von 47,67 Spots/Well festgestellt. Bei diesem Probanden lag der anti-HBsAg-Antikörpertiter bei $<30 \text{ U/l}$. Die Spotzahlen der negativen Kontrolle unterschieden sich auch zwischen Geimpften und Ungeimpften signifikant ($p=0,043$). Durchschnittlich lag die Spotzahl/Well in der negativen Kontrolle bei gegen Hepatitis-B- Ungeimpften bei 27,23 Spots/Well, bei gegen Hepatitis-B-Geimpften bei 66,23 Spots/Well. Auch in der positiven Kontrolle gab es Unterschiede zwischen Hepatitis-B geimpften und ungeimpften Probanden, allerdings waren diese statistisch nicht signifikant ($p=0,571$). Die durchschnittliche Spotzahl lag hier bei den gegen Hepatitis-B Ungeimpften bei 532,57 Spots/Well und bei den Geimpften bei 458,67 Spots/Well.

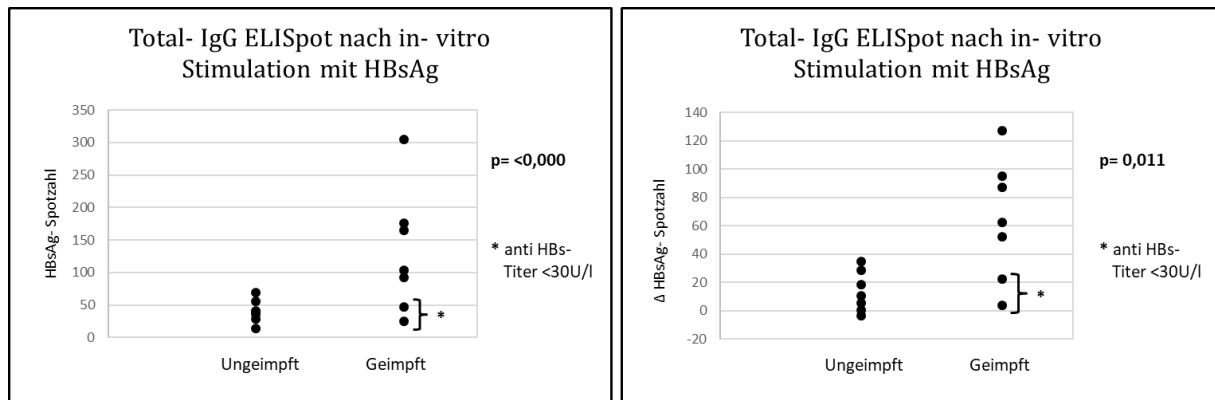


Abbildung 9: Gegenüberstellung der HBsAg-Spotzahl und der Δ -HBsAg Spotzahl von Geimpften und Ungeimpften. Darstellung des Ansatzes mit HBsAg in der Testvalidierung des HBsAg-spezifischen total-IgG ELISpots. Gegenüberstellung der durchschnittlichen HBsAg-Spotzahl/ Well, sowie der Δ HBsAg- Spotzahl von Ungeimpften und Geimpften als Dotplot. *= der anti- HBs- Titer der Probanden lag unter 30U/l. Die p- Wert der Ansätze ist im jeweiligen Diagramm eingetragen.

Aufgrund der teilweise hohen negativ-Spotzahlen und dem statistisch signifikanten Unterschied zwischen Ungeimpften und Geimpften in der negativen Kontrolle wurde die Delta-Spotzahl berechnet, um so das Hintergrundrauschen von der tatsächlich hervorgerufenen Reaktion im HBsAg-spezifischen Ansatz herauszurechnen. Die Delta-HBsAg-Spotzahl wurde errechnet, indem die Differenz zwischen der Spotzahl der durch HBsAg stimulierten Zellen und der Spotzahl der negativen Kontrolle gebildet wurde:

$$\Delta - \text{Spotzahl} = \{\text{Spotzahl Spender} - \text{spezifischer Ansatz}\} - \{\text{Spotzahl negativ Kontrolle}\}.$$

Hier gab es signifikant mehr Spots bei den gegen Hepatitis-B geimpften Probanden (t-Test: p=0,011).

8.3 Testetablierung des Spender-spezifischen total-IgG ELISpot

Nachdem der HBsAg-spezifische IgG-ELISpot erfolgreich etabliert und validiert war, erfolgte die Testetablierung des Spender-spezifischen IgG-ELISpots. Im Spender-spezifischen total-IgG-ELISpot werden die Empfänger-PBMCs mit Spender-PBMCs stimuliert. Durch die Stimulation mit den Spenderzellen sollen nur Spender-spezifische Memory-B-Zellen des Empfängers aktiviert werden und sich dann in IgG-sezernierende Plasmazellen differenzieren. Im Spender-spezifischen Versuchsansatz werden Target- und Effektorzellen eingesetzt. Die Empfänger-PBMCs stellen dabei die Effektorzellen dar und die Spender-PBMCs die Targetzellen. Damit die Spenderzellen im Spender-spezifischen IgG-ELISpot nur als Targetzellen funktionieren und nicht selbst zu Effektorzellen werden und IgGs gegen die Empfängerzellen produzieren, ist es nötig die Targetzellen zu inaktivieren. Beim HBsAg-

spezifischen Ansatz hingegen werden die Empfängerzellen mit einem Antigen inkubiert, welches nicht in der Lage ist, selbst Immunglobuline zu produzieren. Andere Arbeitsgruppen bestrahlen Donorzellen für ELISpot-Assays zur Inaktivierung mit 30 Gy (Gebauer et al. 2002; Nickel et al. 2004; Carroll et al. 2016; Kim et al. 2007). Für die Etablierung eines Spender-spezifischen IgG-ELISpots war es zunächst nötig zu untersuchen, mit welcher Dosis die Spender-PBMCs für unseren Assay inaktiviert werden können.

8.3.1 Bestrahlungsversuche

Um die Spenderzellen für den Spender-spezifischen total-IgG ELISpot zu inaktivieren, sollten sie bestrahlt werden. Es wurden mehrere Bestrahlungsversuche durchgeführt, um zu untersuchen, welche Bestrahlungsdosis für den Spender-spezifischen total-IgG ELISpot nötig ist. Die Spenderzellen sollten durch die Bestrahlung inaktiviert werden. Dafür sollte die zelluläre Integrität und die Antigen-Präsentation noch vorhanden sein, jedoch die Fähigkeit selbstständig IgGs zu produzieren und zu sezernieren ausgeschaltet sein. Im Versuch wurden PBMCs bestrahlt und an den darauffolgenden Tagen mittels FACS auf ihre Viabilität untersucht oder in einem total-IgG ELISpot eingesetzt. Es wurden zum Teil auch aufgetaute PBMCs verwendet. Vor allem bei postmortalen Organspenden muss das Spendermaterial für einen längeren Zeitraum gelagert werden, um Kontroll-ELISpots post transplantationem durchführen zu können. Dies wäre in Form der PBMC Isolation und Lagerung in flüssigem Stickstoff möglich.

8.3.1.1 Bestrahlungsversuche mit Gammastrahlung

In einem Versuch wurden PBMCs von einem Probanden isoliert und mit Gammastrahlung in unterschiedlichen Dosen (0, 30, 50, 70, 80Gy) behandelt. Die Zellen wurden jeweils vor der Bestrahlung und an zwei folgenden Tagen mittels FACS auf ihre Viabilität untersucht. Bei Bestrahlungsdosen ab 30Gy konnten ab dem Tag nach Bestrahlung kaum noch Lymphozyten mittels FACS detektiert werden. Vor Bestrahlung betrug der prozentuale Anteil der Lymphozyten an allen mittels FACS gemessenen Zellen 38,92%. Am Tag nach Bestrahlung ließen sich bei 50Gy nur mehr durchschnittlich 7,32% Lymphozyten erfassen, bei 70Gy 4,06% und bei 80Gy 3,86%. Am zweiten Tag nach Bestrahlung über 30 Gy betrug der prozentuale Anteil der Lymphozyten an allen erfassten Zellen weniger als 1%.

	Bestrahlungsdosis [Gy]	0	30	50	70	80
d0	Lymphozyten- Anteil an allen Zellen [%]	38,92	45,12	38,94	45,93	45,30
	Viable Lymphozyten [%]	99,29	99,11	98,83	99,15	99,25
	Nicht- viable Lymphozyten [%]	0,71	0,85	1,18	0,83	0,76
d1	Lymphozyten- Anteil an allen Zellen [%]	21,99	9,30	7,32	4,06	3,86
	Viable Lymphozyten [%]	95,18	91,41	96,20	95,74	95,49
	Nicht- viable Lymphozyten [%]	4,66	7,30	4,05	3,63	4,19
d2	Lymphozyten- Anteil an allen Zellen [%]	13,71	1,05	0,85	0,48	0,46
	Viable Lymphozyten [%]	99,07	70,17	72,49	54,71	68,88
	Nicht- viable Lymphozyten [%]	1,00	27,05	24,91	38,82	22,68

Tabelle 3: Erster Gy-Bestrahlungsversuch mit Viabilitätsprüfung mittels FACS-Analyse.

In der Tabelle sind die prozentualen Anteile der verschiedenen Zellpopulationen nach unterschiedlichen Bestrahlungsdosen (0, 30, 50, 70, 80Gy) dargestellt. Die Messungen wurden am Tag der Bestrahlung (d0), sowie am ersten (d1) und zweiten (d2) Tag nach Bestrahlung durchgeführt.

In einem weiteren Versuch wurden daher die Bestrahlungsdosen reduziert (0, 10, 20, und 30Gy) und die PBMCs eines Probanden wurden über fünf Tage hinweg mittels FACS auf ihre Viabilität analysiert. Je höher die Bestrahlungsdosis war, desto stärker nahm der prozentuale Anteil der Lymphozyten an den PBMCs ab. Am Tag nach der Bestrahlung waren es bei 10 Gy 29,54% Lymphozyten, bei 20 Gy 26,71% und bei 30Gy 22,96%. Im Verlauf der Tage nach Bestrahlung verringerte sich der prozentuale Anteil der Lymphozyten an den gemessenen Zellen weiter. Am vierten Tag konnten bei einer Bestrahlung mit 10 Gy nur mehr 1,33% Lymphozyten als Anteil der detektierten Zellen erfasst werden, bei 20 und 30 Gy waren es unter 1%. Der prozentuale Anteil der viablen Lymphozyten an der Gesamtheit der Lymphozyten nahm über die Tage hinweg und mit zunehmender Bestrahlungsdosis ab. Am dritten Tag nach Bestrahlung waren bei 0 Gy noch 94,61% der gemessenen Lymphozyten intakt, bei 10 Gy 81,77%, bei 20Gy 65,87% und bei 30Gy 61,9%.

	Bestrahlungsdosis [Gy]	0	10	20	30
d 0	Lymphozyten- Anteil an allen Zellen [%]	75,53			
	Viable Lymphozyten [%]	99,54			
	Nicht- viable Lymphozyten [%]	0,40			
d 1	Lymphozyten- Anteil an allen Zellen [%]	36,49	29,54	26,71	22,96
	Viable Lymphozyten [%]	96,84	97,83	97,85	98,02
	Nicht- viable Lymphozyten [%]	3,13	2,09	2,14	1,92
d 2	Lymphozyten- Anteil an allen Zellen [%]	34,40	8,76	6,30	5,94
	Viable Lymphozyten [%]	97,44	93,78	91,58	90,77
	Nicht- viable Lymphozyten [%]	2,61	6,22	8,11	9,23
d 3	Lymphozyten- Anteil an allen Zellen [%]	50,71	1,97	1,08	1,20
	Viable Lymphozyten [%]	94,62	81,77	65,87	61,90
	Nicht- viable Lymphozyten [%]	1,57	13,58	28,37	31,19
d 4	Lymphozyten- Anteil an allen Zellen [%]	50,67	1,33	0,69	0,64
	Viable Lymphozyten [%]	93,74	59,94	48,26	13,91
	Nicht- viable Lymphozyten [%]	1,40	34,58	47,07	67,37

Tabelle 4: Zweiter Gy-Bestrahlungsversuch mit Viabilitätsprüfung mittels FACS-Analyse.

In der Tabelle sind die prozentualen Anteile der verschiedenen Zellpopulationen nach unterschiedlichen Bestrahlungsdosen (0, 10, 20, 30Gy) dargestellt. Die Messungen wurden am Tag der Bestrahlung (d0), sowie am ersten (d1), zweiten (d2), dritten (d3) und vierten (d4) Tag nach Bestrahlung durchgeführt.

In einem weiteren Versuch wurden PBMCs mit verschiedenen Dosen (0, 10, 20 und 30Gy) bestrahlt und anschließend ein total-IgG-ELISpot angesetzt. Es wurde ermittelt, welche Bestrahlungsdosis nötig ist, um die IgG-Produktion zu stoppen, sei es in der negativen Kontrolle, wie in der positiven Kontrolle. Im Versuch wurden frisch isolierte und aufgetaute PBMCs von sechs Probanden verwendet, um das Verhalten der frisch isolierten und der aufgetauten PBMCs vergleichen zu können. In den Positivkontrollen konnten bei allen Probanden und bei allen Bestrahlungsdosen, egal ob frisch isolierte oder aufgetaute PBMCs, Spots detektiert werden. Die Spotzahl nahm mit der Bestrahlungsintensität ab, sodass bei einer Bestrahlung mit 30Gy die geringsten Spotzahlen gemessen wurden. Auch in den Negativkontrollen konnten in jeder Bestrahlungsdosis Spots detektiert werden, die mit zunehmender Bestrahlungsdosis sowohl bei den frisch isolierten, als auch bei den aufgetauten PBMCs weniger wurden. Die gemessene Spotzahl der Positivkontrollen der aufgetauten PBMCs war im Vergleich mit der Spotzahl der frisch isolierten PBMCs immer etwas geringer. Der Mittelwert der Positivkontrollen der frisch isolierten PBMCs lag bei 0Gy bei 610,24 Spots/Well, bei den aufgetauten PBMCs bei 545,93 Spots/Well. Bei 30 Gy waren es bei den frisch isolierten PBMCs in der Positivkontrolle durchschnittlich 40,10 Spots/Well, bei den aufgetauten PBMCs durchschnittlich 19,15 Spots/Well.

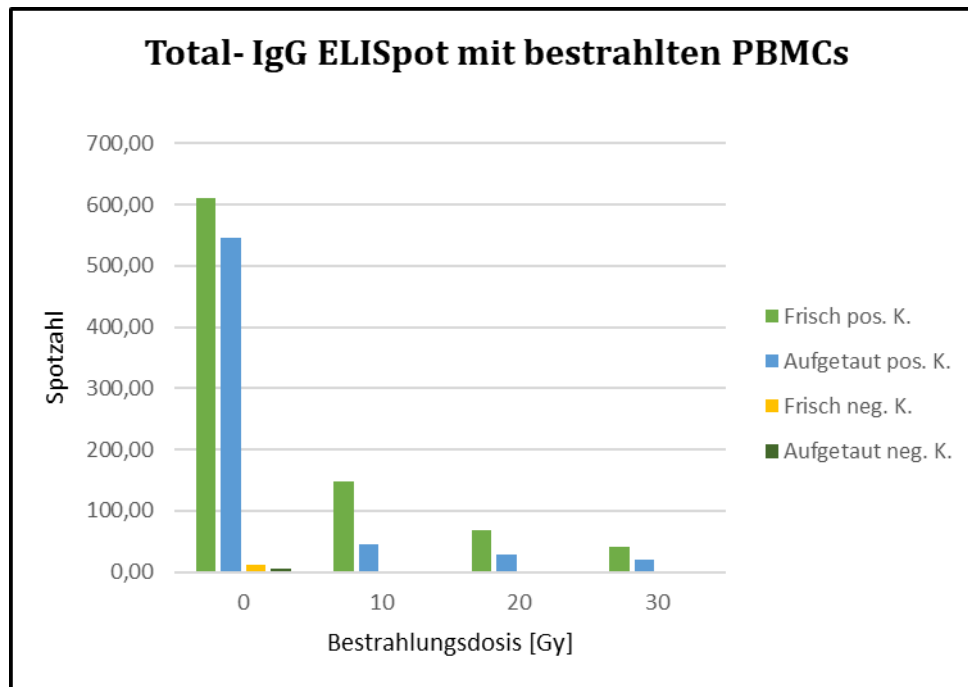


Abbildung 10: Grafische Darstellung der Ergebnisse des total-IgG ELISpot mit frischen und aufgetauten bestrahlten PBMCs. PBMCs wurden mit unterschiedlichen Bestrahlungsdosen (0, 10, 20, 30Gy) behandelt und anschließend in einem total-IgG ELISpot mit verschiedenen Ansätzen (negativ und positiv Kontrolle) eingesetzt. Im Versuch wurden frisch isolierte (Frisch) und aufgetaute (Aufgetaut) PMBCs eingesetzt. Die y-Achse entspricht der durchschnittlichen Spotzahl/Well im ELISpot.

8.3.2 Durchführung eines Spender-spezifischen total-IgG ELISpot mit gesunden Probanden und Milz-PBMCs

In einem weiteren Etablierungsversuch des Spender-spezifischen total-IgG ELISpot wurde der Assay an gesunden Probanden getestet. In diesem Versuch sollte analysiert werden, ob PMBCs des einen Probanden mit inaktivierten PBMCs der anderen Testperson stimuliert werden können. Zusätzlich wurden zur Stimulation auch Splenozyten eingesetzt. Hier sollte untersucht werden, wie sich Splenozyten im ELISpot verhalten und ob sie bei gesunden Probanden eine Reaktion im Spender-spezifischen total-IgG ELISpot hervorrufen können. Weiterhin sollte ermittelt werden, ob auch aufgetaute Zellen im Spender-spezifischen total-IgG ELISpot eingesetzt werden können und ob deren Reaktion mit den frisch aufgetauten Zellen im ELISpot vergleichbar ist.

Den Probanden wurde zu zwei Zeitpunkten Blut abgenommen. Die isolierten PBMCs der ersten Blutentnahme wurden weggefroren und am Tag vor der zweiten Blutentnahme wieder aufgetaut. Der Spender-spezifische total-IgG ELISpot wurde somit mit aufgetauten und frisch isolierten PBMCs durchgeführt. Dabei wurde einmal die eine Testperson als „Spender“ im ELISpot eingesetzt, einmal die andere. Die „Spenderzellen“ wurden mit 30Gy bestrahlt bevor sie im Spender-spezifischen total-IgG ELISpot eingesetzt wurden. Als „Spenderzellen“ wurden auch übrig gebliebene, aufgetaute

Splenozyten eines Kadaverspenders verwendet. Auch diese Zellen wurden bestrahlt. Proband 1 mit frisch isolierten Zellen war in einem Ansatz der „Empfänger“. Als „Spenderzellen“ wurden einmal frisch isolierte, einmal aufgetaute PBMCs von Proband 2 eingesetzt. Derselbe Ansatz erfolgte auch mit aufgetauten PBMCs von Proband 1. In einem weiteren Ansatz wurden die Plätze von Proband 1 und 2 getauscht und Proband 2 wurde als „Empfänger“ eingesetzt. Im dritten Ansatz wurden als „Spenderzellen“ isolierte Splenozyten eingesetzt. Von Proband 1 und 2 wurden sowohl frisch isolierte, als auch aufgetaute PBMCs als „Empfängerzellen“ eingesetzt. Eine positive und negative Kontrolle wurde bei jedem Versuch mit angesetzt.

Insgesamt ließen sich in den Ansätzen mit aufgetauten „Empfängerzellen“ deutlich weniger Spots detektieren als in den Ansätzen mit frisch isolierten Zellen (siehe Tabelle 6), so wie es bereits im Bestrahlungsversuch mit frisch isolierten und aufgetauten PBMCs gesehen wurde (siehe Abbildung 10). In diesem Versuch wurde die Ratio zwischen frischen und aufgetauten Zellen errechnet (siehe Tabelle 6). Hierbei kam es durchschnittlich im Ansatz mit aufgetauten Zellen zu 57% weniger Spots im Vergleich zum Ansatz mit frisch isolierten Zellen. Im Ansatz mit aufgetauten Zellen von Proband 1 als „Empfänger“ und der Milz als „Spender“ ließen sich durchschnittlich 27,5 Spots/Well, in der Negativkontrolle von aufgetauten Zellen von Proband 1 waren durchschnittlich 14,67 Spots/Well messbar. Bei aufgetauten Zellen von Proband 2 als „Empfänger“ und der Milz als „Spender“ waren es durchschnittlich 5 Spots/Well. In der Negativkontrolle von Proband 2 mit aufgetauten Zellen waren durchschnittlich 0,67Spots/Well. Es wurde auch eine Negativ- und Positivkontrolle von bestrahlten Splenozyten angesetzt. In der Negativkontrolle mit bestrahlten Splenozyten konnten keine Spots detektiert werden. Bestrahlte Splenozyten ließen sich in der Positivkontrolle mit IL-2 und R848 etwas stimulieren, sodass im ELISpot eine Spotzahl von durchschnittlich 7 Spots/Well gemessen wurde.

In Zusammenschau zeigte sich, dass der Ansatz mit Splenozyten als „Spenderzellen“ bei beiden Probanden als „Empfänger“ eine Reaktion hervorrief. Setzte man jedoch Proband 1 oder 2 als „Spender“ ein, so ließ sich nur eine geringe Reaktion im ELISpot messen. Der Einsatz von aufgetauten PBMCs im Spender-spezifischen total-IgG ELISpot war möglich, ging jedoch in jedem Ansatz mit einer geringer hervorgerufenen Spotzahl einher.

P1: "Empfänger"; P2: "Spender"	P1 frisch	P1 aufgetaut	Ratio P1 aufgetaut/frisch [%]
P1 neg. Kontrolle	60,33	14,67	24
P1+ P2 aufgetaut	12,33	5,33	43
P1+ P2 frisch	6,33	3,67	58
P1 pos. Kontrolle	734,00	457,67	62
P1 bestrahlt neg. Kontrolle	6,00	2,00	33
Mittelwert			44
P2: "Empfänger"; P1: "Spender"	P2 frisch	P2 aufgetaut	Ratio P2 aufgetaut/frisch [%]
P2 neg. Kontrolle	4,33	0,67	15
P2+ P1 aufgetaut	3,33	1,33	40
P2+ P1 frisch	4,67	2,33	50
P2 pos. Kontrolle	789,33	670,33	85
P2 bestrahlt neg. Kontrolle	0,00	0,00	-
Mittelwert			48
Milz: "Spender"; P1,2: "Empfänger"	P1,2 frisch	P1,2 aufgetaut	Ratio P1,2 aufgetaut/frisch [%]
P1+ Milz	45,00	27,5	61
P2+ Milz	12,00	5	42
Mittelwert			51
Milz bestrahlt neg. Kontrolle	0,00		
Milz bestrahlt pos. Kontrolle	7,00		
Mittelwert gesamt			43

Tabelle 5: Testetablierung des Spender-spezifischen total-IgG ELISpot.

Probanden-PBMCs (P1, P2) wurden isoliert und in einem Spender-spezifischen total-IgG ELISpot eingesetzt. Exemplarisch wurden die Probanden einmal als „Empfänger“ und einmal nach Bestrahlung als „Spender“ eingesetzt. Ein Ansatz erfolgte mit aufgetauten Splenozyten als „Spenderzellen“. Es wurden frisch isolierte und aufgetaute PBMCs eingesetzt. Im Spender-spezifischen total-IgG ELISpot wurden verschiedene Ansätze (negativ und positiv Kontrolle, Spender-spezifischer Ansatz) durchgeführt. Die durchschnittlichen Spotzahlen/Well sind in der Tabelle dargestellt. Zusätzlich wurde die Ratio der durchschnittlichen Spotzahlen/Well aus den Ansätzen mit aufgetauten und frisch isolierten Zellen gebildet.

8.4 Testvalidierung des Spender-spezifischen total-IgG ELISpot

In diesem Ansatz wurde untersucht, ob der Spender-spezifische total-IgG ELISpot auch bei Immunsupprimierten angewandt werden und messbare Ergebnisse liefern kann. Dafür wurde ein Spender-spezifischer total-IgG ELISpot an zehn Empfängern einer Nierentransplantation durchgeführt. Der Assay wurde bei jedem Empfänger jeweils vor der Transplantation und im Durchschnitt etwa zwei Wochen (10- 21 Tage) nach der Transplantation (M= 13,2; Stabw: 3,06), unter Einnahme von

Ergebnisse

Immunsuppressiva, durchgeführt. Die ELISpot Ergebnisse wurden außerdem mit den HLA-Antikörperbefunden und den histopathologischen Ergebnissen verglichen.

Für den Spender-spezifischen total-IgG ELISpot wurden dem Empfänger und bei Lebendspenden dem Spender Blut entnommen und PBMCs isoliert. Bei postmortalen Spenden wurden Splenozyten isoliert. Die Empfänger PBMCs wurden mit bestrahlten, inaktivierten Spender PBMCs für drei Tage im Brutschrank inkubiert. Der total-IgG ELISpot wurde wie oben beschrieben durchgeführt (siehe 7.5.3 Der Spender-spezifische total-IgG ELISpot).

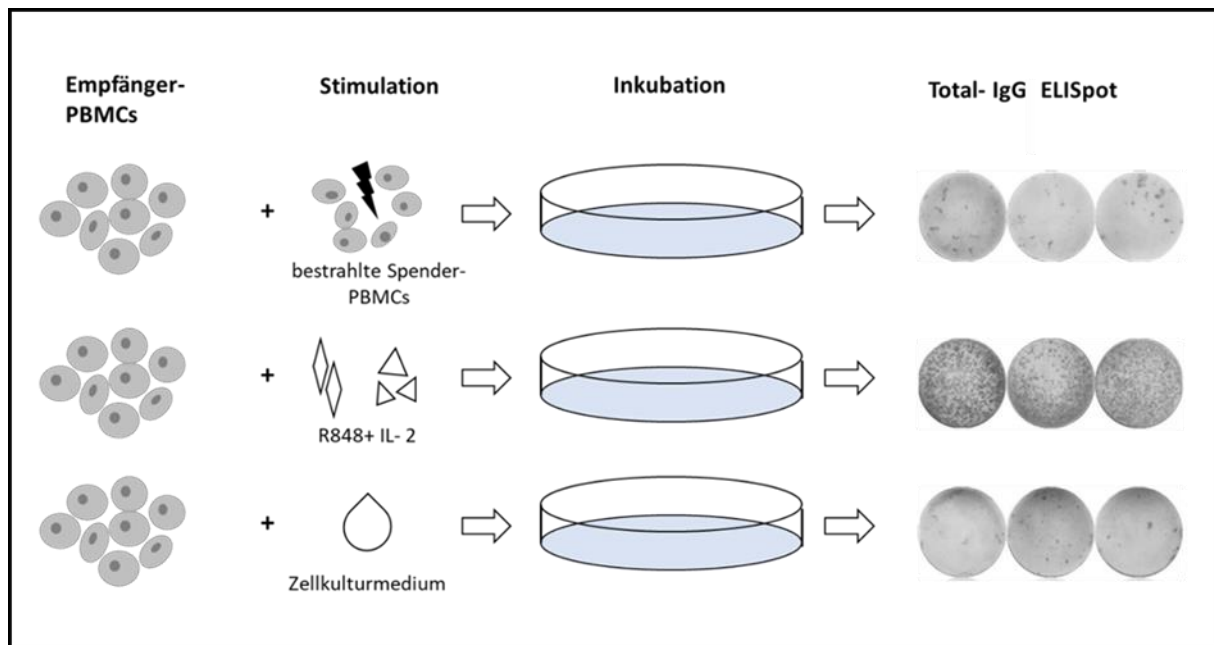


Abbildung 11: Versuchsaufbau der Testvalidierung des Spender-spezifischen total-IgG ELISpot. Empfänger-PBMCs wurden mit verschiedenen Stimuli inkubiert und anschließend in einem total-IgG ELISpot eingesetzt (die ELISpot-Platten rechts sind Beispielbilder, keine realen Ergebnisse).

Bei sechs der zehn Nierentransplantationen handelte es sich um Lebendspenden, die anderen vier waren post-mortale Spenden. Bei Proband 5 und 10 handelte es sich um die zweite Nierentransplantation. Sechs der Empfänger waren bereits vor der Transplantation immunisiert und wiesen HLA I- oder II-Antikörper auf: Proband 2, 3, 6, 8, 9 und 10 (siehe Tabelle 7). Nach der Transplantation entwickelten drei Patienten DSA: Proband 2,3 und 6. Bei Proband 9 waren 3 Monate nach Transplantation keine HLA-Antikörper mehr detektierbar, bei Proband 8 nach einem Monat nach Transplantation.

Ergebnisse

Patient	LSP	HLA-Ak prä	PRA prä	HLA- Ak post	DSA post [d post]	Abstoßung [d post Tx] Banff	Abstoßung 2 [d post Tx] Banff	Tx
Pat 1	ja	-	0%	-	-	152d Banff 4IA	-	1. NTx
Pat 2	ja	aHLA KI I	30%	aHLA KI I	aHLA-B51 190d	-	-	1.NTx
Pat 3	ja	aHLA KI I & II	96%	aHLA KI I & II	aHLA-B13 und -DR7 27d	7d Banff 4 IIA	16d Banff 3	1.NTx
Pat 4	ja	-	0%	-	-	-	-	1.NTx
Pat 5	ja	-	55%	-	-	-	-	2.NTx
Pat 6	nein	aHLA KI I, DSA A32	99%	aHLA KI I	DSA A32 24d	20d Banff 2	-	1. NTx
Pat 7	nein	-	0%	-	-	-	-	1. NTx
Pat 8	nein	aHLA KI II	0%	-	-	10d Banff 3	-	1.NTx
Pat 9	nein	aHLA KI I	8%	aHLA KI I	-	-	-	1.NTx
Pat 10	ja	aHLA KI II	72%	aHLA KI II	-	-	-	2. NTx

Tabelle 6: Überblick über die eingeschlossenen Nierentransplantatempfänger.

LSP= Lebendspende; HLA- Ak prä= HLA-Ak vor Transplantation; PRA prä= PRA vor Transplantation; HLA-Ak post= HLA-Ak nach Transplantation; DSA post= DSA nach Transplantation; Tx= Transplantation; NTx= Nierentransplantation; Erfassung von PRA vor Transplantation, HLA-Ak vor und nach der Transplantation, sowie Erfassung von DSA nach Transplantation der einzelnen Patienten (Pat 1- 10) und Erfassung von aufgetretenen Abstoßungen mit Banff- Klassifikation.

Sowohl prä- als auch posttransplant konnten bei allen Probanden Spots detektiert werden. Die Immunsuppression nach Transplantation führte in der Positiv- und Negativkontrolle tendenziell zu einer Abnahme der Spotzahl oder etwa gleichbleibender Spotzahl. Nur bei Proband 3, 4 und 7 konnte ein Anstieg der Spotzahl in der Negativkontrolle verzeichnet werden. In der Positivkontrolle waren bei Proband 1, 5, 7 und 9 eine höhere Spotzahl posttransplant zu verzeichnen. Im Ansatz Empfänger- mit inaktivierten Spenderzellen zeigten sich nach Transplantation im Spender-spezifischen total-IgG ELISpot bei acht von zehn Probanden eine Abnahme der Spotzahl. Bei Proband 3 und 4 stieg hingegen die Spotzahl im posttransplant durchgeführten Spender-spezifischen total-IgG ELISpot an. Betrachtet man hingegen die Δ -Spotzahl vom Spender-spezifischen Ansatz, welche die Differenz aus der durchschnittlichen Spotzahl des Spender-spezifischen Ansatzes und der durchschnittlichen Spotzahl der Negativkontrolle darstellt, so wiesen insgesamt 5 Patienten einen Anstieg der Δ -Spotzahl posttransplant auf: Patient 1, 2, 3, 4 und 10 (siehe Tabelle 8). Die errechnete Δ -Spotzahl wies oft negative Werte auf. Dies kam dadurch zu Stande, dass bei manchen Ansätzen in der Negativkontrolle mehr Spots detektiert wurden, als im Spender-spezifischen Ansatz.

Patienten	Versuchsansätze						Errechnetes Δ	
	neg.K. prä	neg.K. post	pos.K. prä	pos.K. post	E+S prä	E+S post	Δ E+S prä	Δ E+S post
Pat. 1	25	5,66	47,7	392	9,7	0,7	-15,3	-5
Pat. 2	22	0	480,7	481,3	13,2	1	-8,8	1
Pat. 3	3,33	16	750	324,7	0,3	29,3	-3	13,3
Pat. 4	9	10	656	421,3	0,8	2,5	-8,2	-7,5
Pat. 5	24	17	233,7	530,3	33,6	3,5	9,6	-13,5
Pat. 6	2,66	1,66	243	198	85	62,3	82,3	60,7
Pat. 7	11,66	20,33	314,3	353,3	103,8	33	92,2	12,7
Pat. 8	2,66	2	263,3	257,7	7,8	6,3	5,2	4,3
Pat. 9	10	1,33	238	387,3	92,7	37	82,7	35,7
Pat. 10	8	2	477,7	365	5,7	3,3	-2,3	1,3

Tabelle 7: Validierung des Spender-spezifischen total-IgG ELISpot.

Tabellarische Darstellung der errechneten Mittelwerte der gezählten Spotzahlen/Well der verschiedenen Ansätze (negativ Kontrolle, positiv Kontrolle, E+S= Spender-spezifischer Ansatz) vor und nach der Transplantation, sowie der errechneten Δ -Spotzahlen.

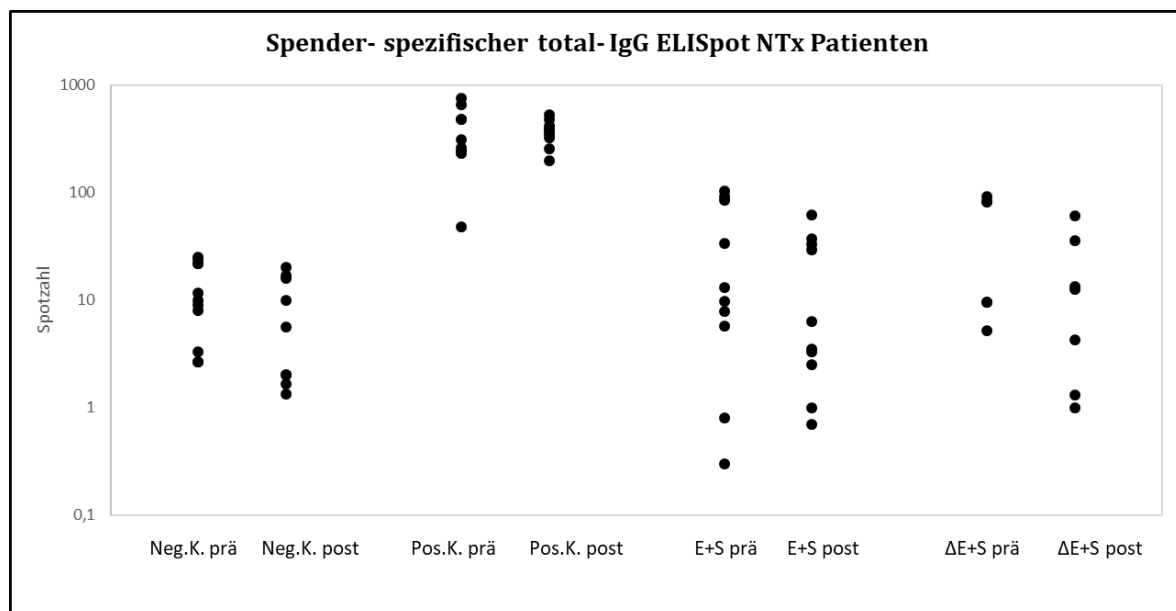


Abbildung 12: Validierung des Spender-spezifischen total-IgG ELISpots.

E= Empfänger- PBMCs; S= Spender- PBMCs;

Grafische Darstellung der berechneten Mittelwerte der gezählten Spotzahlen/Well und errechneten Δ -Spotzahlen im Spender-spezifischen total-IgG ELISpot mit 10 Nierentransplantierten jeweils vor und zwei Wochen nach der Transplantation. Die Ergebnisse der verschiedenen Ansätze vor und nach der Transplantation sind einander gegenübergestellt.

Bei Proband 3 konnte im Ansatz Empfänger-PBMCs mit inaktivierten Spender-PBMCs im Spender-spezifischen total-IgG ELISpot ein deutlicher Anstieg der Spotzahl und auch der Δ -Spotzahl (Differenz aus der Spotzahl des Ansatzes Empfänger- mit inaktivierten Spender-PBMCs und der Spotzahl der Negativkontrolle) nach Transplantation verzeichnet werden (siehe Tabelle 8). Dieser Proband wies bereits prätransplant Antikörper gegen HLA-I und -II auf, welche auch posttransplant noch messbar

waren. Zudem entwickelte er zwei Abstoßungsreaktionen. Bereits 7 Tage nach Nierentransplantation erlitt er eine Steroid-resistente (Banff 4IIa) und 16 Tage nach Transplantation eine weitere Abstoßung (Banff 3). Zusätzlich entwickelte Proband 3 bereits 27 Tage nach Transplantation neu gebildete (de novo) DSA. Der Anstieg der Spotzahl (von prätransplant 0,33 Spots/Well auf posttransplant 29,33 Spots/Well) im Ansatz Empfänger- mit inaktivierten Spenderzellen im Spender-spezifischen total-IgG ELISpot wurde 21 Tage nach Transplantation gemessen. Der Anstieg ereignete sich somit während der Abstoßungsreaktionen und der Detektion der de novo DSA.

Der Proband 1 zeigte 5 Monate nach Transplantation bei abnehmender Transplantatfunktion eine steroidsensible Abstoßungsreaktion gegen das Transplantat (Banff 4IA). Bei diesem Probanden konnten weder prätransplant noch zum Zeitpunkt der Abstoßung HLA-Antikörper gemessen werden. Die Spotzahl im Ansatz Empfänger- mit inaktivierten Spenderzellen betrug im Spender-spezifischen IgG-ELISpot prätransplant durchschnittlich 9,67 Spots/Well, zwei Wochen nach der Transplantation 0,67Spots/Well. Die Δ -Spotzahl lag prätransplant bei -15,33, posttransplant bei -5.

Der Proband 2 war bereits vor der Transplantation immunisiert mit einer PRA von 30%. Bei ihm konnten prätransplant HLA-I-Antikörper detektiert werden, welche auch nach der Transplantation messbar waren. 6 Monate posttransplant wurden auch DSA mit geringer Signalstärke mittels Luminex gemessen. Im Spender-spezifischen total-IgG ELISpot lag die Spotzahl im Ansatz bei Empfänger- mit inaktivierten Spenderzellen prätransplant durchschnittlich bei 13,17 Spots/Well, posttransplant bei 1 Spot/Well. Die Δ -Spotzahl lag prätransplant bei -8,83, posttransplant bei 1.

Der Proband 6 erlitt 20 Tage nach Transplantation eine humorale Abstoßungsreaktion (Banff 2). 24 Tage nach Transplantation wurden DSA mittels Luminex gemessen, welche in geringer Signalstärke (MFI 2400) auch prätransplant gemessen wurden. Der Spender-spezifische total-IgG ELISpot wurde 9 Tage vor der Detektion der DSA durchgeführt. Die durchschnittliche Spotzahl lag im Ansatz Empfänger- mit inaktivierten Spenderzellen vor der Transplantation bei 85 Spots/Well, nach der Transplantation bei 62,33 Spots/Well. Die Δ -Spotzahl lag prätransplant bei durchschnittlich 82,33, posttransplant bei 60,67. 6 Monate nach der Transplantation waren die DSA mittels Luminex nicht mehr nachweisbar.

Der Proband 8 zeigte bereits vor der Transplantation Antikörper gegen HLA-II, welche bereits einen Monat nach Transplantation nicht mehr messbar waren. Er erlitt 10 Tage nach der Transplantation eine steroidsensible Abstoßungsreaktion (Banff 3). Im Spender-spezifischen total-IgG ELISpot lag die durchschnittliche Spotzahl im Ansatz Empfänger- mit inaktivierten Spenderzellen vor der Transplantation bei 7,83 Spots/Well, nach der Transplantation bei 6,25 Spots/Well. Die Δ -Spotzahl lag prätransplant bei 5,17, posttransplant bei 4,25.

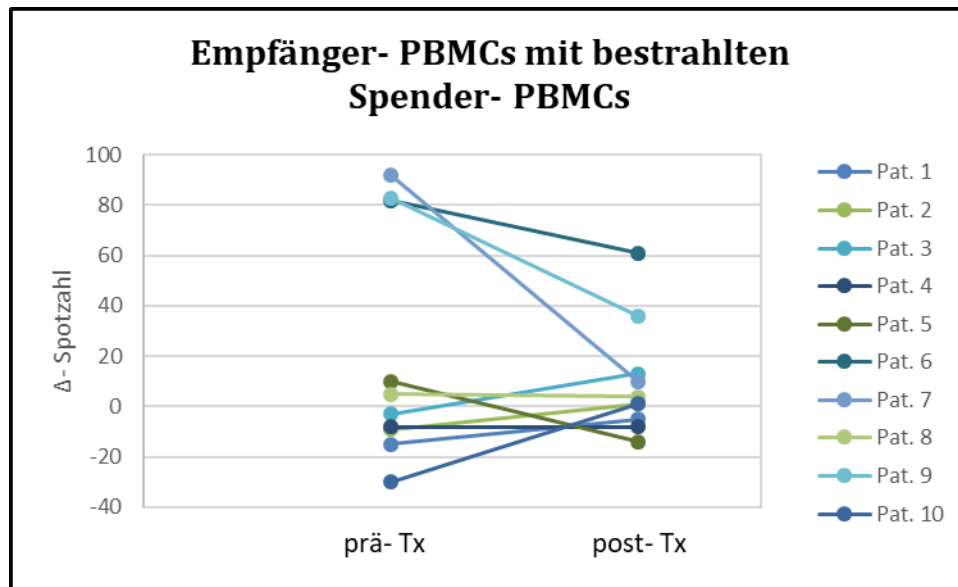


Abbildung 13: Δ -Spotzahl des Spender-spezifischen total-IgG ELISpot prä- und posttransplant. Die Ergebnisse der berechneten Δ -Spotzahlen des Spender-spezifischen Ansatzes vor und nach der Transplantation sind im Diagramm gegenübergestellt.

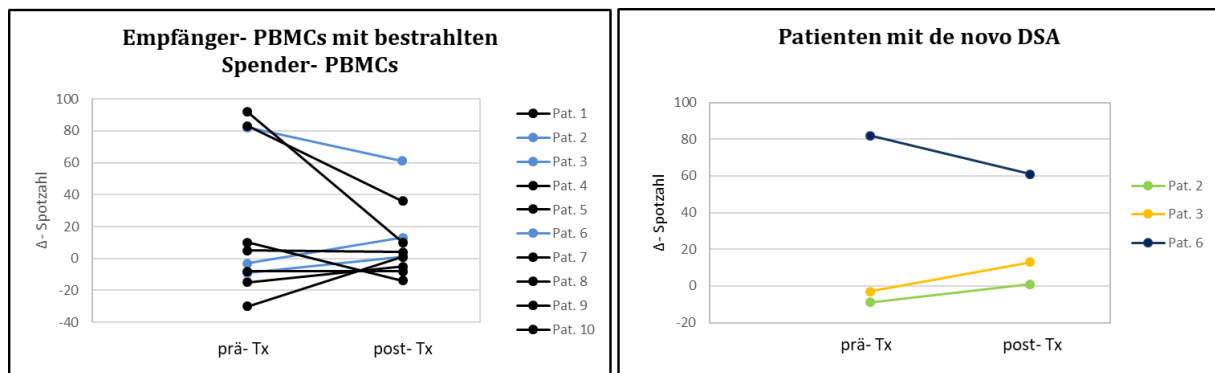


Abbildung 14: Darstellung der Δ -Spotzahl des Spender-spezifischen total-IgG ELISpot prä- und posttransplant. Die Patienten 2, 3 und 6, welche posttransplant de novo DSA entwickelten, sind farblich hervorgehoben.

Insgesamt entwickelten drei der zehn Probanden de novo DSA nach der Transplantation: Proband 2,3 und 6. Bei Proband 2 und 3 stieg dabei auch die Δ -Spotzahl nach der Transplantation im Spender-spezifischen Ansatz an. Die Δ -Spotzahl von Proband 6 war posttransplant geringer, jedoch zeigte der Proband im Spender-spezifischen Ansatz im Vergleich mit den anderen Probanden sehr hohe Spotzahlen.

Die Ergebnisse des Spender-spezifischen total-IgG ELISpots zeigen, dass der Assay bei Immunsupprimierten angewandt werden kann. Die Abstoßungsreaktion von Proband 3 ereignete sich zudem etwa zeitgleich mit dem Anstieg der Spotzahl im Spender-spezifischen total-IgG ELISpot.

9 Diskussion

Die Organtransplantation stellt eine sehr gute Therapie für Patienten mit terminalem Organversagen dar. Das Kurzzeitüberleben nach Organtransplantation hat sich in den letzten Jahren bereits deutlich verbessert. Das Langzeitüberleben ist jedoch immer noch unzufriedenstellend. Die transplantierten Organe verlieren im Mittel- und Langzeitverlauf ihre Funktion durch eine Abstoßungsreaktion des Empfängers oder durch Nebenwirkungen der eingenommenen Medikamente. Zum Immunmonitoring nach Transplantation werden im klinischen Alltag die Empfänger mittels Luminex auf zirkulierende HLA-Antikörper untersucht (El-Awar et al. 2007; Haarberg und Tambur 2014). Jedoch wird anhand dieser Untersuchungen nur ein kleiner Teil der Alloimmunität erfasst. Es ist wichtig die pathophysiologischen Prozesse und die zugrundeliegenden Mechanismen der Alloimmunität nach Transplantation möglichst vollständig zu erfassen, um therapeutische Ansatzpunkte zu finden, um Transplantatabstoßungen verhindern oder besser therapieren zu können.

Die Rolle der T-Zellen in der Transplantationsimmunologie ist bereits gut erforscht. Die Rolle und Relevanz der B-Zellen in der Abstoßungsreaktion nach Organtransplantation ist jedoch noch weitgehend unklar. B-Zellen können das Transplantat durch Alloantikörper schädigen, sie spielen aber auch eine wichtige Rolle in der Transplantationsimmunologie als Gedächtnis-, Antigen-präsentierende- und Co-stimulierende-Zellen (Shiu und Dorling 2014). Viele Studien unterstreichen die Bedeutung der Memory-B-Zellen, um den Grad der Immunaktivierung gegenüber dem Donor besser identifizieren zu können (Lúcia et al. 2015b; Heidt et al. 2012). Es gibt jedoch nur sehr wenige Methoden und Assays, welche im Stande sind HLA-spezifische oder Donor-spezifische Memory-B-Zellen zu quantifizieren. Ziel der Doktorarbeit war die Testetablierung eines Spender-spezifischen IgG-ELISpots. Um diesen Spender-spezifischen total-IgG ELISpot zu entwickeln, wurde vorerst ein HBsAg-spezifischer total-IgG ELISpot entwickelt. Der HBsAg-spezifische total-IgG ELISpot sollte zwischen gegen Hepatitis-B Geimpften und Ungeimpften signifikant unterscheiden können.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die Testetablierung eines HBsAg-spezifischen total-IgG ELISpot gelang, indem gezielt nur HBsAg-spezifische Memory-B-Zellen aktiviert wurden und durch die Differenzierung zu IgG-sezernierenden PZ im total-IgG ELISpot sichtbar und somit quantifizierbar wurden. Auch die Testvalidierung des HBsAg-spezifischen total-IgG ELISpot an gegen Hepatitis-B geimpften und ungeimpften Probanden war erfolgreich. Der entwickelte Assay konnte signifikant zwischen gegen Hepatitis-B Geimpften und Ungeimpften differenzieren. Somit war das ELISpot-Impfmodell etabliert und wurde auf die Transplantationssituation übertragen. Im Spender-spezifischen total-IgG ELISpot sollten nur Spender-spezifische Memory-B-Zellen des Empfängers aktiviert werden, sodass sie sich in IgG-sezernierende PZ differenzieren und im ELISpot sichtbar und

quantifizierbar werden. Nachdem die adäquate Bestrahlungsart und- dosis zur Inaktivierung der Spender-PBMCs ermittelt wurde und der Spender-spezifische total-IgG ELISpot etabliert war, konnte eine Validierungsstudie des Spender-spezifischen total-IgG ELISpot an 10 Nierentransplantationsempfängern durchgeführt werden. Dabei wurde der Assay jeweils vor und nach der Transplantation durchgeführt und die Ergebnisse wurden in Zusammenschau mit den routinemäßig bestimmten DSA, sowie durchgeführten histopathologischen Untersuchungen verglichen. Dabei konnte bei einem Empfänger, welcher eine Steroid-resistenten Abstoßung erlitt und bei welchem de novo DSA gemessen wurden, auch ein Anstieg der Spotzahl/Well im posttransplant durchgeführten Spender-spezifischen total-IgG ELISpot im Vergleich zum prätransplant durchgeführten ELISpot detektiert werden. Folglich korrelierten bei diesem Patienten die Ergebnisse des Spender-spezifischen total-IgG ELISpots mit den histopathologischen Ergebnissen und der Entwicklung der de novo DSA.

9.1 Etablierung des HBsAg-spezifischen total-IgG ELISpot

Im Experiment zur Etablierung eines HBsAg-spezifischen total-IgG ELISpot wurde gezeigt, dass zur Aktivierung von HBsAg-spezifischen B-Lymphozyten das HBsAg als alleiniger Stimulator ausreichte und keine weitere Costimulation von Nöten war. Die durchschnittliche Spotzahl/Well nach Stimulation der PBMCs mit HBsAg unterschied sich signifikant von der durchschnittlichen Spotzahl/Well der Negativkontrolle. Die Zugabe von Costimulatoren ergab nicht signifikant mehr Spots/Well im Vergleich zur alleinigen Stimulation mit HBsAg der PBMCs von den gegen Hepatitis-B geimpften Probanden.

Im HBsAg-spezifischen total-IgG ELISpot wurde das HBsAg in einer Konzentration von 2µg/ml verwendet. Eine andere Arbeitsgruppe verwendete in einem IFN-γ und IL-2 ELISpot bei 500.000 eingesetzten PBMCs/Well das HBsAg zur Stimulation in einer Konzentration von 5µg/Well (Leisner 2016), wiederum eine andere Arbeitsgruppe verwendete das HBsAg in einer Konzentration von 5µg/ml bei 100.000 PBMCs/Well im IFN-γ ELISpot (Bauer 2002). Bauer zeigte in ihrer Studie, dass das HBsAg durch seine partikuläre Form ein sehr immunogenes Antigen darstellt und bereits in einer niedrigen Konzentration (1µg/ml) eine Immunantwort bei T-Zellen induziert. Das Optimum für die Induktion einer Immunantwort bei T-Zellen durch HBsAg liegt bei 5- 10 µg/ml (Bauer 2002). Memory-B-Zellen benötigen zur Aktivierung geringere Konzentrationen des Antigens im Vergleich zu naiven B-Zellen (Plotkin et al. 2018).

Mit diesem Experiment wurde gezeigt, dass die alleinige Stimulation mit einer geringen Konzentration an HBsAg ausreichte, um HBsAg-spezifische B-Lymphozyten zu aktivieren und eine IgG-Produktion

auszulösen. Als nächstes folgte die Testvalidierung des HBsAg-spezifischen total-IgG ELISpot an gegen Hepatitis-B geimpften und ungeimpften Probanden.

9.2 Validierung des HBsAg-spezifischen total-IgG ELISpot

In der Validierung des HBsAg-spezifischen total-IgG ELISpot konnte gezeigt werden, dass der Assay verlässlich zwischen gegen Hepatitis-B geimpften und ungeimpften Probanden unterscheiden kann. Die durchschnittliche Spotzahl/Well im HBsAg-spezifischen Ansatz unterschied im HBsAg-spezifischen total-IgG ELISpot signifikant zwischen gegen Hepatitis-B Geimpften und Hepatitis-B Ungeimpften. Da sich auch die durchschnittliche Spotzahl/Well in der Negativkontrolle zwischen den beiden Gruppen unterschied, wurde die Δ -Spotzahl berechnet. Dabei wurde eine Differenz aus der Spotzahl des Ansatzes aus PBMCs mit HBsAg und der Spotzahl der Negativkontrolle berechnet. Auch die Δ -Spotzahlen der beiden Gruppen unterschieden sich dabei immer noch signifikant voneinander. Zwei der gegen Hepatitis-B geimpften Probanden zeigten nur eine geringe durchschnittliche Spotzahl/Well (Proband 11 und 14). Bei diesen beiden Probanden wurde in der retrospektiv durchgeführten Kontrolle ein unzureichender anti-HBsAg-Antikörpertiter festgestellt. Die Korrelation von Antikörpertiter mit der Anzahl von Memory-B-Zellen ist noch nicht geklärt. Manche Studien behaupten, dass es keine Korrelation zwischen Impftitern und Memory-B-Zellen gibt (Aman et al. 2007; Bauer und Jilg 2006), während andere Studien wiederum eine Korrelation von Impftiter und der Anzahl von Memory-B-Zellen zeigen (Crotty et al. 2003; Bernasconi N., Traggiai E., Lanzavecchia A.). Eine Studie mit Kindern beschreibt, dass sich die Anzahl HBsAg-spezifischer Memory B-Zellen bei Kindern mit niedrigem anti-HBsAg-Titer und bei Kindern mit ausreichendem Titer nicht unterscheidet (Rosado et al. 2011). Die niedrige Spotzahl/Well im HBsAg-spezifischen total-IgG ELISpot korrelierte in unserem Versuch mit dem niedrigen Impftiter der Probanden. Die kleinen Fallzahlen in der Etablierung (n= 5) und in der Validierung (n= 14) des HBsAg-spezifischen total-IgG ELISpot stellen eine Limitierung dar. Eine weitere Einschränkung ist der nicht untersuchte B-Zell Anteil an den isolierten PBMCs, welche im ELISpot eingesetzt wurden. Das HBsAg-spezifische ELISpot-Modell wurde nach gelungener Validierung auf das Spender-spezifische Modell übertragen.

9.3 Etablierung des Spender-spezifischen total-IgG ELISpot

Zur Etablierung des Spender-spezifischen total-IgG ELISpots wurden im Vorfeld mehrere Bestrahlungsversuche durchgeführt, um zu eruieren, welche Bestrahlungsdosis adäquat für den Spender-spezifischen total-IgG ELISpot sind. Für die Höhe der Bestrahlungsdosis wählten wir eine Dosis von 30Gy. Diese Art und Höhe der Bestrahlung wurde auch im „Standard Operating Protocol“ für den Donor Alloantigen-spezifischen Interferon- γ ELISpot Assay und von anderen Arbeitsgruppen zur Inaktivierung von Stimulatorzellen verwendet (Carroll et al. 2016; Kim et al. 2007; Gebauer et al. 2002; Nickel et al. 2004). In den von uns durchgeführten Versuchen zeigten aufgetaute PBMCs, welche mit 30Gy bestrahlt wurden, die geringste verbliebene Restaktivität im durchgeführten total-IgG ELISpot bei noch messbaren viablen Lymphozyten mittels FACS. Dementsprechend sollten im Spender-spezifischen total-IgG ELISpot zuvor gefrorene Spender-PBMCs eingesetzt werden, um die IgG-Produktion durch Spenderzellen weiter zu minimieren. Eine Arbeitsgruppe setzte in ihrem Donor-spezifischen IFN- γ ELISpot CD3-depletierte PBMCs ein, andere verwendeten PBMCs mit depletierten CD2+ T- und NK-Zellen, um eine IFN- γ Produktion von Seiten des Spenders auszuschließen (Presber 2005; Crespo et al. 2017). Eine mögliche Überlegung wäre es im Spender-spezifischen total-IgG ELISpot die B-Zellen des Spenders zu entfernen, sodass die gemessenen Spots ausschließlich vom Empfänger stammen können. Allerdings sind die B-Lymphozyten auch wichtige Antigenpräsentanten und somit für die Aktivierung von Spender-spezifischen B-Lymphozyten wichtig (Alegre et al. 2007; Zeng et al. 2014; Noorchashm et al. 2006). Zur Lösung dieses Problems verwendeten wir in unseren Versuchen die Δ -Spotzahl. Um auf die wahre durch aktivierte Empfängerzellen hervorgerufene Spotzahl zu kommen und um die möglicherweise durch verbliebene IgG-Restproduktion der inaktivierten Spenderzellen entstandenen Spots zu subtrahieren, errechneten wir die Δ -Spotzahl.

In der Etablierung wurde das Modell des Spender-spezifischen total-IgG ELISpots an gesunden, nicht transplantierten Probanden erprobt. Im Experiment zeigten sich bei der Stimulation der „Empfänger-Zellen“ durch PBMCs eines Probanden kaum Spots/Well. Am wahrscheinlichsten war eine fehlende Immunisierung gegenüber dem anderen Probanden der Grund für die geringe Spotzahl. Wurden jedoch Splenozyten als Stimulatorzellen eingesetzt, ließen sich bei beiden Probanden Spots detektieren. Vermutlich lag hier eine Immunisierung gegen bestimmte Splenozyten-Antigene vor. Somit konnte mit diesem Versuch die prinzipielle Machbarkeit der Methodik demonstriert werden. Es war möglich mit inaktivierten PBMCs spezifische B-Lymphozyten zu aktivieren, sodass diese sich in IgG-sezernierende PZ differenzierten. Die Spotzahlen waren in den Ansätzen mit aufgetauten Zellen um durchschnittlich 57% reduziert. Hier war bei Verwendung von aufgetauten PBMCs stets eine geringere Spotzahl/Well messbar. Eine Ursache hierfür könnte eine Zellschädigung im Rahmen des Einfrier- und

Auftauprozesses beispielsweise durch verbliebenes DMSO in der Zellsuspension sein, welches zytotoxisch wirkt (Robab Nazarpour et al. 2012). Basierend auf diesen Ergebnissen wurde beschlossen, sofern möglich, nur frisch isolierte Zellen als Empfängerzellen im ELISpot zu verwenden.

9.4 Validierung des Spender-spezifischen total-IgG ELISpot

Die Validierung des Spender-spezifischen total-IgG ELISpots erfolgte an 10 Empfängern einer Nierentransplantation. Sowohl in den prä-, als auch in den posttransplant durchgeführten Assays konnten Spots detektiert werden. Das bedeutet, dass der Spender-spezifische total-IgG ELISpot auch bei Immunsupprimierten angewandt werden und messbare Ergebnisse liefern kann. Die Spotzahlen waren jedoch im posttransplant durchgeführten ELISpot meist geringer (siehe Tabelle 8). Zwischen prä- und posttransplant gemessenen Spotzahlen gab es in der Negativkontrolle einen signifikanten Unterschied, auch der Unterschied im Spender-spezifischen Ansatz war signifikant. Die Spotzahlen der Positivkontrolle unterschieden sich nicht signifikant. Die niedrigeren Spotzahlen nach Transplantation könnten an einem prozentual geringeren B-Lymphozyten-Anteil an den isolierten PBMCs liegen und Folge der Immunsuppression sein. Hier zeigte sich, dass in Zukunft der Anteil der eingesetzten B-Lymphozyten für eine bessere Vergleichbarkeit der Werte prä- und posttransplant gemessen und vereinheitlicht werden sollte.

Bei zwei der zehn Patienten nahm die durchschnittliche Spotzahl/Well im Spender-spezifischen Ansatz posttransplant zu (Patient 3 und 4). Bei Patient 3 war der Anstieg dabei sehr deutlich. Patient 3 erlitt parallel zum Anstieg der Spotzahl im Spender-spezifischen Ansatz zwei Abstoßungsreaktionen, darunter war eine Steroid-resistent. Zusätzlich entwickelte Patient 3 de novo DSA. Der Anstieg der Spotzahl und Δ -Spotzahl des Spender-spezifischen Ansatzes ging mit dem klinischen Verlauf nach der Transplantation und mit dem Auftreten von de novo DSA einher. Das ließ vermuten, dass der Spender-spezifische total-IgG ELISpot im Stande war, eine vom Empfänger ausgehende Reaktivität gegen den Spender zu erfassen.

Bei Proband 4 war der Anstieg der Spotzahl hingegen nur sehr gering. Dieser Patient zeigte jedoch weder eine Abstoßungsreaktion, noch entwickelte er HLA-Antikörper. Der Grund für die höher gemessene Spotzahl posttransplant könnte an einem prozentual höheren B-Zell Anteil der Empfänger-PBMCs im posttransplant durchgeführten ELISpot im Vergleich zum prätransplant durchgeführten ELISpot liegen.

Insgesamt entwickelten drei der zehn Patienten eine Abstoßungsreaktion, welche sich im selben Zeitraum des ELISpot-Ansatzes ereignete (Patient 3, 6 und 8). Bei Patient 3 konnte die

Abstoßungsreaktion auch im Spender-spezifischen total-IgG ELISpot erfasst werden. Der Patient 6 erlitt eine humorale Abstoßung 20 Tage nach Transplantation und entwickelte DSA. Im ELISpot konnte zwar kein Anstieg der Spitzzahl im Spender-spezifischen Ansatz erfasst werden, die detektierten Spitzzahlen waren jedoch im Vergleich zu den anderen Patienten sehr hoch und zeigten damit eine hohe Reaktivität der Empfängerzellen gegen Spenderantigene bereits vor der Transplantation an. Möglicherweise lagen bei diesem Patienten schon prätransplant Spender-spezifische B-Lymphozyten mit einer hohen Spenderreaktivität vor, welche jedoch posttransplant nicht deutlich vermehrt und somit nicht eindeutig mittels ELISpot erfassbar waren. Die Abstoßungsreaktion von Patient 8 konnte im Spender-spezifischen total-IgG ELISpot nicht detektiert werden. Der Spender-spezifische total-IgG ELISpot war in der Lage eine von insgesamt 3 Abstoßungen zu detektieren. Patient 3 erlitt dabei jedoch die einzig Steroid-resistente, zelluläre Abstoßung und entwickelte de novo DSA.

Bei den Patienten 2,3 und 6 konnten im Verlauf nach der Transplantation de novo DSA und ein Anstieg der Δ -Spitzzahl bei Patient 2 und 3 im ELISpot detektiert werden. Dies weist auf eine Zunahme der Spender-spezifischen Memory-B-Zellen hin. Der Patient 6 zeigte im ELISpot sowohl vor als auch nach der Transplantation hohe Spitzzahlen.

Die Memory-B-Zellen spielen bei der zellulären Abstoßungsreaktion eine wichtige Rolle bei der Aktivierung der T-Lymphozyten und Stimulation der T-Lymphozyten zur Expansion (Alegre et al. 2007; Zeng et al. 2014; Noorchashm et al. 2006; Shiu und Dorling 2014; Ng et al. 2010). Die im ELISpot erfassten Spender-spezifischen B-Lymphozyten könnten hier auch wesentlich zur T-Zell Aktivierung, Expansion und somit zur stattgehabten zellulären Abstoßungsreaktion beigetragen haben. Der Spender-spezifische total-IgG ELISpot eignete sich daher auch zur Detektion einer zellulären Abstoßungsreaktion. Die detektierten Spender-spezifischen B-Lymphozyten zeigten insgesamt eine starke Spender-spezifische Immunisierung nach Transplantation mit Auftreten von de novo DSA und zellulärer Abstoßungsreaktion an.

Zusammenfassend lässt sich über den Spender-spezifischen total-IgG ELISpot sagen, dass der Anstieg der Spitzzahl im Spender-spezifischen Ansatz mit der schweren Steroid-resistenten Abstoßung und mit der Entstehung von de novo DSA von Patient 3 korrelierte. Die Fallzahl in der Validierung des Spender-spezifischen total-IgG ELISpot war jedoch sehr gering, um verlässliche Aussagen treffen zu können. Für eine bessere Aussagekraft sollte die Fallzahl erhöht werden und der Spender-spezifische total-IgG ELISpot sollte im Langzeit-Follow-up durchgeführt werden. Dadurch würde sich die Möglichkeit bieten, mehrere Abstoßungsreaktionen erfassen zu können und die Ergebnisse des ELISpots mit der Klinik der Patienten zu vergleichen. Außerdem ließen sich bei zeitlich aufeinander folgenden Spender-spezifischen total-IgG ELISpots die Dynamiken der Spitzzahlen eines Patienten besser beobachten.

9.5 Stellenwert des ELISpot-Assays

Der ELISpot stellt ein Verfahren mit hoher Sensitivität und Spezifität dar, um eine Zellaktivierung durch Zytokinsekretion auf Einzelzellniveau zu messen (Kouwenhoven et al. 2001; Dittrich und Lehmann 2012). ELISpot-Assays werden für das Monitoring Antigen-spezifischer Immunantworten in der Autoimmunitätsforschung, in der Transplantationsimmunologie, in der Tuberkulose Diagnostik, in der Krebsforschung und in der Vakzinentwicklung verwendet (Smith et al. 2003; Asai et al. 2002; Pelfrey et al. 2000; Pai und Behr 2016; Nickel et al. 2004). Zeigen zukünftige Studien, dass der Spender-spezifische total-IgG ELISpot sicher eine Reaktivität des Empfängers gegen den Spender detektieren kann, könnte er zum Immunomonitoring bei Transplantatempfängern eingesetzt werden. Hierbei würde der ELISpot einen Assay mit einem relativ geringen Arbeitsaufwand, mit einer hohen Sensitivität bei kleiner Zellmenge und mit einer einfachen Zellgewinnung durch eine periphere venöse Blutentnahme darstellen. Der Assay würde hierbei eine zelluläre B-Zell Testmethode darstellen und könnte vielleicht Donor-spezifische Memory-B-Zellen vor der Antikörperproduktion und Transplantatschädigung detektieren.

In dem von uns entwickelten Donor-spezifischen total-IgG ELISpot dienen bestrahlte Spender-PBMCs als Zielantigene. Die angebotenen Spender-PBMCs besitzen dabei die gesamten HLA-I, -II und nicht-HLA Antigene des Spenders. Dieser Assay bietet somit im Vergleich zu anderen Assays ein sehr breites Spektrum an Zielantigenen an (Zachary et al. 2007b; Mulder et al. 2003; Heidt et al. 2012; Karahan et al. 2015; Lúcia et al. 2015b). Durch dieses breite Repertoire können Donor-spezifischen B-Lymphozyten mittels ELISpot detektiert und quantifiziert werden. Dieser Assay ist nicht abhängig von synthetischen HLA-Molekülen und damit nicht auf spezielle HLA-Moleküle beschränkt, wie andere Assays (Zachary et al. 2007a; Mulder et al. 2003; Lúcia et al. 2015b; Karahan et al. 2015; Heidt et al. 2012; Zachary et al. 2007b). Zachary et al. entwickelten einen Assay, anhand dessen sie HLA-spezifische B-Zellen identifizieren konnten. Dazu inkubierten sie isolierte B-Lymphozyten mit verschiedenen synthetischen HLA-Tetrameren, welche an ein fluoreszenz-markiertes Streptavidin-Molekül gebunden waren. Die Tetramer-positiven B-Lymphozyten konnten anschließend mittels Flowzytometrie detektiert und in ihre Subklassen eingeordnet werden (Zachary et al. 2007b; Zachary et al. 2007c).

Unser Spender-spezifischer total-IgG ELISpot bietet auch die Möglichkeit nicht-HLA-spezifische B-Lymphozyten zu detektieren. Nicht-HLA-Antikörper spielen in der Transplantationsmedizin eine immer bedeutendere Rolle und es ist somit wichtig, einen Assay zu entwickeln, der auch diese Gruppe von Donor-spezifischen B-Lymphozyten erfassen kann (Sumitran-Holgersson et al. 2002; Mizutani et al. 2005). Karahan et al. entwickelten einen ELISpot, der ein sehr breites Spektrum an Donorantigenen

abdeckt. Der Assay ist im Stande Donor-spezifische Memory-B-Zellen anhand von Zelllysaten zu quantifizieren. Die Zelllysate umfassen das gesamte HLA-I und -II Repertoire eines Individuums. In diesem ELISpot diente das HLA-beinhaltende Zelllysate als Detektionsmatrix für HLA-I- und HLA-II-spezifische B-Lymphozyten. Die ELISpot Platten wurden mit anti-IgG-Antikörpern beschichtet. Polyklonal aktivierte B-Lymphozyten sezernierten Antikörper, welche auf der Platte gebunden wurden. Anschließend wurde entweder HLA-I oder HLA-II Zelllysate auf die Platte gegeben. Zur Detektion von HLA-I- oder HLA-II-spezifischen B-Lymphozyten wurden HRP konjugierte Beta2-Mikroglobulin-Antikörper für HLA-I spezifische B-Lymphozyten oder IgG2b-Antikörper für HLA-II spezifische B-Lymphozyten dazu gegeben. Durch Hinzufügen des Substrates konnten HLA-I oder -II – spezifische B-Lymphozyten sichtbar gemacht werden (Karahan et al. 2017). Mit diesem Assay kann ein Großteil der Donor-spezifischen-Memory-B-Zellen erfasst werden, allerdings werden keine nicht-HLA-spezifischen B-Lymphozyten erfasst.

Lúcia et al. entwickelten einen HLA-spezifischen B-Zell ELISpot. Mit diesem Assay konnten HLA-I und -II spezifische Memory B-Lymphozyten detektiert werden. Dazu wurden auf eine mit anti-IgG beschichtete ELISpot Platte stimulierte B-Lymphozyten gegeben, welche Antikörper sezernierten. Anschließend wurden mit Fluoreszenzfarbstoff markierte synthetische HLA-I und -II Moleküle hinzugegeben. Die HLA-spezifischen B-Lymphozyten konnten somit visualisiert und quantifiziert werden (Lúcia et al. 2015a).

Lynch et al. versuchten die synthetisch produzierten und somit begrenzt verfügbaren HLA- Moleküle zu umgehen und setzten Fibroblasten als Antigenpräsentanten ein. Die Fibroblasten repräsentieren das gesamte Spektrum der HLA-I Moleküle des Donors. Dazu führten sie Nierentransplantationen an Mäusen durch, untersuchten sie prä- und posttransplant auf HLA-Antikörper und führten posttransplant einen ELISpot mit Fibroblasten als Zielantigene durch. Dabei wurden die Donor-Fibroblasten auf die ELISpot Membran aufgetragen. Stimulierte Empfänger-B-Lymphozyten schütteten Antikörper aus. HLA-I-spezifische Antikörper konnten an die Fibroblasten binden. Sezernierte Antikörper, welche an die Fibroblasten gebunden waren, konnten mit anti-IgG konjugiert mit Alkalischer Phosphatase nach Zugabe von Substrat als Spots sichtbar gemacht werden (Lynch et al. 2013). Durch diesen Assay erreichte Lynch alle HLA-I spezifischen B-Lymphozyten zu detektieren. Jedoch ist die Fibroblastenpräparation ein sehr aufwändiges und somit für den klinischen Alltag nicht einfach praktikables Verfahren.

9.6 Limitationen des Spender- und HBsAg-spezifischen total-IgG ELISpots

9.6.1 Cut off Wert der Negativkontrolle

Im HBsAg-spezifischen oder auch im Spender-spezifischen total-IgG ELISpot sollten sich theoretisch nur diejenigen Memory-B-Zellen zu IgG-sezernierenden Plasmazellen verwandeln, welche HBsAg-spezifisch oder Spender-spezifisch waren. Da jedoch auch in der Negativkontrolle, das heißt in den Ansätzen, bei denen die isolierten PBMCs keine Stimulation erhielten, auch Spots detektiert wurden, muss man davon ausgehen, dass die detektierten Spots im HBsAg-spezifischen oder Spender-spezifischen Ansatz im ELISpot nicht nur von HBsAg-spezifischen oder Spender-spezifischen Plasmazellen stammten. Eine Theorie für die detektierten Spots in der Negativkontrolle ist, dass es sich hierbei um Plasmazellen handelte, welche im peripheren Blut zirkulierten und die im Rahmen des ELISpot Assays weiter IgGs sezernierten. Diese zirkulierenden Plasmazellen konnten während der PBMC-Isolation nicht entfernt werden, sondern waren Bestandteil der eingesetzten PBMCs. Im ELISpot fielen sie dann durch eine IgG-Produktion ohne jegliche Stimulation auf. Die Negativkontrolle wies somit auch große Schwankungen zwischen einzelnen Individuen und auch tagesabhängige Schwankungen desselben Probanden auf. Somit war es nicht möglich einen Cut-off Wert für die Negativkontrolle festzulegen.

9.6.2 Variabilität der Spotzahlen

Ein Problem des ELISpot-Assays war die gemessene Variabilität der Spotzahlen zwischen den einzelnen Ansätzen eines Probanden. In den durchgeführten Versuchen wurden von jedem Ansatz jeweils ein Triplet der Positivkontrolle, der Negativkontrolle und des Spender- oder HBsAg-spezifischen Ansatzes angesetzt. Alle drei Wells desselben Versuchsansatzes, beispielsweise PBMCs mit IL-2 und R848 eines Probanden, wiesen unterschiedliche Spots pro Well auf. Trotz sorgfältigem Arbeiten konnte die Schwankungsbreite der Spotzahlen nicht verringert werden. Die Schwankungen der Spotzahlen/Well in dieser Arbeit sind dabei mit den Schwankungen der Spotzahlen/Well bei anderen Arbeitsgruppen vergleichbar (Bonsignori und Moody 2012; Heidt et al. 2012). Durch das Ansetzen eines Triplets konnte der Mittelwert der drei Ansätze errechnet und somit eine Annäherung an die wahre Spotzahl/Well gemacht werden. Um eine noch genauere Annäherung an die wahre Spotzahl/Well zu erreichen, müssten noch größere Ansätze durchgeführt werden.

9.6.3 Limitationen in der Auswertung der ELISpot-Platten

Die Auswertung der ELISpot-Platten stellte sich auch als sehr subjektiv dar und macht eine Vergleichbarkeit der Ergebnisse zwischen verschiedenen Laboren schwierig. Die Einstellungen bezüglich Spotgröße und Spottrennbarkeit sind nicht standardisiert und lassen eine benutzerdefinierte Analyse zu. Ein wichtiges Kriterium ist dabei vor allem die Spotgröße. In der Auswertung müssen dafür

„Minimum“ und „Maximum“ der Spotgröße im ELISpot-Reader definiert werden. Je größer die Spannbreite ist, desto mehr Spots werden vom Gerät als Spots gezählt, obwohl es sich dabei vielleicht nicht um richtige Spots, sondern nur um Artefakte handelte. Ein richtiger Spot ist durch ein dunkles Zentrum mit einem helleren Ring nach außen gekennzeichnet, welcher durch die Diffusion der Immunglobuline von der sezernierenden Zelle hervorgerufen wird. Ziel ist es, dass der ELISpot-Reader nur solche gut definierten Spots als Spots zählt. Diese ausschlaggebenden Einstellungen sind durch den Benutzer definierbar und erlauben dadurch eine sehr subjektive Analyse.

9.6.4 Limitationen des Spender-spezifischen total-IgG ELISpot

Der Spender-spezifische total-IgG ELISpot-Assay weist einige Limitationen auf. Unter anderem ist der Phänotyp der Zellen nicht bestimmbar, eine Abgrenzung von Subpopulationen oder Messung von anderen Zytokinen oder Oberflächenmarkern ist nicht möglich.

9.6.4.1 Limitationen des Testansatzes

Eine weitere Limitierung unseres total-IgG ELISpots ist es, dass immer die gleiche Anzahl an PBMCs/Well eingesetzt wurde. Jedoch wurde der B-Zell Anteil der isolierten PBMCs nie gemessen. Dementsprechend gibt es keine Auskunft darüber, wie stark der B-Zell Anteil zwischen den Probanden, aber auch der B-Zell Anteil eines Probanden zu verschiedenen Messzeitpunkten, vor allem unter Immunsuppression oder während einer Infektion, schwankt (Thorley et al. 1977; Janas-Boratynska und Szewczyk 1979). Der nicht erfasste B-Zell Anteil an den PBMCs könnte zusätzlich eine Ursache für die schwankenden Spotzahlen/Well der verschiedenen Versuche sein. Eine Verbesserungsmöglichkeit wäre es daher, den B-Zell Anteil vor jedem ELISpot-Ansatz zu messen und für jeden Versuch eine einheitliche B-Zell Anzahl/Well zu verwenden, um die Ergebnisse noch besser miteinander vergleichbar zu machen. Vor allem während einer immunsuppressiven Therapie, z.B. nach Transplantation, kann es zu starken Schwankungen des Lymphozytenanteils und damit auch der B-Lymphozyten kommen (van de Berg et al. 2012). Somit würden bei einem posttransplant reduziertem B-Zell Anteil der isolierten PBMCs des Empfängers weniger Spots gemessen werden, obwohl vielleicht die Anzahl der Spender-spezifischen Memory-B-Zellen gestiegen ist. Das bedeutet, dass die Ergebnisse des Assays durch einen schwankenden B-Zell Anteil falsch interpretiert werden könnten.

9.6.4.2 Limitationen der Δ -Spotzahl

In manchen Fällen war zwar die Δ -Spotzahl posttransplant größer als prätransplant, aber die Spotzahl des Spender-spezifischen Ansatzes war posttransplant kleiner als prätransplant. Hierbei waren in den Negativkontrollen hohe Spotzahlen zu messen (Patient 1, 2 und 10). Die Negativkontrolle war in manchen Fällen sogar höher als der Stimulationsansatz (siehe Tabelle 6 und 8). Es ist nicht ganz klar, wie es zu einer höher gemessenen Spotzahl/Well in der Negativkontrolle im Vergleich zum Stimulationsansatz kommen konnte. Eine Erklärung könnte sein, dass die Stimulation die

Immunglobulin-Produktion inhibierte. Eine Ursache könnten aber auch regulatorische B-Zellen sein, welche durch ihre IL-10-Produktion eine Immunantwort und IgG-Produktion unterdrücken (Yanaba et al. 2009; Rosser und Mauri 2015; Dooley et al. 2018).

Allerdings traten in den Versuchen mit Kadaverspenden und somit im ELISpot eingesetzten Splenozyten als Spenderzellen nie negative Δ -Spotzahlen auf. In diesen Ansätzen war stets die Spotzahl/Well im Ansatz Empfänger-PBMCs mit inaktivierten Spender-Splenozyten höher als die Spotzahl/Well in der Negativkontrolle. Zusätzlich traten bei den Lebendspenden häufiger prätransplant als nach der Transplantation negative Δ -Spotzahlen auf. In den Ansätzen prätransplant kam es bei 5 Patienten von insgesamt 6 Lebendspenden zu negativen Δ -Spotzahlen, posttransplant bei 3 von 6 Lebendspenden. Betrachtet man all diese Faktoren, lässt sich zusammenfassend sagen, dass v.a. in den Ansätzen mit frisch isolierten Spender-PBMCs negative Δ -Spotzahlen auftraten und somit in der Negativkontrolle höhere Spotzahlen/Well messbar waren als im Ansatz Empfängerzellen mit Spenderzellen. Wurden aufgetaute Spenderzellen eingesetzt, kam es seltener zu negativen Δ -Spotzahlen. In den Versuchen mit eingesetzten Splenozyten kam es nie zu negativen Δ -Spotzahlen. Dementsprechend kann man vermuten, dass aufgetaute PBMCs oder Splenozyten nur wenig inhibitorische Effekte auf die Empfängerzellen ausüben und somit eine höhere IgG-Produktion erreicht wird.

9.6.4.3 Bestrahlung

Ein anderer Störfaktor war die Bestrahlung der PBMCs. Auch bei einer Bestrahlungsdosis von 30Gy konnte die IgG-Produktion nicht vollständig unterdrückt werden, sodass man davon ausgehen muss, dass im Spender-spezifischen total-IgG-ELISpot im Ansatz Empfänger-PBMCs mit inaktivierten Spender-PBMCs auch einige Spots von den nicht vollständig inaktivierten Spender-PBMCs stammen könnten. Im ELISpot-Assay ist es nicht möglich, die detektierten Spots den jeweiligen PBMCs zuzuordnen.

9.7 Klinische Relevanz

Die ersten Ergebnisse des Spender-spezifischen total-IgG ELISpots zeigten, dass der Assay an immunsupprimierten Transplantationspatienten angewandt werden kann. Der Anstieg der Spotzahl im Spender-spezifischen Ansatz, welcher mit der Steroid-resistenten Abstoßung und dem Auftreten von de novo DSA einherging, lässt annehmen, dass der von uns entwickelte Assay in der Lage ist, eine Reaktivität gegen den Spender zu erfassen. Um diese Annahme jedoch zu verifizieren, muss der Assay jedoch erst an einer größeren Gruppe von Transplantationspatienten erprobt werden.

Gelingt es mit den Spender-spezifischen total-IgG ELISpot frühzeitig eine Abstoßungsreaktion vorherzusagen, würde er für die Patienten viele Vorteile bringen. Vor allem für Lebendnierenspenden wäre der Test von Interesse. Er könnte bereits vor der Transplantation eingesetzt werden, um eine HLA-Ak negative B-Zell Immunität auch bei negativen HLA-Ak Screening Ergebnissen mittels Luminex detektieren zu können. Dabei würden Spender-HLA-spezifische, aber auch Spender-nicht-HLA-spezifische Memory-B-Zellen erfasst werden können. So könnten Patienten identifiziert werden, welche ein erhöhtes Risiko haben das Transplantat abzustößen. Nach der Transplantation könnte der Test zu mehreren Zeitpunkten zum Immunomonitoring durchgeführt werden, um eine beginnende Abstoßungsreaktion frühzeitig, möglicherweise bereits vor der Produktion von Ak, erfassen zu können.

Der Einsatz des Spender-spezifischen total-IgG ELISpots wäre für den Patienten und bei Lebendspenden auch für den Organspender mit sehr geringen Unannehmlichkeiten durch eine einfache periphere venöse Blutentnahme verbunden.

Es sollte untersucht werden, welchen Einfluss die immunsuppressive Therapie auf den Spender-spezifischen total-IgG ELISpot hat. Nächste Studien sollten dann erörtern, ob die Anpassung der Immunsuppressiva anhand der Spender-spezifischen total-IgG ELISpot-Messungen einen klinischen Benefit für die Patienten bringt.

9.8 Fazit

Um den Spender-spezifischen total-IgG ELISpot für weitere Versuche und klinische Fragestellungen zu optimieren, sollten folgende Abänderungen und Modifikationen beachtet werden:

- Die Fallzahlen in der Etablierung und Validierung sollten erhöht werden.
- Der Anteil der B-Lymphozyten an den isolierten Empfänger-PBMCs sollte gemessen und vereinheitlicht werden.
- Der Anteil der B-Lymphozyten an den isolierten Spender-PBMCs sollte gemessen und vereinheitlicht werden.
- Um eine eindeutige Zuordnung der Spots im Spender-spezifischen total-IgG ELISpot zu ermöglichen, sollte eine B-Zell-Depletion in der PBMC-Probe des Spenders erfolgen.

- Die Ansätze jedes Versuches sollten erhöht werden, um den Fehler zu reduzieren.
- Der Einfluss von Immunsuppressive auf die Ergebnisse im Spender-spezifische IgG-ELISpot sollten untersucht werden.
- Der Spender-spezifische total-IgG ELISpot sollte im Langzeit-Follow-up eingesetzt werden, um Dynamiken der Spotzahl mit der Klinik des Patienten vergleichen und dabei Korrelationen feststellen zu können.
- Der Spender-spezifische total-IgG ELISpot sollte an mehreren Transplantationspatienten durchgeführt werden, damit die Möglichkeit besteht, mehrere Abstoßungen zu erfassen.

10 Ausblick

Die ersten Ergebnisse des Spender-spezifischen total-IgG ELISpot zeigten bereits richtungsweisend, dass der Assay in der Lage ist, eine Abstoßungsreaktion zu erfassen. Der von uns entwickelte Spender-spezifische total-IgG ELISpot weist im Vergleich zu den genannten anderen Assays mehrere Vorteile auf. Zum einen ist unser Assay mit einem geringen Arbeitsaufwand verbunden. Des Weiteren stellt er für den Patienten keine große Belastung oder Risiko dar, wie etwa die Nierenbiopsie. Die venöse Blutentnahme aus einer peripheren Vene gilt als nicht-invasive Technik und bereitet dem Patienten sehr wenig Unannehmlichkeiten. Die benötigten Empfänger-PBMCs können in großer Menge durch die einfache venöse Blutentnahme, die jederzeit durchführbar ist, gewonnen werden. Außerdem kann die venöse Blutentnahme auch in kurz aufeinander folgenden Zeitpunkten wiederholt werden, ohne dass dem Patienten, oder dem Transplantat wie bei der Nierenbiopsie, geschadet wird. Diese Eigenschaften stellen bereits eine gute Voraussetzung für ein Immunmonitoring dar. Der Spender-spezifische total-IgG ELISpot stellt eine zelluläre B-Zell Testmethode dar. Durch ihn könnten frühzeitig Spender-spezifische Memory-B-Zellen detektiert werden. Das bedeutet, dass eine Spenderreaktivität des Empfängers bereits vor der Bildung von DSA und Transplantatschädigung erfasst werden könnte. Außerdem können mit dem Spender-spezifischen total-IgG ELISpot eventuell falsch negative Testergebnisse der Luminex-Testmethode erfasst werden: kommt es nämlich zu einer Antikörperabsorption im Transplantat, so können mittels Luminex keine zirkulierenden DSA erfasst werden. Mit dem ELISpot könnten aber weiterhin Spender-spezifische Memory-B-Zellen detektiert werden. Unser Assay bietet zudem als einziger unter den oben genannten Assays das breiteste Spektrum an Donorantigenen, durch welche Empfängerzellen aktiviert werden können. Somit könnten mit dem Spender-spezifischen total-IgG ELISpot auch am meisten Spender-spezifische Memory-B-Zellen detektiert und quantifiziert werden.

Jedoch wurde der ELISpot bisher nur an einer kleinen Anzahl nierentransplantierter Patienten und nur über einen kurzen Zeitraum erprobt. Als nächstes sollte der Spender-spezifische total-IgG ELISpot an einer größeren Gruppe von Transplantatempfängern über einen längeren Zeitraum hinweg zum Immunomonitoring nach Transplantation getestet werden. Dabei sollte analysiert werden, ob die Ergebnisse des Spender-spezifischen total-IgG ELISpots signifikant mit den klinischen Werten der Patienten, der routinemäßigen Messung von DSA und der Transplantatfunktion korrelieren.

Zeigen zukünftige Studien, dass der Spender-spezifische total-IgG ELISpot sicher eine Reaktivität des Empfängers gegen den Spender detektieren kann, so könnte er bei Lebendspenden auch zur Risikostratifizierung vor der Transplantation eingesetzt werden. Mit dem Spender-spezifischen total-

Ausblick

IgG ELISpot könnten prätransplant Patienten mit einem hohen Risiko einer Abstoßungsreaktion identifiziert und eine bessere Spenderauswahl ermöglicht werden.

Erweist sich der Spender-spezifische total-IgG ELISpot als zuverlässig frühzeitig Abstoßungsreaktionen zu detektieren, könnte er zusammen mit dem Spender-spezifischen IFN- γ release ELISpot zum Immunomonitoring nach Transplantation eingesetzt werden. Möglicherweise könnte anhand der Ergebnisse dieser beiden Assays die immunsuppressive Therapie der Transplantatempfänger angepasst werden, sodass die Patienten von einer individualisierten Immuntherapie profitieren würden.

11 Abstrakt

Hintergrund: Das Kurzzeitüberleben nach Organtransplantation ist bereits gut, doch das Langzeitüberleben ist trotz optimierter immunsuppressiver Therapien und individualisierter Nachsorge noch nicht zufriedenstellend. Donor-spezifische Memory-B-Zellen scheinen in der akuten und chronischen Abstoßungsreaktion eine wichtige Rolle zu spielen. Bisher gibt es jedoch keinen geeigneten Assay, welcher in der Lage ist, Donor-spezifischen Memory-B-Zellen des Empfängers zu identifizieren und quantifizieren.

Zielstellung: Das Ziel dieser Arbeit ist die Etablierung eines Donor-spezifischen total-IgG ELISpots. Um diesen Spender-spezifischen Assay zu entwickeln, arbeitete ich anfangs mit dem Modell der Hepatitis-B Immunität bei geimpften und ungeimpften freiwilligen Probanden. Der HBsAg-spezifische total-IgG ELISpot sollte zwischen der B-Zell Reaktivität auf HBs-Antigen (HBs-Ag) von Hepatitis-B Geimpften und – Ungeimpften unterscheiden können.

Methodik: Zur Etablierung des HBsAg-spezifischen ELISpot wurden PMBCs von Geimpften und Ungeimpften in einem total-IgG ELISpot eingesetzt. Anstatt einer globalen Stimulation aller B-Zellen sollten nur HBsAg spezifische Zellen durch eine spezifische Stimulation mit HBsAg aktiviert werden. Die aktivierten HBsAg-spezifischen Zellen konnten durch ihre IgG-Ausschüttung detektiert werden. Zur Validierung des Spender-spezifischen total-IgG ELISpot wurden PBMCs von 10 Nierentransplantierten isoliert und mit bestrahlten Spender-PBMCs stimuliert. Der total-IgG ELISpot wurde vor und zwei Wochen nach der Transplantation durchgeführt.

Ergebnisse: Im HBsAg-spezifischen total-IgG ELISpot konnte ein signifikanter Unterschied zwischen der Spotzahl und der Δ -Spotzahl von Geimpften und Umgeimpften festgestellt werden ($p \leq 0,05$). Im Spender-spezifischen total-IgG ELISpot kam es bei 8 von 10 Patienten zu einer Abnahme der Spotzahl nach Transplantation. Bei einem Patienten kam es zu einer deutlichen Zunahme der Spotzahl posttransplant. Der Anstieg der Spotzahl ereignete sich bei diesem Patienten zeitgleich mit einer Steroid-resistenten Abstoßung (Banff4IIa) und der Detektion von de novo DSA.

Fazit: Der HBsAg-spezifische total-IgG ELISpot konnte erfolgreich zwischen gegen Hepatitis-B-Geimpften und - Ungeimpften unterscheiden. Dies zeigt die prinzipielle Machbarkeit der Methode. Die Ergebnisse des Spender-spezifischen total-IgG ELISpot zeigen richtungsweisend, dass der Assay in der Lage ist Spender-spezifische Memory-B-Zellen zu detektieren. Vor dem Einsatz des Spender-spezifischen total-IgG ELISpot zum Immunomonitoring nach Transplantation sollten jedoch methodische Verbesserungen vorgenommen und an einer größeren Patientengruppe getestet werden.

12 Abbildungs- und Tabellenverzeichnis

Abbildung 1: Neubauer Zählkammer.	36
Abbildung 2: Schematischer Aufbau des total- IgG- ELISpots.....	38
Abbildung 3: Gescannte total- IgG ELISpot- Platte mit zugehörigem Belegschemata.	44
Abbildung 4: Versuchsaufbau der Testetablierung des HBsAg- spezifischen total- IgG ELISpots.	48
Abbildung 5: Ergebnisse der Testetablierung des HBsAg- spezifischen total- IgG ELISpot.	48
Abbildung 6: Testetablierung des HBsAg- spezifischen total- IgG ELISpot.....	50
Abbildung 7: Schematischer Versuchsaufbau der Testvalidierung des HBsAg- spezifischen total- IgG ELISpots.	51
Abbildung 8: Ergebnisse der Testvalidierung des HBsAg- spezifischen total- IgG ELISpot.	52
Abbildung 9: Gegenüberstellung der HBsAg- Spotzahl und der Δ - HBsAg Spotzahl von Geimpften und Ungeimpften.	53
Abbildung 10: Grafische Darstellung der Ergebnisse des total- IgG ELISpot mit frischen und aufgetauten bestrahlten PBMCs.	57
Abbildung 11: Versuchsaufbau der Testvalidierung des Spender- spezifischen total- IgG ELISpot.	60
Abbildung 12: Validierung des Spender- spezifischen total- IgG ELISpots.	62
Abbildung 13: Δ - Spotzahl des Spender- spezifischen total- IgG ELISpot prä- und posttransplant.	64
Abbildung 14: Darstellung der Δ - Spotzahl des Spender- spezifischen total- IgG ELISpot prä- und posttransplant	64
Tabelle 1: Ergebnisse der Testetablierung des HBsAg- spezifischen total- IgG ELISpot.	49
Tabelle 2: Ergebnisse der Testvalidierung des total- IgG ELISpots.....	51
Tabelle 3: Erster Gy- Bestrahlungsversuch mit Viabilitätsprüfung mittels FACS- Analyse.	55
Tabelle 4: Zweiter Gy- Bestrahlungsversuch mit Viabilitätsprüfung mittels FACS- Analyse.	56
Tabelle 5: Testetablierung des Spender- spezifischen total- IgG ELISpot.	59
Tabelle 6: Überblick über die eingeschlossenen Nierentransplantatempfänger	61
Tabelle 7: Validierung des Spender- spezifischen total- IgG ELISpot	62

13 Literaturverzeichnis

Abecassis, Michael; Bartlett, Stephen T.; Collins, Allan J.; Davis, Connie L.; Delmonico, Francis L.; Friedewald, John J. et al. (2008): Kidney transplantation as primary therapy for end-stage renal disease: a National Kidney Foundation/Kidney Disease Outcomes Quality Initiative (NKF/KDOQITM) conference. In: *Clinical journal of the American Society of Nephrology : CJASN* 3 (2), S. 471–480. DOI: 10.2215/CJN.05021107.

Ada, Gordon (2001): Vaccines and Vaccination. In: *N Engl J Med* 345 (14), S. 1042–1053. DOI: 10.1056/NEJMra011223.

Aguilera, Isabel; Alvarez-Marquez, Antonia; Gentil, Miguel Angel; Fernandez-Alonso, Jorge; Fijo, Julia; Saez, Carmen et al. (2008): Anti-glutathione S-transferase T1 antibody-mediated rejection in C4d-positive renal allograft recipients. In: *Nephrology, dialysis, transplantation : official publication of the European Dialysis and Transplant Association - European Renal Association* 23 (7), S. 2393–2398. DOI: 10.1093/ndt/gfm955.

Ahmed, R.; Gray, D. (1996): Immunological memory and protective immunity: understanding their relation. In: *Science (New York, N.Y.)* 272 (5258), S. 54–60.

Aird, William C. (2007a): Phenotypic heterogeneity of the endothelium: I. Structure, function, and mechanisms. In: *Circulation research* 100 (2), S. 158–173. DOI: 10.1161/01.RES.0000255691.76142.4a.

Aird, William C. (2007b): Phenotypic heterogeneity of the endothelium: II. Representative vascular beds. In: *Circulation research* 100 (2), S. 174–190. DOI: 10.1161/01.RES.0000255690.03436.ae.

Akashi, K.; Kondo, M.; Cheshier, S.; Shizuru, J.; Gandy, K.; Domen, J. et al. (1999): Lymphoid development from stem cells and the common lymphocyte progenitors. In: *Cold Spring Harbor symposia on quantitative biology* 64, S. 1–12.

Akiyoshi, Takurin; Hirohashi, Tsutomu; Alessandrini, Alessandro; Chase, Catherine M.; Farkash, Evan A.; Smith, R. Neal et al. (2012): Role of complement and NK cells in antibody mediated rejection. In: *Human immunology* 73 (12), S. 1226–1232. DOI: 10.1016/j.humimm.2012.07.330.

Alegre, Maria-Luisa; Florquin, Sandrine; Goldman, Michel (2007): Cellular mechanisms underlying acute graft rejection: time for reassessment. In: *Current opinion in immunology* 19 (5), S. 563–568. DOI: 10.1016/j.coi.2007.07.019.

Amanna, Ian J.; Carlson, Nichole E.; Slifka, Mark K. (2007): Duration of humoral immunity to common viral and vaccine antigens. In: *N Engl J Med* 357 (19), S. 1903–1915. DOI: 10.1056/NEJMoa066092.

Arakelov, A.; Lakkis, F. G. (2000): The alloimmune response and effector mechanisms of allograft rejection. In: *Seminars in nephrology* 20 (2), S. 95–102.

Asai, Tadao; Storkus, Walter J.; Mueller-Berghaus, Jan; Knapp, William; DeLeo, Albert B.; Chikamatsu, Kazuaki; Whiteside, Theresa L. (2002): In vitro generated cytolytic T lymphocytes reactive against head and neck cancer recognize multiple epitopes presented by HLA-A2, including peptides derived from the p53 and MDM-2 proteins. In: *Cancer immunity* 2, S. 3.

Auchincloss, H., JR; Lee, R.; Shea, S.; Markowitz, J. S.; Grusby, M. J.; Glimcher, L. H. (1993): The role of "indirect" recognition in initiating rejection of skin grafts from major histocompatibility complex class II-deficient mice. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 90 (8), S. 3373–3377.

Baker, R. J.; Hernandez-Fuentes, M. P.; Brookes, P. A.; Chaudhry, A. N.; Cook, H. T.; Lechler, R. I. (2001): Loss of direct and maintenance of indirect alloresponses in renal allograft recipients: implications for the pathogenesis of chronic allograft nephropathy. In: *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 167 (12), S. 7199–7206.

Bates, Ruth L.; Frampton, Geoffrey; Rose, Marlene L.; Murphy, John J. (2003): High diversity of non-human leukocyte antigens in transplant-associated coronary artery disease. In: *Transplantation* 75 (8), S. 1347–1350. DOI: 10.1097/01.TP.0000061790.08550.EC.

Bauer, Tanja (2002): Untersuchung der zellulären Immunantwort nach Impfung gegen das Hepatitis B Virus, zuletzt geprüft am 16.09.2018.

Bauer, Tanja; Jilg, Wolfgang (2006): Hepatitis B surface antigen-specific T and B cell memory in individuals who had lost protective antibodies after hepatitis B vaccination. In: *Vaccine* 24 (5), S. 572–577. DOI: 10.1016/j.vaccine.2005.08.058.

Bedi, Damanpreet S.; Riella, Leonardo V.; Tullius, Stefan G.; Chandraker, Anil (2010): Animal models of chronic allograft injury: contributions and limitations to understanding the mechanism of long-term graft dysfunction. United States.

Behrend, M. (2001): Adverse gastrointestinal effects of mycophenolate mofetil: aetiology, incidence and management. In: *Drug safety* 24 (9), S. 645–663.

Bellamy, C. O. C.; Herriot, M. M.; Harrison, D. J.; Bathgate, A. J. (2007): C4d immunopositivity is uncommon in ABO-compatible liver allografts, but correlates partially with lymphocytotoxic antibody status. In: *Histopathology* 50 (6), S. 739–749. DOI: 10.1111/j.1365-2559.2007.02677.x.

Benichou, Gilles; Yamada, Yohei; Yun, Seok-Hyun; Lin, Charles; Fray, Michael; Tocco, Georges (2011): Immune recognition and rejection of allogeneic skin grafts. In: *Immunotherapy* 3 (6), S. 757–770. DOI: 10.2217/imt.11.2.

Benichou G, Takizawa PA, Olson CA, Mcmillan M, Sercarz EE. (1992): Donor major histocompatibility complex (MHC) peptides are presented by recipient MHC molecules during graft rejection. In: *The Journal of experimental medicine* 175 (1), S. 305–308.

Berek, C.; Berger, A.; Apel, M. (1991): Maturation of the immune response in germinal centers. In: *Cell* 67 (6), S. 1121–1129.

Berek, C.; Ziegner, M. (1993): The maturation of the immune response. In: *Immunology today* 14 (8), S. 400–404. DOI: 10.1016/0167-5699(93)90143-9.

Berkowitz, N.; Braunstein, N. S. (1992): T cell responses specific for subregions of allogeneic MHC molecules. In: *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 148 (2), S. 309–317.

Bernasconi N., Traggiai E., Lanzavecchia A.: Maintenance of Serological Memory by Polyclonal Activation of Human Memory B Cells, zuletzt geprüft am 02.01.2017.

Bestard, O.; Crespo, E.; Stein, M.; Lucia, M.; Roelen, D. L.; Vaal, Y. J. de et al. (2013): Cross-validation of IFN-gamma Elispot assay for measuring alloreactive memory/effector T cell responses in renal

transplant recipients. In: *American journal of transplantation : official journal of the American Society of Transplantation and the American Society of Transplant Surgeons* 13 (7), S. 1880–1890. DOI: 10.1111/ajt.12285.

Black, Francis L.; Rosen, Leon (1962): Patterns of Measles Antibodies in Residents of Tahiti and Their Stability in the Absence of Re-Exposure. In: *J. Immunol.* 88 (6), S. 725.

Boilson, Barry A.; Raichlin, Eugenia; Park, Soon J.; Kushwaha, Sudhir S. (2010): Device therapy and cardiac transplantation for end-stage heart failure. In: *Current problems in cardiology* 35 (1), S. 8–64. DOI: 10.1016/j.cpcardiol.2009.09.001.

Bonsignori, Mattia; Moody, M. Anthony (2012): Simultaneous Detection of Antigen-Specific IgG- and IgM-Secreting Cells with a B Cell Fluorospot Assay. In: *Cells* 1 (1), S. 15–26. DOI: 10.3390/cells1010015.

Buchman, A. L. (2001): Side effects of corticosteroid therapy. In: *Journal of clinical gastroenterology* 33 (4), S. 289–294.

Cai, J.; Terasaki, P. I.; Mao, Q.; Pham, T.; El-Awar, N.; Lee, J. H.; Rebellato, L. (2006): Development of nondonor-specific HLA-DR antibodies in allograft recipients is associated with shared epitopes with mismatched donor DR antigens. In: *American journal of transplantation : official journal of the American Society of Transplantation and the American Society of Transplant Surgeons* 6 (12), S. 2947–2954. DOI: 10.1111/j.1600-6143.2006.01560.x.

Cardarelli, Francesca; Pascual, Manuel; Tolkoff-Rubin, Nina; Delmonico, Francis L.; Wong, Waichi; Schoenfeld, David A. et al. (2005): Prevalence and significance of anti-HLA and donor-specific antibodies long-term after renal transplantation. In: *Transplant international : official journal of the European Society for Organ Transplantation* 18 (5), S. 532–540. DOI: 10.1111/j.1432-2277.2005.00085.x.

Carroll, Robert; Troelnikov, Alexander; Chong, Anita S. (2016): Virtual Global Transplant Laboratory Standard Operating Protocol for Donor Alloantigen-specific Interferon-gamma ELISPOT Assay. In: *Transplantation direct* 2 (11), e111. DOI: 10.1097/TXD.0000000000000621.

Carsetti, Rita (2000): The Development of B Cells in the Bone Marrow Is Controlled by the Balance between Cell-Autonomous Mechanisms and Signals from the Microenvironment. In: *The Journal of experimental medicine* 191 (1), S. 5–8.

Carter, Natalie A.; Vasconcellos, Rita; Rosser, Elizabeth C.; Tulone, Calogero; Munoz-Suano, Alba; Kamanaka, Masahito et al. (2011): Mice lacking endogenous IL-10-producing regulatory B cells develop exacerbated disease and present with an increased frequency of Th1/Th17 but a decrease in regulatory T cells. In: *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 186 (10), S. 5569–5579. DOI: 10.4049/jimmunol.1100284.

Carter, V.; Shenton, B. K.; Jaques, B.; Turner, D.; Talbot, D.; Gupta, A. et al. (2005): Vimentin antibodies: a non-HLA antibody as a potential risk factor in renal transplantation. In: *Transplantation proceedings* 37 (2), S. 654–657. DOI: 10.1016/j.transproceed.2004.12.043.

Catipovic, B.; Dal Porto, J.; Mage, M.; Johansen, T. E.; Schneck, J. P. (1992): Major histocompatibility complex conformational epitopes are peptide specific. In: *The Journal of experimental medicine* 176 (6), S. 1611–1618.

- Caver, T. E.; O'Sullivan, F. X.; Gold, L. I.; Gresham, H. D. (1996): Intracellular demonstration of active TGFbeta1 in B cells and plasma cells of autoimmune mice. IgG-bound TGFbeta1 suppresses neutrophil function and host defense against Staphylococcus aureus infection. In: *The Journal of clinical investigation* 98 (11), S. 2496–2506. DOI: 10.1172/JCI119068.
- Chong, Anita S.; Alegre, Maria-Luisa (2012): The impact of infection and tissue damage in solid-organ transplantation. In: *Nature reviews. Immunology* 12 (6), S. 459–471. DOI: 10.1038/nri3215.
- Choo, Sung Yoon (2007): The HLA System: Genetics, Immunology, Clinical Testing, and Clinical Implications. In: *Yonsei Medical Journal* 48 (1), S. 11–23. DOI: 10.3349/ymj.2007.48.1.11.
- Claas, Frans H. J.; Doxiadis, Ilias I. N. (2009): Human leukocyte antigen antibody detection and kidney allocation within Eurotransplant. In: *Human immunology* 70 (8), S. 636–639. DOI: 10.1016/j.humimm.2009.04.010.
- Clatworthy, M. R. (2011): Targeting B Cells and Antibody in Transplantation. In: *American journal of transplantation : official journal of the American Society of Transplantation and the American Society of Transplant Surgeons* 11 (7), S. 1359–1367. DOI: 10.1111/j.1600-6143.2011.03554.x.
- Clatworthy, Menna R. (2014): B-cell regulation and its application to transplantation. In: *Transplant international : official journal of the European Society for Organ Transplantation* 27 (2), S. 117–128. DOI: 10.1111/tri.12160.
- Colombo, E.; Tentorio, P.; Musio, S.; Rajewsky, K.; Pedotti, R.; Casola, S.; Farina, C. (2014): Skewed B cell differentiation affects lymphoid organogenesis but not T cell-mediated autoimmunity. In: *Clinical and experimental immunology* 176 (1), S. 58–65. DOI: 10.1111/cei.12250.
- Colombo, Maria Bernadette; Haworth, Simone Elisabeth; Poli, Francesca; Nocco, Angela; Puglisi, Giuseppe; Innocente, Annalisa et al. (2007): Luminex technology for anti-HLA antibody screening: evaluation of performance and of impact on laboratory routine. In: *Cytometry. Part B, Clinical cytometry* 72 (6), S. 465–471. DOI: 10.1002/cyto.b.20353.
- Crawford, A.; MacLeod, M.; Schumacher, T.; Corlett, L.; Gray, D. (2006): Primary T Cell Expansion and Differentiation In Vivo Requires Antigen Presentation by B Cells. In: *The Journal of Immunology* 176 (6), S. 3498–3506. DOI: 10.4049/jimmunol.176.6.3498.
- Crespo, Elena; Cravedi, Paolo; Martorell, Jaume; Luque, Sergi; Melilli, Edoardo; Cruzado, Josep M. et al. (2017): Posttransplant peripheral blood donor-specific interferon-γ enzyme-linked immune spot assay differentiates risk of subclinical rejection and de novo donor-specific alloantibodies in kidney transplant recipients. In: *Kidney International* 92 (1), S. 201–213. DOI: 10.1016/j.kint.2016.12.024.
- Crotty, S.; Felgner, P.; Davies, H.; Glidewell, J.; Villarreal, L.; Ahmed, R. (2003): Cutting Edge: Long-Term B Cell Memory in Humans after Smallpox Vaccination. In: *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 171 (10), S. 4969–4973. DOI: 10.4049/jimmunol.171.10.4969.
- Daniel, C.; Horvath, S.; Allen, P. M. (1998): A basis for alloreactivity: MHC helical residues broaden peptide recognition by the TCR. In: *Immunity* 8 (5), S. 543–552.
- Della-Guardia, B.; Almeida, M. D.; Meira-Filho, S. P.; Torres, M. A.; Venco, F.; Afonso, R. C.; Ferraz-Neto, B. H. (2008): Antibody-mediated rejection: hyperacute rejection reality in liver transplantation? A case report. In: *Transplantation proceedings* 40 (3), S. 870–871. DOI: 10.1016/j.transproceed.2008.02.061.

- Dijke, Esme I.; Platt, Jeffrey L.; Blair, Paul; Clatworthy, Menna R.; Patel, Jignesh K.; Kfoury, A. G.; Cascalho, Marilia (2016): B cells in transplantation. In: *The Journal of heart and lung transplantation : the official publication of the International Society for Heart Transplantation* 35 (6), S. 704–710. DOI: 10.1016/j.healun.2016.01.1232.
- DiLillo, David J.; Matsushita, Takashi; Tedder, Thomas F. (2010): B10 cells and regulatory B cells balance immune responses during inflammation, autoimmunity, and cancer. In: *Annals of the New York Academy of Sciences* 1183, S. 38–57. DOI: 10.1111/j.1749-6632.2009.05137.x.
- Dittrich, Marcus; Lehmann, Paul V. (2012): Statistical analysis of ELISPOT assays. In: *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)* 792, S. 173–183. DOI: 10.1007/978-1-61779-325-7_14.
- Dooley, Abigail; Quintana, Montserrat; Cheung, Michael; Sun, Li Lauren; Gupta, Neetu (2018): The B cell IL-10 receptor suppresses antibody production. In: *The Journal of Immunology* 200 (1 Supplement), 164.9.
- Dragun, Duska (2008): Humoral responses directed against non-human leukocyte antigens in solid-organ transplantation. In: *Transplantation* 86 (8), S. 1019–1025. DOI: 10.1097/TP.0b013e3181889748.
- Dragun, Duska; Catar, Rusan; Philippe, Aurelie (2016): Non-HLA antibodies against endothelial targets bridging allo- and autoimmunity. In: *Kidney International* 90 (2), S. 280–288. DOI: 10.1016/j.kint.2016.03.019.
- Dragun, Duska; Catar, Rusan; Philippe, Aurélie (2013): Non-HLA antibodies in solid organ transplantation: recent concepts and clinical relevance. In: *Current opinion in organ transplantation* 18 (4), S. 430–435. DOI: 10.1097/MOT.0b013e3283636e55.
- Dragun, Duska; Hegner, Bjorn (2009): Non-HLA antibodies post-transplantation: clinical relevance and treatment in solid organ transplantation. In: *Contributions to nephrology* 162, S. 129–139. DOI: 10.1159/000170845.
- Dragun, Duska; Philippe, Aurelie; Catar, Rusan (2012): Role of non-HLA antibodies in organ transplantation. In: *Current opinion in organ transplantation* 17 (4), S. 440–445. DOI: 10.1097/MOT.0b013e328355f12b.
- Dunn, D. L. (1990): Problems related to immunosuppression. Infection and malignancy occurring after solid organ transplantation. In: *Critical care clinics* 6 (4), S. 955–977.
- Dunn-Walters, D. K.; Isaacson, P. G.; Spencer, J. (1995): Analysis of mutations in immunoglobulin heavy chain variable region genes of microdissected marginal zone (MGZ) B cells suggests that the MGZ of human spleen is a reservoir of memory B cells. In: *The Journal of experimental medicine* 182 (2), S. 559–566.
- El-Awar, Nadim; Lee, Jar-How; Tarsitani, Christine; Terasaki, Paul I. (2007): HLA class I epitopes: recognition of binding sites by mAbs or eluted alloantibody confirmed with single recombinant antigens. In: *Human immunology* 68 (3), S. 170–180. DOI: 10.1016/j.humimm.2006.11.006.
- Enderby, Cher; Keller, Cesar A. (2015): An overview of immunosuppression in solid organ transplantation. In: *The American journal of managed care* 21 (1 Suppl), s12-23.
- Erlach, H. A.; Opelz, G.; Hansen, J.: HLA DNA Typing and Transplantation. In: *Immunity* 14 (4), S. 347–356. DOI: 10.1016/S1074-7613(01)00115-7.

- Everly, Matthew J. (2011): Donor-specific anti-HLA antibody monitoring and removal in solid organ transplant recipients. In: *Clinical transplants*, S. 319–325.
- Fangmann J, Dalchau R, Fabre JW. (1992): Rejection of skin allografts by indirect allorecognition of donor class I major histocompatibility complex peptides. In: *The Journal of experimental medicine* 175 (6), S. 1521–1529.
- Fearon, D. T.; Locksley, R. M. (1996): The instructive role of innate immunity in the acquired immune response. In: *Science (New York, N.Y.)* 272 (5258), S. 50–53.
- Feucht, H. E.; Felber, E.; Gokel, M. J.; Hillebrand, G.; Nattermann, U.; Brockmeyer, C. et al. (1991): Vascular deposition of complement-split products in kidney allografts with cell-mediated rejection. In: *Clinical and experimental immunology* 86 (3), S. 464–470.
- Fidler, Samantha J.; Irish, Ashley B.; Lim, Wai; Ferrari, Paolo; Witt, Campbell S.; Christiansen, Frank T. (2013a): Pre-transplant donor specific anti-HLA antibody is associated with antibody-mediated rejection, progressive graft dysfunction and patient death. In: *Transpl Immunol* 28 (4), S. 148–153.
- Fidler, Samantha J.; Irish, Ashley B.; Lim, Wai; Ferrari, Paolo; Witt, Campbell S.; Christiansen, Frank T. (2013b): Pre-transplant donor specific anti-HLA antibody is associated with antibody-mediated rejection, progressive graft dysfunction and patient death. In: *Transplant immunology* 28 (4), S. 148–153. DOI: 10.1016/j.trim.2013.05.001.
- Fillatreau, Simon; Sweeney, Claire H.; McGeachy, Mandy J.; Gray, David; Anderton, Stephen M. (2002): B cells regulate autoimmunity by provision of IL-10. In: *Nature immunology* 3 (10), S. 944–950. DOI: 10.1038/ni833.
- Fu, Y. X.; Chaplin, D. D. (1999): Development and maturation of secondary lymphoid tissues. In: *Annual review of immunology* 17, S. 399–433. DOI: 10.1146/annurev.immunol.17.1.399.
- Galvani, S.; Auge, N.; Calise, D.; Thiers, J. C.; Canivet, C.; Kamar, N. et al. (2009): HLA class I antibodies provoke graft arteriosclerosis in human arteries transplanted into SCID/beige mice. In: *American journal of transplantation : official journal of the American Society of Transplantation and the American Society of Transplant Surgeons* 9 (11), S. 2607–2614. DOI: 10.1111/j.1600-6143.2009.02804.x.
- Gaston, Robert S.; Cecka, J. Michael; Kasiske, Bert L.; Fieberg, Ann M.; Leduc, Robert; Cosio, Fernando C. et al. (2010): Evidence for antibody-mediated injury as a major determinant of late kidney allograft failure. In: *Transplantation* 90 (1), S. 68–74. DOI: 10.1097/TP.0b013e3181e065de.
- Gebauer, Britta S.; Hricik, Donald E.; Atallah, Aymen; Bryan, Kathryn; Riley, Jocelyn; Tary-Lehmann, Magdalena et al. (2002): Evolution of the Enzyme-Linked Immunosorbent Spot Assay for Post-Transplant Alloreactivity as a Potentially Useful Immune Monitoring Tool. In: *Am J Transplant* 2 (9), S. 857–866. DOI: 10.1034/j.1600-6143.2002.20908.x.
- Germann, Anja; Oh, Young-Joo; Schmidt, Tomm; Schön, Uwe; Zimmermann, Heiko; Briesen, Hagen von (2013): Temperature fluctuations during deep temperature cryopreservation reduce PBMC recovery, viability and T-cell function. In: *Cryobiology* 67 (2), S. 193–200. DOI: 10.1016/j.cryobiol.2013.06.012.
- Glanville, Allan R. (2010): Antibody-mediated rejection in lung transplantation: myth or reality? In: *The Journal of heart and lung transplantation : the official publication of the International Society for Heart Transplantation* 29 (4), S. 395–400. DOI: 10.1016/j.healun.2010.01.012.

- Gloor, J. M.; Winters, J. L.; Cornell, L. D.; Fix, L. A.; DeGoey, S. R.; Knauer, R. M. et al. (2010): Baseline donor-specific antibody levels and outcomes in positive crossmatch kidney transplantation. In: *American journal of transplantation : official journal of the American Society of Transplantation and the American Society of Transplant Surgeons* 10 (3), S. 582–589. DOI: 10.1111/j.1600-6143.2009.02985.x.
- Golovkina, T. V.; Shlomchik, M.; Hannum, L.; Chervonsky, A. (1999): Organogenic role of B lymphocytes in mucosal immunity. In: *Science (New York, N.Y.)* 286 (5446), S. 1965–1968.
- Gonzalez, M.; Mackay, F.; Browning, J. L.; Kosco-Vilbois, M. H.; Noelle, R. J. (1998): The sequential role of lymphotoxin and B cells in the development of splenic follicles. In: *The Journal of experimental medicine* 187 (7), S. 997–1007.
- Griffiths, G. M.; Berek, C.; Kaartinen, M.; Milstein, C. (1984): Somatic mutation and the maturation of immune response to 2-phenyl oxazolone. In: *Nature* 312 (5991), S. 271–275.
- Groot, Anne S. de; Moise, Leonard; McMurry, Julie A.; Wambre, Erik; van Overtvelt, Laurence; Moingeon, Philippe et al. (2008): Activation of natural regulatory T cells by IgG Fc-derived peptide "Tregitopes". In: *Blood* 112 (8), S. 3303–3311. DOI: 10.1182/blood-2008-02-138073.
- Haarberg, Kelley M. K.; Tambur, Anat R. (2014): Detection of donor-specific antibodies in kidney transplantation. In: *British medical bulletin* 110 (1), S. 23–34. DOI: 10.1093/bmb/ldu005.
- Harris, D. P.; Haynes, L.; Sayles, P. C.; Duso, D. K.; Eaton, S. M.; Lepak, N. M. et al. (2000): Reciprocal regulation of polarized cytokine production by effector B and T cells. In: *Nature immunology* 1 (6), S. 475–482. DOI: 10.1038/82717.
- Harris, P. E.; Bian, H.; Reed, E. F. (1997): Induction of high affinity fibroblast growth factor receptor expression and proliferation in human endothelial cells by anti-HLA antibodies: a possible mechanism for transplant atherosclerosis. In: *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 159 (11), S. 5697–5704.
- Hartert, Marc; Senbaklavaci, Ömer; Gohrbandt, Bernhard; Fischer, Berthold M.; Buhl, Roland; Vahl, Christian-Friedrich (2014): Lung Transplantation: a Treatment Option in End-Stage Lung Disease. In: *Deutsches Ärzteblatt International* 111 (7), S. 107–116. DOI: 10.3238/arztebl.2014.0107.
- Hartmann, K.; Henz, B. M.; Kruger-Krasagakes, S.; Kohl, J.; Burger, R.; Guhl, S. et al. (1997): C3a and C5a stimulate chemotaxis of human mast cells. In: *Blood* 89 (8), S. 2863–2870.
- Heidt, S.; Roelen, D. L.; Vaal, Y. J. H. de; Kester, M. G. D.; Eijnsink, C.; Thomas, S. et al. (2012): A NOVEL ELISPOT assay to quantify HLA-specific B cells in HLA-immunized individuals. In: *American journal of transplantation : official journal of the American Society of Transplantation and the American Society of Transplant Surgeons* 12 (6), S. 1469–1478. DOI: 10.1111/j.1600-6143.2011.03982.x.
- Hidalgo, L. G.; Sis, B.; Sellares, J.; Campbell, P. M.; Mengel, M.; Einecke, G. et al. (2010): NK cell transcripts and NK cells in kidney biopsies from patients with donor-specific antibodies: evidence for NK cell involvement in antibody-mediated rejection. In: *American journal of transplantation : official journal of the American Society of Transplantation and the American Society of Transplant Surgeons* 10 (8), S. 1812–1822. DOI: 10.1111/j.1600-6143.2010.03201.x.
- Hippen, Benjamin E.; DeMattos, Angelo; Cook, William J.; Kew, Clifton E. 2nd; Gaston, Robert S. (2005): Association of CD20+ infiltrates with poorer clinical outcomes in acute cellular rejection of renal allografts. In: *American journal of transplantation : official journal of the American Society of*

Transplantation and the American Society of Transplant Surgeons 5 (9), S. 2248–2252. DOI: 10.1111/j.1600-6143.2005.01009.x.

Hoffmann, J. A.; Kafatos, F. C.; Janeway, C. A.; Ezekowitz, R. A. (1999): Phylogenetic perspectives in innate immunity. In: *Science (New York, N.Y.)* 284 (5418), S. 1313–1318.

Hughes, Peter D.; Cohn, Solomon J. (2011): Modifiers of complement activation for prevention of antibody-mediated injury to allografts. In: *Current opinion in organ transplantation* 16 (4), S. 425–433. DOI: 10.1097/MOT.0b013e3283489a5a.

Itescu, Silviu; Tung, Thomas C.; Burke, Elizabeth M.; Weinberg, Alan; Moazami, Nader; Artrip, John H. et al. (1998): Preformed IgG Antibodies Against Major Histocompatibility Complex Class II Antigens Are Major Risk Factors for High-grade Cellular Rejection in Recipients of Heart Transplantation. In: *Circulation* 98 (8), S. 786. DOI: 10.1161/01.CIR.98.8.786.

Jacob, J.; Kassir, R.; Kelsoe, G. (1991a): In situ studies of the primary immune response to (4-hydroxy-3-nitrophenyl)acetyl. I. The architecture and dynamics of responding cell populations. In: *The Journal of experimental medicine* 173 (5), S. 1165–1175.

Jacob, J.; Kelsoe, G.; Rajewsky, K.; Weiss, U. (1991b): Intracloonal generation of antibody mutants in germinal centres. In: *Nature* 354 (6352), S. 389–392. DOI: 10.1038/354389a0.

Jahnmatz, Maja; Kesa, Gun; Netterlid, Eva; Buisman, Anne-Marie; Thorstensson, Rigmor; Ahlborg, Niklas (2013): Optimization of a human IgG B-cell ELISpot assay for the analysis of vaccine-induced B-cell responses. In: *Journal of immunological methods* 391 (1-2), S. 50–59. DOI: 10.1016/j.jim.2013.02.009.

Janas-Boratynska, M.; Szewczyk, Z. (1979): The effect of immunosuppressive and anti-inflammatory drugs on lymphocyte population and MIF in glomerulonephritis. In: *Archivum immunologiae et therapiae experimentalis* 27 (6), S. 833–845.

Janeway, Charles (Hg.) (2008): Janeway's Immunobiology. Unter Mitarbeit von Murphy, Kenneth, Paul Travers, Mark Walport, and Charles Janeway. New York: Garland Science.

Janicek, M. J.; van den Abbeele, A. D.; Hollenberg, N. K.; Kassis, A. I.; Holman, B. L.; Tumei, S. S. (1990): Platelet activation and aggregation after endothelial injury. Assessment with indium-111-labeled platelets and angiography. In: *Investigative radiology* 25 (9), S. 988–993.

Jeurissen, A.; Ceuppens, J. L.; Bossuyt, X. (2004): T lymphocyte dependence of the antibody response to 'T lymphocyte independent type 2' antigens. In: *Immunology* 111 (1), S. 1–7. DOI: 10.1111/j.1365-2567.2003.01775.x.

Jin, Yi-Ping; Jindra, Peter T.; Gong, Ke Wei; Lepin, Eric J.; Reed, Elaine F. (2005): Anti-HLA class I antibodies activate endothelial cells and promote chronic rejection. In: *Transplantation* 79 (3 Suppl), S19–21.

Joao, C.; Ogle, B. M.; Gay-Rabinstein, C.; Platt, J. L.; Cascalho, M. (2004): B Cell-Dependent TCR Diversification. In: *The Journal of Immunology* 172 (8), S. 4709–4716. DOI: 10.4049/jimmunol.172.8.4709.

Kaczmarek, Ingo; Deutsch, Marcus-Andre; Kauke, Teresa; Beiras-Fernandez, Andres; Schmoedel, Michael; Vicol, Calin et al. (2008): Donor-specific HLA alloantibodies: long-term impact on cardiac allograft vasculopathy and mortality after heart transplant. In: *Exp Clin Transplant* 6 (3), S. 229–235.

- Kaplan, Bruce; Qazi, Yasir; Wellen, Jason R. (2014): Strategies for the management of adverse events associated with mTOR inhibitors. In: *Transplantation reviews (Orlando, Fla.)* 28 (3), S. 126–133. DOI: 10.1016/j.trre.2014.03.002.
- Karahan, G. E.; Vaal, Y. J. H. de; Krop, J.; Wehmeier, C.; Roelen, D. L.; Claas, F. H. J.; Heidt, S. (2017): A Memory B Cell Crossmatch Assay for Quantification of Donor-Specific Memory B Cells in the Peripheral Blood of HLA-Immunized Individuals. In: *Am J Transplant* 17 (10), S. 2617–2626. DOI: 10.1111/ajt.14293.
- Karahan, Gonca E.; Vaal, Yvonne J.H. de; Roelen, Dave L.; Buchli, Rico; Claas, Frans H.J.; Heidt, Sebastiaan (2015): Quantification of HLA class II-specific memory B cells in HLA-sensitized individuals. In: *Human immunology* 76 (2-3), S. 129–136. DOI: 10.1016/j.humimm.2015.01.014.
- Kauke, Teresa; Kaczmarek, Ingo; Dick, Andrea; Schmoeckel, Michael; Deutsch, Marcus-Andre; Beiras-Fernandez, Andres et al. (2009): Anti-MICA antibodies are related to adverse outcome in heart transplant recipients. In: *The Journal of heart and lung transplantation : the official publication of the International Society for Heart Transplantation* 28 (4), S. 305–311. DOI: 10.1016/j.healun.2009.01.003.
- Kaye, J.; Hedrick, S. M. (1988): Analysis of specificity for antigen, MIs, and allogenic MHC by transfer of T-cell receptor alpha- and beta-chain genes. In: *Nature* 336 (6199), S. 580–583. DOI: 10.1038/336580a0.
- Kekomaki, S.; Kyllonen, L.; Salmela, K.; Koskimies, S.; Kekomaki, R. (2001): Platelet-specific alloantigens in cadaveric renal transplantation. A prospective study. Effect of HPA-5b mismatch in acute vascular rejection of renal allografts. In: *Tissue antigens* 57 (2), S. 154–157.
- Kim, S. H.; Oh, E. J.; Kim, M. J.; Park, Y. J.; Han, K.; Yang, H. J. et al. (2007): Pretransplant donor-specific interferon-gamma ELISPOT assay predicts acute rejection episodes in renal transplant recipients. In: *Transplantation proceedings* 39 (10), S. 3057–3060. DOI: 10.1016/j.transproceed.2007.06.080.
- Kissmeyer-Nielsen, F.; Olsen, S.; Petersen, V. P.; Fjeldborg, O. (1966): Hyperacute rejection of kidney allografts, associated with pre-existing humoral antibodies against donor cells. In: *Lancet (London, England)* 2 (7465), S. 662–665.
- Klein, U.; Kuppers, R.; Rajewsky, K. (1997): Evidence for a large compartment of IgM-expressing memory B cells in humans. In: *Blood* 89 (4), S. 1288–1298.
- Klein, Ulf; Rajewsky, Klaus; Küppers, Ralf (1998): Human Immunoglobulin (Ig)M(+)IgD(+) Peripheral Blood B Cells Expressing the CD27 Cell Surface Antigen Carry Somatic Mutated Variable Region Genes: CD27 as a General Marker for Somatic Mutated (Memory) B Cells. In: *The Journal of experimental medicine* 188 (9), S. 1679–1689.
- Klein, Ulf; Tu, Yuhai; Stolovitzky, Gustavo A.; Keller, Jeffrey L.; Haddad, Joseph, JR; Miljkovic, Vladan et al. (2003): Transcriptional analysis of the B cell germinal center reaction. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 100 (5), S. 2639–2644. DOI: 10.1073/pnas.0437996100.
- Kouwenhoven, Mathilde; Özenci, Volkan; Teleshova, Natalia; Hussein, Yassir; Huang, Yu-Min; Eusebio, Alexandre; Link, Hans (2001): Enzyme-Linked Immunospot Assays Provide a Sensitive Tool

for Detection of Cytokine Secretion by Monocytes. In: *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology* 8 (6), S. 1248–1257. DOI: 10.1128/CDLI.8.6.1248-1257.2001.

Kracker, Sven; Radbruch, Andreas (2004): Immunoglobulin class switching: in vitro induction and analysis. In: *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)* 271, S. 149–159. DOI: 10.1385/1-59259-796-3:149.

Krensky, A. M. (1997): The HLA system, antigen processing and presentation. In: *Kidney international. Supplement* 58, S2-7.

La Garza, Rocío García de; Sarobe, Pablo; Merino, Juana; Lasarte, Juan J.; D'Avola, Delia; Belsue, Virginia et al. (2013): Trial of complete weaning from immunosuppression for liver transplant recipients: factors predictive of tolerance. In: *Liver transplantation : official publication of the American Association for the Study of Liver Diseases and the International Liver Transplantation Society* 19 (9), S. 937–944. DOI: 10.1002/lt.23686.

Lanzavecchia, Antonio; Sallusto, Federica (2002): Progressive differentiation and selection of the fittest in the immune response. In: *Nature reviews. Immunology* 2 (12), S. 982–987. DOI: 10.1038/nri959.

Lee, Chih-Yuan; Lotfi-Emran, Sahar; Erdinc, Melek; Murata, Kazunori; Velidedeoglu, Ergun; Fox-Talbot, Karen et al. (2007): The involvement of FcR mechanisms in antibody-mediated rejection. In: *Transplantation* 84 (10), S. 1324–1334. DOI: 10.1097/01.tp.0000287457.54761.53.

Lee, Kyoung-Bun (2017): What Is Antibody-Mediated Rejection in Histologic Diagnosis in Liver Recipients? In: *J Korean Soc Transplant* 31 (1), S. 1. DOI: 10.4285/jkstn.2017.31.1.1.

Lee, Po-Chang; Terasaki, Paul I.; Takemoto, Steven K.; Lee, Po-Huang; Hung, Chung-Jye; Chen, Yi-Lin et al. (2002): All chronic rejection failures of kidney transplants were preceded by the development of HLA antibodies. In: *Transplantation* 74 (8), S. 1192–1194. DOI: 10.1097/01.TP.0000031249.33030.FB.

Lefaucheur, Carmen; Loupy, Alexandre; Hill, Gary S.; Andrade, Joao; Nochy, Dominique; Antoine, Corinne et al. (2010): Preexisting Donor-Specific HLA Antibodies Predict Outcome in Kidney Transplantation. In: *Journal of the American Society of Nephrology : JASN* 21 (8), S. 1398–1406. DOI: 10.1681/ASN.2009101065.

Lehnhardt, A.; Mengel, M.; Pape, L.; Ehrich, J. H. H.; Offner, G.; Strehlau, J. (2006): Nodular B-cell aggregates associated with treatment refractory renal transplant rejection resolved by rituximab. In: *American journal of transplantation : official journal of the American Society of Transplantation and the American Society of Transplant Surgeons* 6 (4), S. 847–851. DOI: 10.1111/j.1600-6143.2006.01246.x.

Leisner, Ulf (2016): Untersuchung der frühen Immunantwort nach Hepatitis- B- Impfung, zuletzt geprüft am 16.09.2018.

Lesinski, G. B.; Westerink, M. A. (2001): Novel vaccine strategies to T-independent antigens. In: *Journal of microbiological methods* 47 (2), S. 135–149.

Levitsky, Josh (2011): Next level of immunosuppression: drug/immune monitoring. In: *Liver transplantation : official publication of the American Association for the Study of Liver Diseases and the International Liver Transplantation Society* 17 Suppl 3, S60-5. DOI: 10.1002/lt.22385.

- Li, Fang; Zhang, Xiaohai; Jin, Yi-Ping; Mulder, Arend; Reed, Elaine F. (2011): Antibody ligation of human leukocyte antigen class I molecules stimulates migration and proliferation of smooth muscle cells in a focal adhesion kinase-dependent manner. In: *Human immunology* 72 (12), S. 1150–1159. DOI: 10.1016/j.humimm.2011.09.004.
- Li, Xian Chang (2010): The significance of non-T cell pathways in graft rejection--implications for transplant tolerance. In: *Transplantation* 90 (10), S. 1043–1047. DOI: 10.1097/TP.0b013e3181efcfe9.
- Liu, Y. J.; Arpin, C. (1997): Germinal center development. In: *Immunological reviews* 156, S. 111–126.
- Liu, Y. J.; Oldfield, S.; MacLennan, I. C. (1988): Memory B cells in T cell-dependent antibody responses colonize the splenic marginal zones. In: *European journal of immunology* 18 (3), S. 355–362. DOI: 10.1002/eji.1830180306.
- Liu, Y. J.; Zhang, J.; Lane, P. J.; Chan, E. Y.; MacLennan, I. C. (1991): Sites of specific B cell activation in primary and secondary responses to T cell-dependent and T cell-independent antigens. In: *European journal of immunology* 21 (12), S. 2951–2962. DOI: 10.1002/eji.1830211209.
- Liu, Yong-Jun; Barthélémy, Clarissa; Bouteiller, Odette De; Arpin, Christophe; Isabelle, Durand; Banchereau, Jacques (1995): Memory B cells from human tonsils colonize mucosal epithelium and directly present antigen to T cells by Rapid Up-Regulation of B7-1 and B7-2. In: *Immunity* 2 (3), S. 239–248. DOI: 10.1016/1074-7613(95)90048-9.
- Liu, Z.; Braunstein, N. S.; Suciu-Foca, N. (1992): T cell recognition of allopeptides in context of syngeneic MHC. In: *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 148 (1), S. 35–40.
- Liu, Z.; Colovai, A. I.; Tugulea, S.; Reed, E. F.; Fisher, P. E.; Mancini, D. et al. (1996): Indirect recognition of donor HLA-DR peptides in organ allograft rejection. In: *Journal of Clinical Investigation* 98 (5), S. 1150–1157.
- Loder, By Florienne; Mutschler, Bettina; Ray, Robert J.; Paige, Christopher J.; Sideras, Paschalis; Torres, Raul et al. (1999): B Cell Development in the Spleen Takes Place in Discrete Steps and Is Determined by the Quality of B Cell Receptor–Derived Signals. In: *The Journal of experimental medicine* 190 (1), S. 75–90.
- Lombardi, G.; Sidhu, S.; Daly, M.; Batchelor, J. R.; Makgoba, W.; Lechler, R. I. (1990): Are primary alloresponses truly primary? In: *International immunology* 2 (1), S. 9–13.
- Loupy, A.; Haas, M.; Solez, K.; Racusen, L.; Glotz, D.; Seron, D. et al. (2017): The Banff 2015 Kidney Meeting Report: Current Challenges in Rejection Classification and Prospects for Adopting Molecular Pathology. In: *American journal of transplantation : official journal of the American Society of Transplantation and the American Society of Transplant Surgeons* 17 (1), S. 28–41. DOI: 10.1111/ajt.14107.
- LOVELOCK, J. E.; BISHOP, M. W. H. (1959): Prevention of Freezing Damage to Living Cells by Dimethyl Sulphoxide. In: *Nature* 183 (4672), S. 1394–1395. DOI: 10.1038/1831394a0.
- Lúcia, Marc; Luque, Sergi; Crespo, Elena; Melilli, Edoardo; Cruzado, Josep M.; Martorell, Jaume et al. (2015a): Preformed circulating HLA-specific memory B cells predict high risk of humoral rejection in kidney transplantation. In: *Kidney International* 88 (4), S. 874–887. DOI: 10.1038/ki.2015.205.

- Lúcia, Marc; Luque, Sergi; Crespo, Elena; Melilli, Edoardo; Cruzado, Josep M.; Martorell, Jaume et al. (2015b): Preformed circulating HLA-specific memory B cells predict high risk of humoral rejection in kidney transplantation. In: *Kidney International* 88 (4), S. 874–887. DOI: 10.1038/ki.2015.205.
- Lynch, R. J.; Silva, I. A.; Chen, B. J.; Punch, J. D.; Cascalho, M.; Platt, J. L. (2013): Cryptic B cell response to renal transplantation. In: *Am J Transplant* 13 (7), S. 1713–1723. DOI: 10.1111/ajt.12308.
- Maccarone, D.; Cervelli, C.; Parzanese, I.; Pisani, F.; Caniglia, L.; Rascente, M. et al. (2005): Anti-HLA antibodies in kidney transplanted patients. In: *Transplantation proceedings* 37 (6), S. 2459–2460. DOI: 10.1016/j.transproceed.2005.06.025.
- MacLennan, I. C. (1994): Germinal centers. In: *Annual review of immunology* 12, S. 117–139. DOI: 10.1146/annurev.iy.12.040194.001001.
- MacLeod, Megan K. L.; Kappler, John W.; Marrack, Philippa (2010): Memory CD4 T cells: generation, reactivation and re-assignment. In: *Immunology* 130 (1), S. 10–15. DOI: 10.1111/j.1365-2567.2010.03260.x.
- Mao, Q.; Terasaki, P. I.; Cai, J.; Briley, K.; Catrou, P.; Haisch, C.; Rebellato, L. (2007): Extremely high association between appearance of HLA antibodies and failure of kidney grafts in a five-year longitudinal study. In: *American journal of transplantation : official journal of the American Society of Transplantation and the American Society of Transplant Surgeons* 7 (4), S. 864–871. DOI: 10.1111/j.1600-6143.2006.01711.x.
- Maruyama, M.; Lam, K. P.; Rajewsky, K. (2000): Memory B-cell persistence is independent of persisting immunizing antigen. In: *Nature* 407 (6804), S. 636–642. DOI: 10.1038/35036600.
- Matsushita, Takashi; Yanaba, Koichi; Bouaziz, Jean-David; Fujimoto, Manabu; Tedder, Thomas F. (2008): Regulatory B cells inhibit EAE initiation in mice while other B cells promote disease progression. In: *J Clin Invest* 118 (10), S. 3420–3430. DOI: 10.1172/JCI36030.
- Mauviyyedi, S.; Pelle, P. D.; Saidman, S.; Collins, A. B.; Pascual, M.; Tolkoff-Rubin, N. E. et al. (2001): Chronic humoral rejection: identification of antibody-mediated chronic renal allograft rejection by C4d deposits in peritubular capillaries. In: *Journal of the American Society of Nephrology : JASN* 12 (3), S. 574–582.
- Mazariegos, G. V.; Ramos, H.; Shapiro, R.; Zeevi, A.; Fung, J. J.; Starzl, T. E. (1995): Weaning of Immunosuppression in Long-Term Recipients of Living Related Renal Transplants: A Preliminary Study. In: *Transplantation proceedings* 27 (1), S. 207–209.
- McHeyzer-Williams, Louise J.; McHeyzer-Williams, Michael G. (2005): Antigen-specific memory B cell development. In: *Annual review of immunology* 23, S. 487–513. DOI: 10.1146/annurev.immunol.23.021704.115732.
- McHeyzer-Williams, M. G.; Ahmed, R. (1999): B cell memory and the long-lived plasma cell. In: *Current opinion in immunology* 11 (2), S. 172–179.
- Medzhitov, R.; Janeway, C., JR (2000): Innate immune recognition: mechanisms and pathways. In: *Immunological reviews* 173, S. 89–97.
- Mehra, Narinder K.; Siddiqui, Jamshaid; Baranwal, Ajay; Goswami, Sanjeev; Kaur, Gurminder (2013): Clinical relevance of antibody development in renal transplantation. In: *Annals of the New York Academy of Sciences* 1283, S. 30–42. DOI: 10.1111/nyas.12034.

Menard, Laurence C.; Minns, Laurie A.; Darche, Sylvie; Mielcarz, Daniel W.; Foureau, David M.; Roos, David et al. (2007): B cells amplify IFN-gamma production by T cells via a TNF-alpha-mediated mechanism. In: *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 179 (7), S. 4857–4866.

Mengel, Michael; Husain, Sufia; Hidalgo, Luis; Sis, Banu (2012): Phenotypes of antibody-mediated rejection in organ transplants. In: *Transplant international : official journal of the European Society for Organ Transplantation* 25 (6), S. 611–622. DOI: 10.1111/j.1432-2277.2012.01484.x.

Merle, Nicolas S.; Noe, Remi; Halbwachs-Mecarelli, Lise; Fremeaux-Bacchi, Veronique; Roumenina, Lubka T. (2015): Complement System Part II: Role in Immunity. In: *Frontiers in Immunology* 6. DOI: 10.3389/fimmu.2015.00257.

Metzger, H.; Kinet, J. P. (1988): How antibodies work: focus on Fc receptors. In: *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 2 (1), S. 3–11.

Miltenburg, A. M.; Meijer-Paape, M. E.; Weening, J. J.; Daha, M. R.; van Es, L. A.; van der Woude, F. J. (1989): Induction of antibody-dependent cellular cytotoxicity against endothelial cells by renal transplantation. In: *Transplantation* 48 (4), S. 681–688.

Mizutani, Kazuo; Terasaki, Paul; Bignon, Jean Denis; Hourmant, Maryvonne; Cesbron-Gautier, Anne; Shih, Remi N. J. et al. (2006): Association of kidney transplant failure and antibodies against MICA. In: *Human immunology* 67 (9), S. 683–691. DOI: 10.1016/j.humimm.2006.06.002.

Mizutani, Kazuo; Terasaki, Paul; Rosen, Anne; Esquenazi, Violet; Miller, Joshua; Shih, Remi N. J. et al. (2005): Serial ten-year follow-up of HLA and MICA antibody production prior to kidney graft failure. In: *American journal of transplantation : official journal of the American Society of Transplantation and the American Society of Transplant Surgeons* 5 (9), S. 2265–2272. DOI: 10.1111/j.1600-6143.2005.01016.x.

Molkentin, J. D.; Lu, J. R.; Antos, C. L.; Markham, B.; Richardson, J.; Robbins, J. et al. (1998): A calcineurin-dependent transcriptional pathway for cardiac hypertrophy. In: *Cell* 93 (2), S. 215–228.

Morales-Aza, Begonia; Glennie, Sarah J.; Garcez, Tomaz Pereira; Davenport, Victoria; Johnston, Sarah L.; Williams, Neil A.; Heyderman, Robert S. (2009): Impaired maintenance of naturally acquired T-cell memory to the meningococcus in patients with B-cell immunodeficiency. In: *Blood* 113 (18), S. 4206–4212. DOI: 10.1182/blood-2008-08-171587.

Mulder, A.; Eijnsink, C.; Kardol, M. J.; Franke-van Dijk, M. E. I.; van der Burg, S. H.; Kester, M. et al. (2003): Identification, Isolation, and Culture of HLA-A2-Specific B Lymphocytes Using MHC Class I Tetramers. In: *The Journal of Immunology* 171 (12), S. 6599–6603. DOI: 10.4049/jimmunol.171.12.6599.

Nadazdin, Ognjenka; Boskovic, Svjetlan; Wee, Siew-Lin; Sogawa, Hiroshi; Koyama, Ichiro; Colvin, Robert B. (2011): Contributions of direct and indirect alloresponses to chronic rejection of kidney allografts in non-human primates 187 (9), S. 4589–4597. DOI: 10.4049/jimmunol.1003253.

Newell, Kenneth A.; Asare, Adam; Kirk, Allan D.; Gisler, Trang D.; Bourcier, Kasia; Suthanthiran, Manikkam et al. (2010): Identification of a B cell signature associated with renal transplant tolerance in humans. In: *J Clin Invest* 120 (6), S. 1836–1847. DOI: 10.1172/JCI39933.

Ng, Y-H; Oberbarnscheidt, M. H.; Chandramoorthy, H. C. K.; Hoffman, R.; Chalasani, G. (2010): B cells help alloreactive T cells differentiate into memory T cells. In: *American journal of transplantation :*

official journal of the American Society of Transplantation and the American Society of Transplant Surgeons 10 (9), S. 1970–1980. DOI: 10.1111/j.1600-6143.2010.03223.x.

Ngo, V. N.; Cornall, R. J.; Cyster, J. G. (2001): Splenic T zone development is B cell dependent. In: *The Journal of experimental medicine* 194 (11), S. 1649–1660.

Nickel, Peter; Presber, Franziska; Bold, Gantuja; Biti, Didier; Schonemann, Constanze; Tullius, Stefan G. et al. (2004): Enzyme-linked immunosorbent spot assay for donor-reactive interferon-gamma-producing cells identifies T-cell presensitization and correlates with graft function at 6 and 12 months in renal-transplant recipients. In: *Transplantation* 78 (11), S. 1640–1646.

Nolte, Martijn A.; Arens, Ramon; Kraus, Manfred; van Oers, Marinus H. J.; Kraal, Georg; van Lier, René A. W.; Mebius, Reina E. (2004): B Cells Are Crucial for Both Development and Maintenance of the Splenic Marginal Zone. In: *J. Immunol.* 172 (6), S. 3620. DOI: 10.4049/jimmunol.172.6.3620.

Noorchashm, Hooman; Reed, Amy J.; Rostami, Susan Y.; Mozaffari, Raha; Zekavat, Ghazal; Koeberlein, Brigitte et al. (2006): B cell-mediated antigen presentation is required for the pathogenesis of acute cardiac allograft rejection. In: *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 177 (11), S. 7715–7722.

Nutt, Stephen L.; Hodgkin, Philip D.; Tarlinton, David M.; Corcoran, Lynn M. (2015): The generation of antibody-secreting plasma cells. In: *Nature reviews. Immunology* 15 (3), S. 160–171. DOI: 10.1038/nri3795.

Obar, Joshua J.; Lefrançois, Leo (2010): Memory CD8(+) T cell differentiation. In: *Annals of the New York Academy of Sciences* 1183, S. 251–266. DOI: 10.1111/j.1749-6632.2009.05126.x.

Oliver, A. M.; Martin, F.; Kearney, J. F. (1999): IgM^{high}CD21^{high} lymphocytes enriched in the splenic marginal zone generate effector cells more rapidly than the bulk of follicular B cells. In: *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 162 (12), S. 7198–7207.

OPTN/SRTR: OPTN/SRTR 2012 Annual Data Report, zuletzt geprüft am 07.02.2017.

Orlando, Giuseppe (2010): Finding the right time for weaning off immunosuppression in solid organ transplant recipients. In: *Expert review of clinical immunology* 6 (6), S. 879–892. DOI: 10.1586/eci.10.71.

Pai, Madhukar; Behr, Marcel (2016): Latent Mycobacterium tuberculosis Infection and Interferon-Gamma Release Assays. In: *Microbiology spectrum* 4 (5). DOI: 10.1128/microbiolspec.TBTB2-0023-2016.

Paramithiotis, E.; Cooper, M. D. (1997): Memory B lymphocytes migrate to bone marrow in humans. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences* 94 (1), S. 208–212. DOI: 10.1073/pnas.94.1.208.

Pascher, Andreas; Nebrig, Maxim; Neuhaus, Peter (2013): Irreversible Liver Failure: Treatment by Transplantation: Part 3 of a Series on Liver Cirrhosis. In: *Deutsches Ärzteblatt International* 110 (10), S. 167–173. DOI: 10.3238/arztebl.2013.0167.

Patel, Ramon; Terasaki, Paul I. (1969): Significance of the Positive Crossmatch Test in Kidney Transplantation. In: *N Engl J Med* 280 (14), S. 735–739. DOI: 10.1056/NEJM196904032801401.

Pelfrey, C. M.; Rudick, R. A.; Coteleur, A. C.; Lee, J. C.; Tary-Lehmann, M.; Lehmann, P. V. (2000): Quantification of self-recognition in multiple sclerosis by single-cell analysis of cytokine production. In: *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 165 (3), S. 1641–1651.

- Pieper, Kathrin; Grimbacher, Bodo; Eibel, Hermann (2013): B-cell biology and development. In: *The Journal of allergy and clinical immunology* 131 (4), S. 959–971. DOI: 10.1016/j.jaci.2013.01.046.
- Pierce, S. K.; Morris, J. F.; Grusby, M. J.; Kaumaya, P.; van Buskirk, A.; Srinivasan, M. et al. (1988): Antigen-presenting function of B lymphocytes. In: *Immunological reviews* 106, S. 149–180.
- Pinna, Debora; Corti, Davide; Jarrossay, David; Sallusto, Federica; Lanzavecchia, Antonio (2009): Clonal dissection of the human memory B-cell repertoire following infection and vaccination. In: *European journal of immunology* 39 (5), S. 1260–1270. DOI: 10.1002/eji.200839129.
- Platt, J. L.; Vercellotti, G. M.; Dalmasso, A. P.; Matas, A. J.; Bolman, R. M.; Najarian, J. S.; Bach, F. H. (1990): Transplantation of discordant xenografts: a review of progress. In: *Immunology today* 11 (12), 450-6; discussion 456-7.
- Plotkin, Stanley A.; Orenstein, Walter A.; Offit, Paul A.; Edwards, Kathryn M. (Hg.) (2018): Plotkin's vaccines. Seventh edition. Philadelphia, PA: Elsevier.
- Post, David J.; Douglas, David D.; Mulligan, David C. (2005): Immunosuppression in liver transplantation. In: *Liver transplantation : official publication of the American Association for the Study of Liver Diseases and the International Liver Transplantation Society* 11 (11), S. 1307–1314. DOI: 10.1002/lt.20614.
- Praprotnik, Sonja; Blank, Miri; Meroni, Pier Luigi; Rozman, Blaz; Eldor, Amiram; Shoenfeld, Yehuda (2001): Classification of anti-endothelial cell antibodies into antibodies against microvascular and macrovascular endothelial cells. The pathogenic and diagnostic implications. In: *Arthritis & Rheumatism* 44 (7), S. 1484–1494. DOI: 10.1002/1529-0131(200107)44:7<1484::AID-ART269>3.0.CO;2-Q.
- Pratschke, Johann; Stauch, Diana; Kotsch, Katja (2009): Role of NK and NKT cells in solid organ transplantation. In: *Transplant international : official journal of the European Society for Organ Transplantation* 22 (9), S. 859–868. DOI: 10.1111/j.1432-2277.2009.00884.x.
- Presber, Franziska (2005): Bestimmung spenderreaktiver, IFN γ -produzierender Zellen vor und nach Nierentransplantation im ELISpot-Assay - Zusammenhang mit frühen akuten Rejektionen und mit dem klinischen Ausgang, zuletzt geprüft am 16.09.2018.
- Proost, P.; Wuyts, A.; van Damme, J. (1996): The role of chemokines in inflammation. In: *International journal of clinical & laboratory research* 26 (4), S. 211–223.
- Purtha, Whitney E.; Tedder, Thomas F.; Johnson, Syd; Bhattacharya, Deepta; Diamond, Michael S. (2011): Memory B cells, but not long-lived plasma cells, possess antigen specificities for viral escape mutants. In: *The Journal of experimental medicine* 208 (13), S. 2599–2606. DOI: 10.1084/jem.20110740.
- Rahimi, A.; Sepehri, H.; Pakraves, J.; Bahar, K. (1999): Quantification of C3 and C4 in infertile men with antisperm antibody in their seminal plasma. In: *American journal of reproductive immunology (New York, N.Y. : 1989)* 41 (5), S. 330–336.
- Rajewsky, Klaus (1996): Clonal selection and learning in the antibody system. In: *Nature* 381 (6585), S. 751–758. DOI: 10.1038/381751a0.

- Robab Nazarpour; Ebrahim Zabihi; Ebrahim Alijanpour; Zeinab Abedian; Hamid Mehdizadeh (2012): Optimization of Human Peripheral Blood Mononuclear Cells (PBMCs) Cryopreservation. In: *IJMCM*, Vol1, No2, zuletzt geprüft am 05.12.2016.
- Rolink, A. G.; Schaniel, C.; Andersson, J.; Melchers, F. (2001): Selection events operating at various stages in B cell development. In: *Current opinion in immunology* 13 (2), S. 202–207.
- Rosado, M. Manuela; Scarsella, Marco; Pandolfi, Elisabetta; Cascioli, Simona; Giorda, Ezio; Chionne, Paola et al. (2011): Switched memory B cells maintain specific memory independently of serum antibodies: the hepatitis B example. In: *European journal of immunology* 41 (6), S. 1800–1808. DOI: 10.1002/eji.201041187.
- Rosser, Elizabeth C.; Mauri, Claudia (2015): Regulatory B cells: origin, phenotype, and function. In: *Immunity* 42 (4), S. 607–612. DOI: 10.1016/j.immuni.2015.04.005.
- Roux, A.; Levine, D. J.; Zeevi, A.; Hachem, R.; Halloran, K.; Halloran, P. F. et al. (2018): Banff Lung Report: Current knowledge and future research perspectives for diagnosis and treatment of pulmonary antibody-mediated rejection (AMR). In: *Am J Transplant*. DOI: 10.1111/ajt.14990.
- Saadi, S.; Holzknacht, R. A.; Patte, C. P.; Stern, D. M.; Platt, J. L. (1995): Complement-mediated regulation of tissue factor activity in endothelium. In: *The Journal of experimental medicine* 182 (6), S. 1807–1814.
- Saadi, Soheyla; Takahashi, Takao; Holzknacht, Robert A.; Platt, Jeffrey L. (2004): Pathways to acute humoral rejection. In: *The American journal of pathology* 164 (3), S. 1073–1080. DOI: 10.1016/S0002-9440(10)63194-X.
- Saadi, Soheyla; Wrenshall, Lucile E.; Platt, Jeffrey L. (2002): Regional manifestations and control of the immune system. In: *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 16 (8), S. 849–856. DOI: 10.1096/fj.01-0690hyp.
- Sagoo, Pervinder; Perucha, Esperanza; Sawitzki, Birgit; Tomiuk, Stefan; Stephens, David A.; Miqueu, Patrick et al. (2010): Development of a cross-platform biomarker signature to detect renal transplant tolerance in humans. In: *The Journal of clinical investigation* 120 (6), S. 1848–1861. DOI: 10.1172/JCI39922.
- Sharpe, Arlene H.; Abbas, Abul K. (2006): T-Cell Costimulation — Biology, Therapeutic Potential, and Challenges. In: *N Engl J Med* 355 (10), S. 973–975. DOI: 10.1056/NEJMp068087.
- Sheil, A. G.; Disney, A. P.; Mathew, T. H.; Amiss, N. (1993): De novo malignancy emerges as a major cause of morbidity and late failure in renal transplantation. In: *Transplantation proceedings* 25 (1 Pt 2), S. 1383–1384.
- Shinomiya, N.; Kuratsuji, T.; Yata, J. (1989): The role of T cells in immunoglobulin class switching of specific antibody production system in vitro in humans. In: *Cellular immunology* 118 (2), S. 239–249.
- Shiu, Kin Yee; Dorling, Anthony (2014): Optimising long-term graft survival: establishing the benefit of targeting B lymphocytes. In: *Clinical medicine (London, England)* 14 Suppl 6, s84-8. DOI: 10.7861/clinmedicine.14-6-s84.
- Sis, B.; Campbell, P. M.; Mueller, T.; Hunter, C.; Cockfield, S. M.; Cruz, J. et al. (2007): Transplant glomerulopathy, late antibody-mediated rejection and the ABCD tetrad in kidney allograft biopsies for cause. In: *American journal of transplantation : official journal of the American Society of*

Transplantation and the American Society of Transplant Surgeons 7 (7), S. 1743–1752. DOI: 10.1111/j.1600-6143.2007.01836.x.

Smith, Jeffrey G.; Levin, Myron; Vessey, Rupert; Chan, Ivan S. F.; Hayward, Anthony R.; Liu, Xu et al. (2003): Measurement of cell-mediated immunity with a Varicella-Zoster Virus-specific interferon-gamma ELISPOT assay: responses in an elderly population receiving a booster immunization. In: *Journal of medical virology* 70 Suppl 1, S38–41. DOI: 10.1002/jmv.10318.

Smith-Garvin, Jennifer E.; Koretzky, Gary A.; Jordan, Martha S. (2009): T Cell Activation. In: *Annual review of immunology* 27, S. 591–619. DOI: 10.1146/annurev.immunol.021908.132706.

Smyth, Lesley Ann; Herrera, Osquel Barroso; Golshayan, Dela; Lombardi, Giovanna; Lechler, Robert I. (2006): A novel pathway of antigen presentation by dendritic and endothelial cells: Implications for allorecognition and infectious diseases. In: *Transplantation* 82 (1 Suppl), S15–8. DOI: 10.1097/01.tp.0000231347.06149.ca.

Sobiak, Joanna; Kamińska, Jolanta; Głyda, Maciej; Duda, Grażyna; Chrzanowska, Maria (2013): Effect of mycophenolate mofetil on hematological side effects incidence in renal transplant recipients. In: *Clinical transplantation* 27 (4), E407–14. DOI: 10.1111/ctr.12164.

Stegall, M. D.; Dean, P. G.; Gloor, J. (2009): Mechanisms of alloantibody production in sensitized renal allograft recipients. In: *American journal of transplantation : official journal of the American Society of Transplantation and the American Society of Transplant Surgeons* 9 (5), S. 998–1005. DOI: 10.1111/j.1600-6143.2009.02612.x.

Sugimoto, Ken; Ogawa, Atsuhiko; Shimomura, Yasuyo; Nagahama, Kiyotaka; Mizoguchi, Atsushi; Bhan, Atul K. (2007): Inducible IL-12-producing B cells regulate Th2-mediated intestinal inflammation. In: *Gastroenterology* 133 (1), S. 124–136. DOI: 10.1053/j.gastro.2007.03.112.

Sumitran-Holgersson, S.; Wilczek, H. E.; Holgersson, J.; Soderstrom, K. (2002): Identification of the nonclassical HLA molecules, mica, as targets for humoral immunity associated with irreversible rejection of kidney allografts. In: *Transplantation* 74 (2), S. 268–277.

Sun, Qiquan; Cheng, Zhen; Cheng, Dongrui; Chen, Jinsong; Ji, Shuming; Wen, Jiqui et al. (2011): De novo development of circulating anti-endothelial cell antibodies rather than pre-existing antibodies is associated with post-transplant allograft rejection. In: *Kidney International* 79 (6), S. 655–662. DOI: 10.1038/ki.2010.437.

Takeuchi, Osamu; Akira, Shizuo (2010): Pattern recognition receptors and inflammation. In: *Cell* 140 (6), S. 805–820. DOI: 10.1016/j.cell.2010.01.022.

Talmage, D. W.; Dart, G.; Radovich, J.; Lafferty, K. J. (1976): Activation of transplant immunity: effect of donor leukocytes on thyroid allograft rejection. In: *Science (New York, N.Y.)* 191 (4225), S. 385–388.

Tangye, S. G.; Avery, D. T.; Deenick, E. K.; Hodgkin, P. D. (2003): Intrinsic Differences in the Proliferation of Naive and Memory Human B Cells as a Mechanism for Enhanced Secondary Immune Responses. In: *The Journal of Immunology* 170 (2), S. 686–694. DOI: 10.4049/jimmunol.170.2.686.

Tangye, S. G.; Liu, Y. J.; Aversa, G.; Phillips, J. H.; Vries, J. E. de (1998): Identification of functional human splenic memory B cells by expression of CD148 and CD27. In: *The Journal of experimental medicine* 188 (9), S. 1691–1703.

- Terasaki, Paul I. (2003): Humoral theory of transplantation. In: *American journal of transplantation : official journal of the American Society of Transplantation and the American Society of Transplant Surgeons* 3 (6), S. 665–673.
- Terasaki, Paul I.; McCLELLAND, JOHN D. (1964): Microdroplet Assay of Human Serum Cytotoxins. In: *Nature* 204 (4962), S. 998–1000. DOI: 10.1038/204998b0.
- Thaumat, Olivier; Graff-Dubois, Stephanie; Fabien, Nicole; Duthey, Aurelie; Attuil-Audenis, Valerie; Nicoletti, Antonino et al. (2012): A stepwise breakdown of B-cell tolerance occurs within renal allografts during chronic rejection. In: *Kidney International* 81 (2), S. 207–219. DOI: 10.1038/ki.2011.317.
- Thorley, J. D.; Smith, J. W.; Luby, J. P.; Sanford, J. P. (1977): Peripheral blood lymphocyte response to acute infections in humans. In: *Infection and Immunity* 16 (1), S. 110–114.
- Touraine, J. L.; Betuel, H.; Pouteil-Noble, C.; Royo, C. (1989): HLA class II antigens: structure, function, and expression in immunodeficiencies, autoimmune diseases, and allograft rejection. In: *Advances in nephrology from the Necker Hospital* 18, S. 325–334.
- Trivedi, V. B.; Dave, A. P.; Dave, J. M.; Patel, B. C. (2007): Human leukocyte antigen and its role in transplantation biology. In: *Transplantation proceedings* 39 (3), S. 688–693. DOI: 10.1016/j.transproceed.2007.01.066.
- Trpkov, K.; Campbell, P.; Pazderka, F.; Cockfield, S.; Solez, K.; Halloran, P. F. (1996): Pathologic features of acute renal allograft rejection associated with donor-specific antibody, Analysis using the Banff grading schema. In: *Transplantation* 61 (11), S. 1586–1592.
- Tu, Wenwei; Lau, Yu-Lung; Zheng, Jian; Liu, Yinping; Chan, Ping-Lung; Mao, Huawei et al. (2008): Efficient generation of human alloantigen-specific CD4+ regulatory T cells from naive precursors by CD40-activated B cells. In: *Blood* 112 (6), S. 2554–2562. DOI: 10.1182/blood-2008-04-152041.
- Türk, T. R.; Witzke, O.; Zeier, M. (2010): KDIGO-Leitlinien zur Betreuung von Nierentransplantatempfängern. In: *Nephrologie* 5 (2), S. 94–107. DOI: 10.1007/s11560-009-0369-6.
- Valenzuela, Nicole M.; Reed, Elaine F. (2013): Antibodies in Transplantation: The Effects of HLA and Non-HLA Antibody Binding and Mechanisms of Injury. In: *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)* 1034. DOI: 10.1007/978-1-62703-493-7_2.
- van de Berg, Pablo J. E. J.; Hoevenaars, Eveline C.; Yong, Si-La; van Donselaar-van der Pant, Karlijn A. M. I.; van Tellingen, Anne; Florquin, Sandrine et al. (2012): Circulating lymphocyte subsets in different clinical situations after renal transplantation. In: *Immunology* 136 (2), S. 198–207. DOI: 10.1111/j.1365-2567.2012.03570.x.
- Villarroel, Maria Cristina; Hidalgo, Manuel; Jimeno, Antonio (2009): Mycophenolate mofetil: An update. In: *Drugs of today (Barcelona, Spain : 1998)* 45 (7), S. 521–532. DOI: 10.1358/dot.2009.45.7.1384878.
- Waßmuth, Ralf (2005): Einführung in das HLA-System. 2., aktualisierte und erw. Aufl. Landsberg/Lech: ecomed Medizin.
- WEIGERT, MARTIN G.; CESARI, ITALO M.; YONKOVICH, SHIRLEE J.; COHN, MELVIN (1970): Variability in the Lambda Light Chain Sequences of Mouse Antibody. In: *Nature* 228 (5276), S. 1045–1047. DOI: 10.1038/2281045a0.

- Wiebe, C.; Gibson, I. W.; Blydt-Hansen, T. D.; Karpinski, M.; Ho, J.; Storsley, L. J. et al. (2012): Evolution and clinical pathologic correlations of de novo donor-specific HLA antibody post kidney transplant. In: *American journal of transplantation : official journal of the American Society of Transplantation and the American Society of Transplant Surgeons* 12 (5), S. 1157–1167. DOI: 10.1111/j.1600-6143.2012.04013.x.
- Wiseman, Alexander C. (2016): Immunosuppressive Medications. In: *Clinical journal of the American Society of Nephrology : CJASN* 11 (2), S. 332–343. DOI: 10.2215/CJN.08570814.
- Worthington, Judith E.; Martin, Susan; Al-Husseini, Dalia M.; Dyer, Philip A.; Johnson, Robert W. G. (2003): Posttransplantation production of donor HLA-specific antibodies as a predictor of renal transplant outcome. In: *Transplantation* 75 (7), S. 1034–1040. DOI: 10.1097/01.TP.0000055833.65192.3B.
- Yanaba, Koichi; Bouaziz, Jean-David; Matsushita, Takashi; Tsubata, Takeshi; Tedder, Thomas F. (2009): The development and function of regulatory B cells expressing IL-10 (B10 cells) requires antigen receptor diversity and TLR signals. In: *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 182 (12), S. 7459–7472. DOI: 10.4049/jimmunol.0900270.
- Yuan, Fang F.; Watson, Narelle; Sullivan, John S.; Biffin, Sandra; Moses, Jonathan; Geczy, Andrew F.; Chapman, Jeremy R. (2004): Association of Fc gamma receptor IIA polymorphisms with acute renal-allograft rejection. In: *Transplantation* 78 (5), S. 766–769.
- Zachary, Andrea A.; Kopchaliiska, Dessislava; Montgomery, Robert A.; Leffell, Mary S. (2007a): HLA-Specific B Cells. In: *Transplantation* 83 (7), S. 982–988. DOI: 10.1097/01.tp.0000259017.32857.99.
- Zachary, Andrea A.; Kopchaliiska, Dessislava; Montgomery, Robert A.; Leffell, Mary S. (2007b): HLA-specific B cells: I. A method for their detection, quantification, and isolation using HLA tetramers. In: *Transplantation* 83 (7), S. 982–988. DOI: 10.1097/01.tp.0000259017.32857.99.
- Zachary, Andrea A.; Kopchaliiska, Dessislava; Montgomery, Robert A.; Melancon, Joseph K.; Leffell, Mary S. (2007c): HLA-specific B cells: II. Application to transplantation. In: *Transplantation* 83 (7), S. 989–994. DOI: 10.1097/01.tp.0000259019.68244.d7.
- Zeng, Qiang; Ng, Yue-Harn; Singh, Tripti; Jiang, Ke; Sherif, Khaleefathullah A.; Ippolito, Renee et al. (2014): B cells mediate chronic allograft rejection independently of antibody production. In: *The Journal of clinical investigation* 124 (3), S. 1052–1056. DOI: 10.1172/JCI70084.
- Zhang, Qiheng; Cecka, J. Michael; Gjertson, David W.; Ge, Ping; Rose, Marlene L.; Patel, Jignesh K. et al. (2011): HLA and MICA: targets of antibody-mediated rejection in heart transplantation. In: *Transplantation* 91 (10), S. 1153–1158. DOI: 10.1097/TP.0b013e3182157d60.
- Zhang, Qiheng; Liang, Leonard W.; Gjertson, David W.; Lassman, Charles; Wilkinson, Alan H.; Kendrick, Elizabeth et al. (2005): Development of Posttransplant Antidonator HLA Antibodies Is Associated with Acute Humoral Rejection and Early Graft Dysfunction. In: *Transplantation* 79 (5), S. 591–598. DOI: 10.1097/01.TP.0000155246.52249.AC.
- Zhang, Qiheng; Reed, Elaine F. (2016): The importance of non-HLA antibodies in transplantation. In: *Nat Rev Nephrol* 12 (8), S. 484–495.
- Zhang, X.; Reed, E. F. (2009): Effect of antibodies on endothelium. In: *American journal of transplantation : official journal of the American Society of Transplantation and the American Society of Transplant Surgeons* 9 (11), S. 2459–2465. DOI: 10.1111/j.1600-6143.2009.02819.x.

Zhang, Xiaohai; Rozengurt, Enrique; Reed, Elaine F. (2010): HLA class I molecules partner with integrin beta4 to stimulate endothelial cell proliferation and migration. In: *Science signaling* 3 (149), ra85. DOI: 10.1126/scisignal.2001158.

Zhang, Yang; Garcia-Ibanez, Laura; Toellner, Kai-Michael (2016): Regulation of germinal center B-cell differentiation. In: *Immunological reviews* 270 (1), S. 8–19. DOI: 10.1111/imr.12396.

Zou, Y.; Stastny, P. (2010): Role of MICA in the immune response to transplants. In: *Tissue antigens* 76 (3), S. 171–176. DOI: 10.1111/j.1399-0039.2010.01527.x.

Zou, Yizhou; Heinemann, Falko M.; Grosse-Wilde, Hans; Sireci, Guido; Wang, Zhengnan; Lavingia, Bhavna; Stastny, Peter (2006): Detection of anti-MICA antibodies in patients awaiting kidney transplantation, during the post-transplant course, and in eluates from rejected kidney allografts by Luminex flow cytometry. In: *Human immunology* 67 (3), S. 230–237. DOI: 10.1016/j.humimm.2006.02.017.

Zou, Yizhou; Stastny, Peter; Susal, Caner; Dohler, Bernd; Opelz, Gerhard (2007): Antibodies against MICA antigens and kidney-transplant rejection. In: *The New England journal of medicine* 357 (13), S. 1293–1300. DOI: 10.1056/NEJMoa067160.

Danksagung

Zu aller erst möchte ich allen Patienten und Probanden danken, welche mir durch ihre Blutspende diese Forschung ermöglichten.

Ich möchte Prof. Dr. Werner für die Aufnahme in die chirurgische Forschungsgruppe der LMU, sowie für das Überlassen des Forschungsthemas danken. Mein Dank gilt außerdem Prof. Dr. Bazhin. Ihm danke ich für die stetige Unterstützung, für das Korrekturlesen und die Durchsicht meiner Arbeit.

Ein großer Dank gilt meinem Betreuer, Dr. Julian Bucher. Er unterstützte mich stets mit großem Engagement, stand immer mit Rat und Tat für mich zu Verfügung und motivierte mich in den schwierigen Phasen meiner Arbeit. Er führte mich an das wissenschaftliche Arbeiten heran und begeisterte mich für die Chirurgie.

Einen besonderen Dank schulde ich PD Dr. Teresa Kauke. Sie ermöglichte es mir, meine Experimente im Labor für Immunogenetik durchzuführen. Sie war für mich eine stetige Ansprechpartnerin und stand mir jederzeit mit einem fachlichen Rat und hilfreichen Anregungen zur Seite.

Ich danke auch allen MTAs für die kompetente Hilfe im Labor und das freundliche Arbeitsklima. Vor allem bedanke ich mich bei Frau Susanne Kunze, welche mich in die Laborarbeit eingeführt hat und mir in dieser Zeit eine große Hilfe war.

Nicht zuletzt gilt ein besonderer Dank meiner Familie, welche mir während des gesamten Studiums stets finanziell und mental unterstützend zur Seite stand. Ich danke meinen Freunden und meinem Freund Niklas, die während meiner Doktorarbeit und durch das gesamte Studium hindurch immer für mich da waren.

Eidesstattliche Versicherung

Ich, Hemma Kripp, erkläre hiermit an Eides statt,

dass ich die vorliegende Dissertation mit dem Titel

„Etablierung eines Spender-spezifischen IgG ELISpot Assay für das Immunomonitoring nach Transplantation“

selbständig verfasst, mich außer der angegebenen keiner weiteren Hilfsmittel bedient und alle Erkenntnisse, die aus dem Schrifttum ganz oder annähernd übernommen sind, als solche kenntlich gemacht und nach ihrer Herkunft unter Bezeichnung der Fundstelle einzeln nachgewiesen habe.

Ich erkläre des Weiteren, dass die hier vorgelegte Dissertation nicht in gleicher oder in ähnlicher Form bei einer anderen Stelle zur Erlangung eines akademischen Grades eingereicht wurde.

München, den 13.06.2021

Hemma Kripp