

AUS DEM LEHRSTUHL
FÜR CHIRURGIE
Prof. Dr. med. Hans-Jürgen Schlitt
DER FAKULTÄT FÜR MEDIZIN
DER UNIVERSITÄT REGENSBURG

**Studien zur Aufklärung der immunsuppressiven Wirkweise von
mesenchymalen Stammzellen in Kombinationstherapie mit
Mycophenolat-Mofetil**

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin

der
Fakultät für Medizin
der Universität Regensburg

vorgelegt von
Johannes F. P. Steinmann

Regensburg, 2016

AUS DEM LEHRSTUHL
FÜR CHIRURGIE
Prof. Dr. med. Hans-Jürgen Schlitt
DER FAKULTÄT FÜR MEDIZIN
DER UNIVERSITÄT REGENSBURG

**Studien zur Aufklärung der immunsuppressiven Wirkweise von
mesenchymalen Stammzellen in Kombinationstherapie mit
Mycophenolat-Mofetil**

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin

der
Fakultät für Medizin
der Universität Regensburg

vorgelegt von
Johannes F. P. Steinmann

Regensburg, 2016

Dekan: Prof. Dr. Torsten E. Reichert

1. Berichterstatter: Prof. Dr. Marc-H. Dahlke

2. Berichterstatter: PD Dr. Christoph Wiese

Tag der mündlichen Prüfung: 20.06.16 sowie 23.07.16

1	<u>Inhaltsverzeichnis</u>	
1	Inhaltsverzeichnis.....	3
2	Einleitung und Fragestellung	6
2.1	Transplantationsimmunologie und Abstoßung.....	8
2.2	Immunsuppressiva.....	10
2.2.1	Corticoide	10
2.2.2	Calcineurininhibitoren.....	12
2.2.3	M-TOR Inhibitoren	12
2.2.4	Mycophenolat-Mofetil (MMF)	13
2.2.5	Biopharmazeutische Wirkstoffe.....	15
2.3	Antikörper.....	15
2.4	Zelluläre Therapieformen	16
2.5	Stammzellen	16
2.5.1	Embryonale Stammzellen	17
2.5.2	Adulte Stammzellen	18
2.5.3	Hämatopoetische Stammzellen	18
2.5.4	Mesenchymale Stammzellen	18
2.6	Fragestellung	20
3	Materialien.....	21
3.1	Verbrauchsmaterialien	21
3.2	Chemikalien	21
3.3	Kulturmedien	22
3.4	Antikörper.....	22
3.5	Geräte	23
3.6	Programme (Software)	23
3.7	Chirurgisches Material.....	23

3.8	Pharmaka	23
3.9	Versuchstiere	25
3.9.1	ACI-Ratten	25
3.9.2	Lewis-Ratten.....	25
4	Methoden	26
4.1	Rezepte für Waschlösungen und Puffer	26
4.2	Aufarbeitung der Organe und Herstellung einer Zellsuspension.....	26
4.3	Färbung für die durchflusszytometrische Analyse	27
4.4	Durchflusszytometrie	28
4.5	Proben/Pipettierschema	29
4.6	FoxP3-FACS-Färbung.....	30
4.7	Charakterisierung von Zellen in der Durchflusszytometrie	31
4.8	Zellkultur.....	32
4.8.1	Kulturmedium für rMSC	32
4.8.2	Gewinnung der Stammzellen	32
4.9	MSC-Splenozyten Proliferationsassay	33
4.10	Anfertigen von Kryoschnitten.....	34
4.11	Hämatoxylin-Eosin-Färbung (HE-Färbung)	34
4.12	Immunhistochemische Färbung	35
4.13	Beurteilung der Schnitte.....	36
4.14	Interferon- γ Serum-Level ELISA.....	37
4.15	Versuchsaufbau	38
4.15.1	Gruppe 1.....	38
4.15.2	Gruppe 2.....	38
4.15.3	Gruppe 3.....	38
4.15.4	Gruppe 4.....	38

4.15.5	Ziel des Versuchsaufbaus.....	39
4.15.6	Zeitlicher Ablauf des Versuchsaufbaus.....	40
4.16	Operationsverfahren	41
4.16.1	Spendertier.....	41
4.16.2	Empfängertier	41
4.17	Postoperatives Vorgehen	42
4.18	Statistik	45
5	Ergebnisse	46
5.1	Ergebnisse der Durchflusszytometrie.....	46
5.2	MSC aktivieren CD4+ und CD8+ Zellen in sekundär lymphatischen Organen	46
5.3	Transplantatfunktionalität im Versuchsaufbau.....	50
5.4	MSC verzögern die APC Aktivierung in sekundär lymphatischen Organen	51
5.5	Ergebnisse der Immunhistochemie	53
5.5.1	Wirkung von MMF und MSC auf die Adhäsionsmoleküle CD31 und E-Selectin des Endothels	56
5.6	MMF verhindert nicht die Interferon- γ Produktion und ermöglicht die Aktivierung von MSC.....	58
6	Diskussion	60
7	Zusammenfassung	67
8	Summary	69
9	Anhänge	70
9.1	Abbildungsverzeichnis	70
9.2	Literaturverzeichnis	73
10	Danksagung	79

2 Einleitung und Fragestellung

Die mechanistischen Entdeckungen Sir Peter Medawars, zur Abstoßung transplantierte Organe stellen bis heute eine der wichtigsten Erkenntnisse auf dem Weg zur erfolgreichen Implementierung der klinischen Organtransplantation dar. Hierdurch wurde auch das Grundverständnis von Akzeptanz und Abstoßung transplantierte Organe gelegt. Mit Hilfe dieses Wissens, konnte dann 1954 die erste klinische Nierenlebenspende erfolgreich durchgeführt werden. Hierbei handelte es sich um die Nierenlebenspende zwischen eineiigen Zwillingen, folglich eine sogenannte syngene Transplantation. Das Problem der Abstoßung allogene transplantierte Organe war hier somit elegant umgangen, jedoch nicht gelöst worden. Zwischen nicht kompatiblen Spendern und Empfängern (allogene Transplantation) war weiterhin keine Transplantation von Organen möglich. Erst die Einführung von Immunsuppressiva ermöglichte die allogene Transplantation mit ausreichend guter Prognose.

Mit der ersten Herztransplantation am 3. Dezember 1967 durch Christiaan Barnard¹ im südafrikanischen Kapstadt hat sich vieles verändert. Neue Operationstechniken wurden entwickelt und die Immunsuppression verbessert, sodass heute ein Langezeitüberleben der transplantierten Patienten im Gegensatz zu den Anfängen der Transplantationsmedizin mit einigen Einschränkungen erreicht werden kann. Eine erhöhte Lebenserwartung und gesteigerte Morbidität der Bevölkerung innerhalb der Industrienationen führen zu einem erhöhten Bedarf an Spenderorganen aller Art. Die Anzahl der Patienten auf einer Warteliste für ein Organ steigt seit Jahren an. Eine Abflachung dieser Tendenz ist in nächster Zeit nicht absehbar. Oft besteht die einzige Möglichkeit der Therapie in dem Ersatz des erkrankten Organes. Bei einem Spenderorgan besteht bei der allogenen Transplantation die Notwendigkeit zur Immunsuppression. Diese variiert je nach Kompatibilität von Spender und Empfänger, sowie dem transplantierten Organ.

Eine lebenslange Immunsuppression aber, stellt ein erhöhtes Risiko für opportunistische Infektionen dar, die in manchen Fällen so schwer verlaufen können, dass sie mit dem Leben des Patienten nicht mehr vereinbar sind². Dies war auch der Fall bei Louis Washkansky, dem ersten Patienten einer Herztransplantation, der 18 Tage nach der Transplantation an einer Pneumonie unter Immunsuppression verstarb.

Wird die Immunsuppression jedoch zu niedrig eingestellt, riskiert man eine Abstoßungsreaktion gegen das Transplantat und somit den Verlust des transplantierten Organs, im Extremfall sogar des Lebens des Patienten. Aufgrund dieser therapeutischen Ambivalenz sowie der knappen Verfügbarkeit von Spenderorganen, ist die Suche nach alternativen Therapien mit geringerem Nebenwirkungspotential und verbessertem Patientenüberleben ein zentrales Anliegen aller mit der Organtransplantation betrauten klinischen Fachbereiche.

	Herz	Leber	Niere	Pankreas	Lunge
Organspenden (post mortem)	319	899	938	142	324
durchgeführte Transplantationen	325	922	1659	20	303
Empfänger auf Warteliste	972	1815	7645	40	459

Abb. 1: Auszug aus dem Eurotransplant Jahresbericht 2012 ³

2.1 Transplantationsimmunologie und Abstoßung

Immunologisch beruht die Abstoßung eines transplantierten Organs auf der Diversität der Oberflächenantigene von Spender und Empfänger. Man kann hier zwischen Major (MHC) und Minor Antigenen (MiHA) unterscheiden. Major Antigene sind maßgeblich für die Abstoßung von manchen Transplantaten. Besonders für die Nierentransplantation ist eine HLA gematchte Transplantation mit einem besseren Transplantatüberleben belegt⁴. Für erstmalige Lebertransplantationen konnte dies bisher nicht gezeigt werden. Hier scheint ein HLA-Mismatch keinen Einfluss auf die akute Organabstoßung zu haben⁵.

Jedoch sind nicht nur die Major-Antigene relevant für die Akzeptanz eines Organs. Dies kann bei HLA-identischen Verwandten beobachtet werden. Auch hier kommt es, wenn auch relativ verzögert, ohne adäquate Immunsuppression zu einer Abstoßungsreaktion. Verantwortlich dafür sind sogenannte Minor-Antigene, die als körpereigene Proteine von MHC I und II auf der Zelloberfläche präsentiert werden. Bemerkenswert ist die Tatsache, dass auch auf dem männlichen Y-Chromosom codierende Genabschnitte für solche MiHAs zu finden sind, was dazu führt, dass ‚female anti-male‘ Reaktionen auftreten können.

Bei einer Abstoßungsreaktion auf ein transplantiertes Organ kann man zwischen akuter und chronischer Abstoßung unterscheiden. In dieser Arbeit wird ausschließlich die akute Abstoßung untersucht. Diese kann man nochmals in hyperakut, akut direkt, sowie akut indirekt unterscheiden. Die hyperakute Abstoßung spielt sich binnen Minuten nach der Transplantation ab und beruht auf zirkulierenden Antikörpern vor allem des ABO- und Komplement Systems des Empfängers gegen Endothelzellen des Spenders, was eine rasche Thrombosierung der Transplantatgefäße zur Folge hat und unweigerlich den Verlust des Organs bedeutet.

Bei der akuten direkten Abstoßung werden antigenpräsentierende Zellen (APCs) des Spenders, die sich noch in dem Organ befinden, nach Wiederanschluss der Blutgefäße über die Blutbahn in die sekundär-lymphatischen Organe (Lymphknoten, Milz) geschwemmt. Hier erfolgt dann die Präsentation der fremden Antigene durch die fremden APCs und es resultiert eine schnelle Aktivierung der T-Zellen.

Die akut indirekte Abstoßung hingegen beruht auf der „regulären“ Aufnahme des fremden Peptides, dessen Prozessierung im Zellinneren einer APC und der Präsentation des Peptids auf MHC II in der Peripherie oder bevorzugt in sekundär lymphatischen Organen, sowie der

Expression eines kostimulatorischen Signals (CD80/86) ⁶. Hieraus erfolgt die Aktivierung von T- und B-Effektorzellen.

Für die Betreuung transplantierter Patienten ist vor allem die direkt- und indirekt-akute, sowie die chronische Abstoßung von Relevanz, da die hyperakute Abstoßung durch die Kompatibilitätskriterien von Spender und Empfänger der einzelnen Organe weitestgehend ausgeschlossen werden. Zusammenfassend lässt sich sagen, dass in der Regel ohne adäquate Immunsuppression kein ausreichendes Transplantat- und Patientenüberleben gesichert werden kann.

2.2 Immunsuppressiva

2.2.1 Corticoide

Als bisheriger Goldstandard hat sich die Kombinationstherapie verschiedener Gruppen von Immunsuppressiva etabliert. Die älteste und bekannteste Gruppe stellen Glucocorticoide mit Ihrem bekanntesten Vertreter, dem Cortison, dar. Endogen wird diese Stoffgruppe in der Nebennierenrinde synthetisiert. Glukokortikoide wirken genomisch über die Inhibition von NFκB (nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells) sowie intrazelluläre Steroidrezeptoren und nicht-genomisch über plasmamembranständige Rezeptoren. Somit beeinflussen sie die humorale und zelluläre Immunantwort. Bei der genomischen Wirkweise muss jedoch genauer zwischen einer direkten und einer indirekten Wirkweise unterschieden werden⁷. Direkt genomisch wirken Gukokortikoide nach Diffusion in das Zellinnere durch eine intrazelluläre Rezeptorkomplexbildung die in der Folge die Transkription entsprechender antiinflammatorischer Zytokine bedingt. Im Vordergrund stehen hierbei vor allem Lipocortin und Vasocortin. Indirekt erfolgt die Wirkung durch Bindung proinflammatorischer, intrazellulärer Transkriptionsfaktoren (NFκB) an den Gukokortikoid-Rezeptor-Komplex. Durch diesen Wirkmechanismus wird effektiv die Ausschüttung der proinflammatorischen Zytokine TNF-α, Il-1, -3 und -4 vermindert. Kortikoide stellen immer noch die am breitesten angewandte Immunsuppression dar und sind für die meisten Organtransplantationen unverzichtbar, sowohl in der Initiationsphase der Immunsuppression als auch in der Dauertherapie der Patienten. Beispielhaft kann hier die Lebertransplantation genannt werden, bei der sowohl in der Initiationsphase, als auch in der Dauertherapie Kortikosteroide zur Aufrechterhaltung der Immunsuppression eingesetzt werden. Am weitesten verbreitet im klinischen Einsatz ist Prednisolon, der aktive Metabolit des Prednisons.

Jedoch muss auch bei Kortikosteroiden das nicht unerhebliche Nebenwirkungsspektrum beachtet werden. Hierzu zählen in der akuten Anwendung psychische Störungen, Bluthochdruck, Steroiddiabetes und Störungen des weiblichen Zykluses. In der chronischen Anwendung stehen v.a. die erhöhte Infektgefahr, Osteoporose, Wachstumsstörungen bei Kindern, Fettumverteilungstörungen, Muskelschwäche, Glaukom- sowie Kataraktentwicklung und Hautveränderungen im Vordergrund.

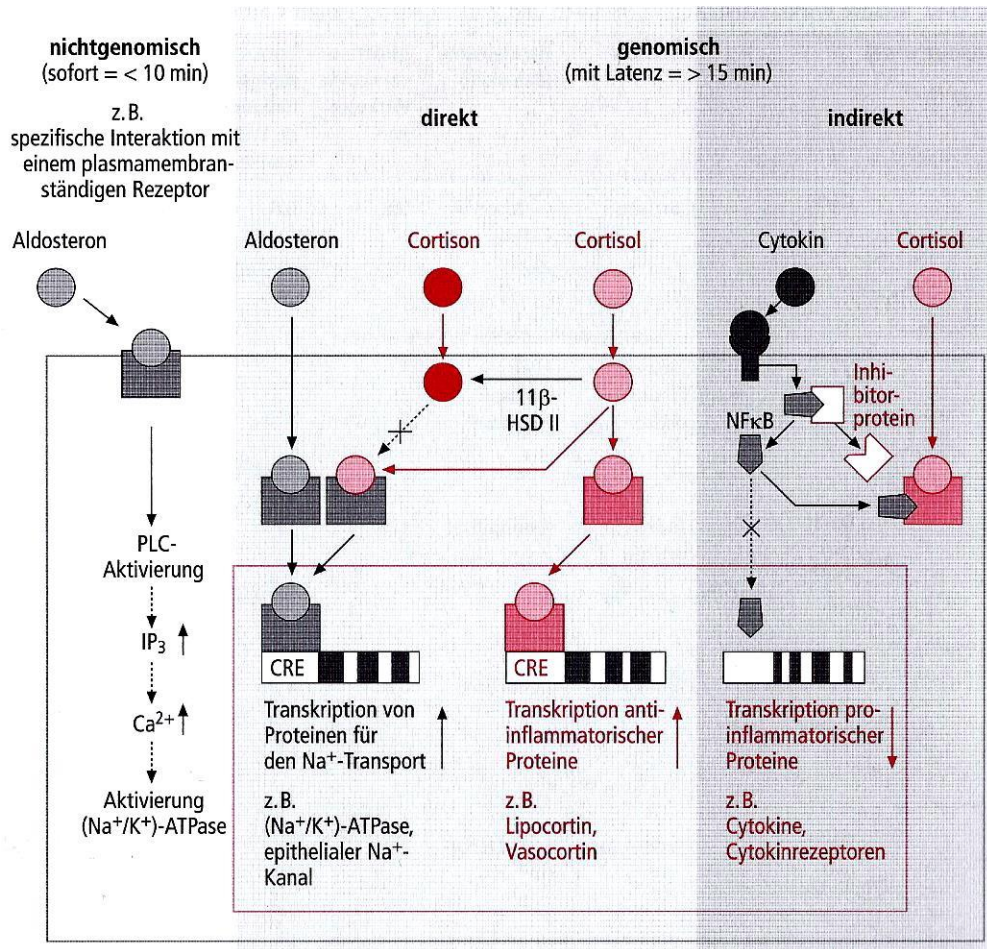


Abb. 2: genomische und nichtgenomische Wirkweise von Cortisol innerhalb der Zelle (Graphik übernommen aus: 7)

2.2.2 Calcineurininhibitoren

Calcineurininhibitoren, zu denen das Cyclosporin A gehört, haben ihren Ansatzpunkt innerhalb der immunsystemaktivierenden Kaskade. Ihr Ziel ist NF-AT (nuclear factor of T-Cell activation), welcher nach der Transkription im Zellkern für die Freisetzung der proinflammatorischen Zytokine IL-2 und INF- γ verantwortlich ist. Dies verhindert eine Aktivierung und Proliferation weiterer T-Zellen, da sich NF-AT vorwiegend in T-Zellen findet. Diese Eigenschaft erklärt die hohe Selektivität der Calcineurininhibitoren auf das Immunsystem und die Tatsache, dass die Proliferation und Antikörperproduktion von B-Lymphozyten weitgehend unbeeinträchtigt bleibt⁷. Als neuerer Vertreter der Calcineurininhibitoren wird seit 1994 Tacrolimus eingesetzt. Dessen Wirkweise ist vergleichbar mit der des Cyclosporins, jedoch besitzt es ein günstigeres Nebenwirkungsprofil⁸. Es scheint sich zudem ein verbessertes Transplantatüberleben bei ähnlichem Nebenwirkungspotential, sowie eine durch die oralen Einnahmeveroraussetzungen bedingte verbesserte Patientencompliance, herauszukristallisieren⁹.

2.2.3 M-TOR Inhibitoren

Als weitere Substanzen zur Immunsuppression haben sich in den letzten Jahren Rapamycin (Syn. Sirolimus) und Everolimus bewährt. Diese dem Tacrolimus strukturell sehr ähnlichen Substanzen gehören chemisch ebenfalls zu den Makroliden und werden genau, zumindest Sirolimus betreffend, wie Cyclosporin, aus einem Röhrenpilz gewonnen. Everolimus wird synthetisch hergestellt. Der Unterschied zum Cyclosporin besteht in dem differenten Wirkort. Rapamycin inhibiert mTOR (mammalian target of Rapamycin) durch die Bindung an das zytosolisch vorkommende FK-Bindungsprotein-12 (FKBP-12) und beeinflusst somit direkt die Proliferation immunoaktiver T- und B-Zellen, jedoch ist die Wirkung nicht nur auf diese Zellen beschränkt. Auch die Proliferation von hämatopoetischen und nicht hämatopoetischen Zellen wird beeinflusst⁷. Die Zellen verharren hier im G1-Stadium des Zellzyklus. In neueren Studien wird Everolimus auch additiv zur Therapie solider Tumore (Nierenzellkarzinom) eingesetzt¹⁰.

2.2.4 Mycophenolat-Mofetil (MMF)

Ein weiteres, in der Transplantationsmedizin weit verbreitetes Immunsuppressivum ist Mycophenolat-Mofetil (MMF), welches aufgrund seiner speziellen Wirkweise und seines Nebenwirkungsprofils auch in unserem Versuchsaufbau Anwendung findet. Als modernes Immunsuppressivum hat es sich bereits in vorangegangenen Versuchen unserer Arbeitsgruppe als Medikament der Wahl in Kombination mit einer allogenen mesenchymalen Stammzelltherapie herauskristallisiert¹¹. Die spezielle Wirkweise bestimmt hierbei erheblich die klinischen Eigenschaften und die Verwendung in unserem Versuchsaufbau. Mycophenolat-Mofetil ist ein Mofetil-Ester und ein Prodrug der Mycophenolsäure, welche aus dem Pilz *Penicillium brevicompactum* gewonnen wird. Die Estergruppe erhöht die orale Bioverfügbarkeit und macht somit eine Einnahme durch den Patienten selbst möglich.

Der Ansatzpunkt des Medikamentes liegt in der De-Novo-Synthese der Purinbiosynthese, welche für die Proliferation von Geweben und Zellen mit hohem Zellumsatz von großer Bedeutung ist. Durch die Ausschaltung dieses biochemisch relevanten Weges ist nur noch die Gewinnung von Purinen durch den zelleigenen Recyclingmechanismus, dem Salvage-Pathway, der Zellen möglich. Die Inhibition erfolgt durch die Blockade des Enzyms Inositolmonophosphat-Dehydrogenase (IMPDH) welches für die Umwandlung von Insositolmonophosphat zu Guanosinmonophosphat verantwortlich ist, und den geschwindigkeitsbestimmenden Schritt der De-Novo-Synthese darstellt. Besonders günstig wirkt sich die pharmakologische Eigenschaft von MMF aus, ein etwa fünffach stärkerer Inhibitor des Isoenzym IMPDH2 als des Isoenzym IMPDH1 zu sein. Die IMPDH2 ist vor allem in aktivierten T- und B-Lymphozyten zu finden, im Gegensatz zu der Isoform IMPDH1, die vorrangig als „Housekeeping-Enzym“ in allen weiteren Zelltypen anzutreffen ist. So ist eine vorwiegende Proliferationsinhibition von T- und B-Lymphozyten gewährleistet, ohne andere Zelllinien übermäßig zu beeinflussen.

Zudem wird in der Literatur berichtet, dass MMF durch die Inhibition der IMPDH lymphatische Zellen im G1/S-Zellzyklusarrest hält und durch ein Nekrosesignal aktivierte T-Zellen eliminiert. Diese Eigenschaft ist bisher nur für MMF beschrieben¹². Des Weiteren wird durch den Einsatz von MMF eine dosisabhängige Migrations- und Adhärenzreduktion der durch Zytokine aktivierten Leukozyten erreicht. Verantwortlich hierfür ist eine verminderte Expression verschiedener Adhäsionsmoleküle, vor allem ICAM1, VCAM1, E-Selectin, P-Selectin, die durch inflammatorische Zytokine hochreguliert und durch MMF beeinflusst werden. Indirekt wird

somit auch die Produktion proinflammatorischer Zytokine, welche von aktivierten Zellen des Immunsystems in entzündlich veränderten Geweben produziert werden, beeinflusst.

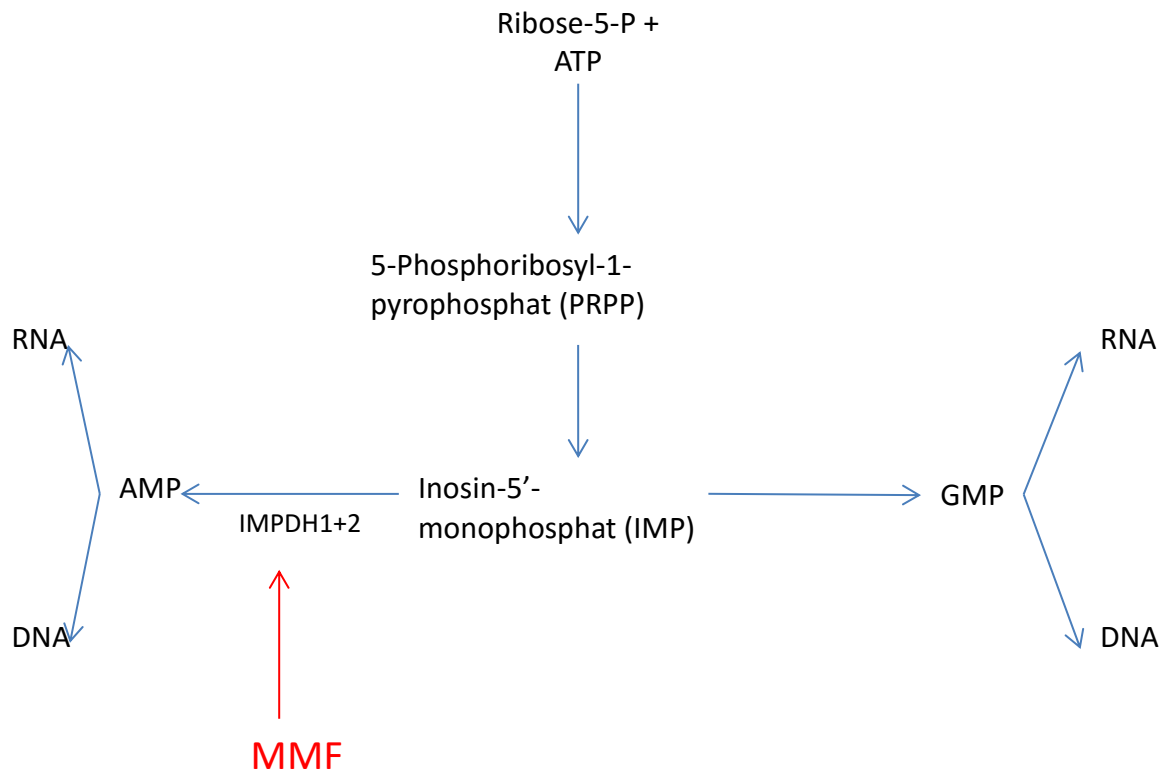


Abb. 3: Wirkmechanismus von MMF auf die De-Novo-Purin-Biosynthese^{13,14} (mod. Darstellung nach Allison *et al*)

2.2.5 Biopharmazeutische Wirkstoffe

2.3 Antikörper

Ein weiterer wichtiger Baustein in der immunsuppressiven Therapie sind Biopharmazeutika, sog. Biologicals. Meist handelt es sich bei denen in der Transplantationsmedizin eingesetzten Arzneimitteln um monoklonale Antikörper, welche speziell für einen Angriffspunkt innerhalb des Immunsystems entwickelt wurden. Vor allem proinflammatorische Zytokine wie IL-6, TNF- α , INF- γ , sowie CD-Antigene von T- und B-Zellen stellen hier die bisher genutzten Ziele der immunsuppressiven Therapie dar. Die Anwendung dieser Biologicals ist jedoch aufgrund ihrer zum Teil gravierenden Nebenwirkungen nicht unumstritten.

Antikörper werden aktuell vor allem zur Induktion der Immunsuppression nach Transplantation eingesetzt. Als beispielhafter Vertreter können Basiliximab (Simulect®) und Daclizumab (Antikörper gegen CD25 = IL-2 Rezeptor) genannt werden. Diese können bereits prophylaktisch zur Prävention einer Organabstoßung nach der Transplantation verabreicht werden. Vor allem in der Leber, Nieren und Herztransplantation wird dies angewandt. Die Zulassung für Daclizumab wurde allerdings von Herstellerseite bereits zurückgenommen, sodass aktuell nur Basiliximab zur Anwendung kommt. Ebenfalls zur Verhinderung der akuten Abstoßung einer transplantierten Niere wurde Alemtuzumab (Anti-CD52-Antikörper, MabCampath®, Lemtrada®) eingesetzt. Hierbei handelt es sich jedoch um eine Anwendung außerhalb der definierten Zulassung, einen „Off-Label-Use“. Auch MabCampath® wurde bereits außer Handel genommen, sodass nur noch das für die Therapie der Multiplen Sklerose zugelassene Lemtrada® als CD52 Antikörper zur Verfügung steht. In der Phase der akuten Abstoßung, wird bei Versagen der Steroidtherapie auf Muromonab (Anti-CD3-Antikörper, OCT3®) zurückgegriffen, es ist jedoch mit erheblichen Nebenwirkungen, sowie einer Immunisierung des Empfängers gegen die murinen Bestandteile des Medikamentes, zu rechnen. Als weiterer Wirkstoff zur Therapie einer akuten Abstoßung wird ATG (Anti-Thymozytenglobulin) verwendet. ATG ist im Gegensatz zu den vorher genannten Antikörper ein polyklonaler Antikörper der ebenfalls zur Abstoßungstherapie bei akuter Abstoßung eingesetzt wird. Durch den polyklonalen Charakter werden durch ATG alle Immunzelltypen (Lymphozyten, Makrophagen, NK-Zellen, dendritische Zellen) depletiert.

2.4 Zelluläre Therapieformen

Im Rahmen von Studien werden zurzeit verschiedene Arten von sowohl syngenem als auch allogenen Zellen zur Unterstützung der immunsuppressiven Therapie verwendet. Vor allem bei der in der Knochenmarktransplantation gefürchteten Graft-versus-host-disease (GVHD) hat sich eine supportive Therapie mit mesenchymalen Stammzellen bereits etabliert¹⁵. Auch regulatorische T-Zellen, sogenannte T-Regs, die eine Subpopulation der CD4⁺-Zellen darstellen und durch ihre Oberflächenmarker CD4-CD25-FOXP3¹⁶ gekennzeichnet sind, werden seit einigen Jahren im Versuchsstadium zur Therapie von Abstoßungsreaktionen, vor allem der GVHD eingesetzt. Ihre Wirkweise beruht, soweit bisher bekannt, vor allem auf der Inhibition der IL-2 Produktion¹⁷. Hierfür wird ein direkter Zell-Zell-Kontakt zwischen T-Reg und T-Effektorzelle benötigt.

Als weiteres aussichtsreiches Therapeutikum in diesem Sektor haben sich in neueren experimentellen Tierstudien mesenchymale Stammzellen präsentiert. Es wird postuliert, dass mit ihrer Hilfe eine Transplantatabstoßung in Kombination mit dem Immunsuppressivum Mycophenolat-Mofetil eine Organabstoßungsreaktion mit einer Kurzzeitsuppressionstherapie verhindern lässt¹¹.

2.5 Stammzellen

Generell werden drei verschiedene Typen von Stammzellen unterschieden. Embryonale, hämatopoetische und mesenchymale Stammzellen. Jede dieser drei verschiedenen Zelllinien besitzt eine eigene Potenz zur Differenzierung in ihre stammzelltypischen Gewebe. Es ließ sich jedoch auch beobachten, dass Stammzellen nicht nur in ihr spezifisches Gewebe differenzieren, sondern auch andere Gewebe nachbilden können^{18 19 20}. Diese Fähigkeit wird Plastizität genannt, der Vorgang Transdifferenzierung. Embryonale Stammzellen werden als pluripotent definiert und besitzen die Möglichkeit sich in fast jeden Gewebetyp zu differenzieren, zudem besitzen sie die Fähigkeit sich unbegrenzt selbst zu erneuern. Die Forschung und Anwendung dieser Zellen gestaltet sich aus ethischen und rechtlichen Gründen in der Bundesrepublik Deutschland schwierig. Zudem besitzen embryonale Stammzellen ein hohes tumorigenes Potential im Organismus^{21 22}.

2.5.1 Embryonale Stammzellen

Embryonale Stammzellen werden bis zum 8-Zell-Stadium des Embryos als totipotent bezeichnet und können bis zu diesem Zeitpunkt einen kompletten Organismus regenerieren. Ab dem 8-Zell-Stadium verlieren die Zellen die Fähigkeit in extraembryonales Gewebe zu differenzieren und werden ab diesem Zeitpunkt als pluripotent bezeichnet. Sie können in Gewebe aller Keimblätter differenzieren und bieten somit hervorragende Voraussetzungen für eine Vielzahl medizinischer Anwendungen und Forschungsprojekte. Jedoch muss unter ethischen Gesichtspunkten bedacht werden, dass auch, wenn embryonale Stammzellen in vitro gut kultivierbar und expandierbar sind, zu deren erstmaliger Gewinnung Embryonen dienen. Hier stehen sich das Recht des Kranken auf Heilung und der Schutz des ungeborenen Lebens diametral gegenüber. Ein weiterer Aspekt der aktuell gegen die Anwendung von embryonalen Stammzellen am Menschen spricht, sind Hinweise im Tierversuch auf ein tumorigenes Potential embryonaler Stammzellen²³, bedingt durch die hohe Teilungs- und Differenzierungsfähigkeit der Zellen.

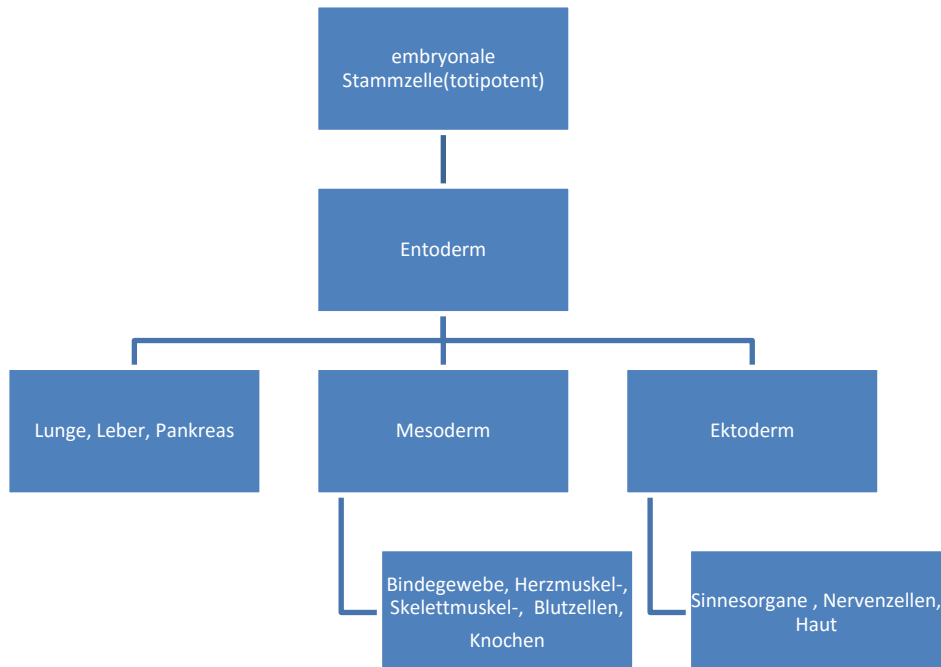


Abb. 4: Differenzierung embryonaler Stammzellen in die jeweiligen Gewebe

2.5.2 Adulte Stammzellen

Adulte Stammzellen haben in der Regel die Fähigkeit, nur in das für sie bestimmte Gewebe zu differenzieren. Sie stellen somit sicher, dass ein ständiger Reparatur- und Erneuerungskreislauf erhalten bleibt²⁴.

2.5.3 Hämatopoetische Stammzellen

Hämatopoetische Stammzellen haben die Möglichkeit, sich durch Zellteilung und Differenzierung zu allen zellulären Blutbestandteilen zu entwickeln. Sie finden sich vorwiegend im Knochenmark und können leicht durch Pharmakotherapie aus dem Knochenmark ins periphere Blut mobilisiert werden, wo sie durch Apherese gewonnen werden können. Auch eine Gewinnung mittels Knochenmarkpunktion ist möglich und relativ einfach durchführbar.

2.5.4 Mesenchymale Stammzellen

Mesenchymale Stammzellen (MSC), oder nach neuerer Nomenklatur *multipotent mesenchymal stromal cell*²⁵, finden sich in der höchsten Konzentration im Knochenmark, sind jedoch nicht der hämatopoetischen Linie zuzuordnen. Vereinzelt können sie auch im peripheren Blut und Organen sowie der Zahnpulpa nachgewiesen werden. Sie besitzen die Fähigkeit in Knochen-, Knorpel- und Fettgewebe unter Stimulation zu differenzieren²⁶. Auch eine Differenzierung in nicht mesodermales Gewebe wie Nerven und Haut (ektodermales Gewebe) sowie Lunge, Darm, Pankreas und Leber (Entoderm) wird beschrieben. In Vitro wurde unter Stimulation auch die Differenzierung zu Kardiomyozyten beobachtet. Therapeutisch werden mesenchymale Stammzellen heute bereits mit Erfolg bei Herzinfarkten, Erkrankungen des Knochen oder des Knorpels in Studien eingesetzt.

Immunologisch gestaltet es sich schwierig, MSC rein anhand ihrer Oberflächenmarker zu bestimmen, da bisher kein MSC spezifischer Oberflächenmarker bekannt ist und somit nur das Expressionsmuster verschiedener Marker aussagekräftig ist. Kennzeichnend für MSC ist die starke Expression der Oberflächenmarker MHC I, Thy1 (CD90) und CD73, sowie eine schwache Expression von CD80 und eine Nichtausprägung der Oberflächenmarker MHC II, CD4, CD25, CD31, CD34, CD45, CD80, CD86 und HLA-DR²⁷. Kostimulatorische Signale werden von ihnen nicht exprimiert, was die Aktivierung von T-Zellen durch MSC beeinträchtigt.

Vereinfachend für die genaue Identifikation von MSC aus der Knochenmarkzellpopulation ist ihre Plastikadhärenz sowie die mikroskopische Ähnlichkeit zu Fibroblasten und die Expandierbarkeit in der Zellkultur, die sie von den anderen Zellen weitgehend unterscheidet. Letztendliche Sicherheit bezüglich des kultivierten Zelltypus bringt jedoch nur eine Differenzierung in MSC typisches Gewebe (Adipozyten, Chondrozyten und Osteoblasten) durch Stimulation. Diese Differenzierung wurde zur Überprüfung der Zellen der angelegten Zellkultur in unserer Arbeitsgruppe durchgeführt.

2.6 Fragestellung

Im Rahmen dieser Doktorarbeit sollten mehrere Fragen bezüglich des zeitlichen Ablaufes der akuten Abstoßung und des immunologischen Mechanismus der akuten Abstoßung geklärt werden. Hierfür wurde ein Rattentiermodell gewählt. Es wurden Herzen von LEW-Ratten in die Abdominalhöhle von ACI-Ratten transplantiert. Mesenchymale LEW Stammzellen wurden am Tag der Transplantation in die Schwanzvene der vorgesehenen Empfängertiere injiziert. Zudem wurde das Immunsuppressivum MMF den vorbestimmten Tieren verabreicht. Vor allem die weitere Untersuchung des synergistischen Effektes der MMF Co-Therapie mit mesenchymalen Stammzellen stand hierbei im Vordergrund. Der genaue Wirkmechanismus und die Interaktion der mesenchymalen Stammzellen sowie deren Interaktion mit anderen Zellen des Immunsystems sind unklar und Gegenstand der Untersuchungen, die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführt wurden.

Folgende Fragen wurden bearbeitet:

1. Welche Rolle spielen antigenpräsentierende Zellen und T-Effektor-Zellen in der Phase der akuten Abstoßung?
2. Wie unterscheidet sich immunhistochemisch die Transplantatinfiltration durch Immunozyten bei Versuchs- und Kontrolltieren?
3. Welche Rolle spielt das proinflammatorisch wichtige Zytokin INF- γ bei der Co-Therapie?

3 Materialien

3.1 Verbrauchsmaterialien

96-Well Platte, Rundboden	Corning Inc., NY, USA
FACS-Tubes, groß	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht
FACS-Tubes, klein	Corning Inc., NY, USA
Pipettenspitzen, weiß, gelb, blau	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht
Einmalpipetten, 2-50ml	Greiner Bio-One AG, Kremsmünster
Filterpapier, gefaltet, 90mm	Sartorius, Göttingen
Objektträger, Superfrost	Menzel GmbH & Co KG, Braunschweig
Objektträger, Mattrand, geschnitten	Menzel GmbH & Co KG, Braunschweig
Deckgläser, 24x50mm	VWR International GmbH, Darmstadt
Tissue-Tek Fixiergel	Sakura Finetek Europe, Zoeterwoude, NL
Kryo-Tubes	Thermo Fisher Scientific, Langenselbold
EDTA-Röhrchen 1,3ml	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht
Zentrifugenröhrchen 50ml	Greiner Bio-One AG, Kremsmünster
Zentrifugenröhrchen 14ml	Greiner Bio-One AG, Kremsmünster
Zellkulturflaschen 75ccm	Corning GmbH, Kaiserslautern

3.2 Chemikalien

Aceton	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München
Dest. Wasser	Eigenproduktion, UKR
PBS, Dulbecco's	PAA Laboratories GmbH, Pasching, AUT
Trypsin	Merck KGaA, Darmstadt
FoxP3 Staining-Kit	eBioscience, NatuTec GmbH, Frankfurt
FACS-Puffer	Eigenproduktion, UKR
Mycophenolat-Mofetil in 5% Glc-Lsg	Roche, Basel, Schweiz
Hämalaun	Eigenproduktion, UKR
Eosin	Merck KGaA, Darmstadt
VybrantR CFDA SE Cell Tracer Kit	Invitrogen GmbH, Karlsruhe

3.3 Kulturmedien

DMEM, GIBCO®	Invitrogen GmbH, Karlsruhe
FCS 10%	Invitrogen GmbH, Karlsruhe
GlutaMAX I	Invitrogen GmbH, Karlsruhe
HEPES (=2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure)	Invitrogen GmbH, Karlsruhe

Kulturmedium: DMEM, 1% AS, 10mM/l HEPES, 100 U/l Penicillin, 100µg/ml Streptomycin, 2mM L-Glutamin, 10% FCS

3.4 Antikörper

CD3-Bio 1:200	BD Bioscience, Erembodegem, BEL
CD4-FITC 1:200	Invitrogen GmbH, Karlsruhe
CD8-PerCP 1:200	BD Bioscience, Erembodegem, BEL
CD25-Bio 1:200	BD Bioscience, Erembodegem, BEL
CD26-PE 1:200	BD Bioscience, Erembodegem, BEL
CD28-PE 1:200	BD Bioscience, Erembodegem, BEL
CD31-unmarkiert 1:400	BD Bioscience, Erembodegem, BEL
CD45R-FITC 1:200	BD Bioscience, Erembodegem, BEL
CD80-Bio 1:200	BD Bioscience, Erembodegem, BEL
CD86-Bio 1:200	BD Bioscience, Erembodegem, BEL
CD90.1-APC 1:200	eBioscience, NatuTec GmbH, Frankfurt
E-Selektin-unmarkiert 1:600	BD Bioscience, Erembodegem, BEL
ICAM1-unmarkiert 1:600	Eigenproduktion der MHH
Ox6-FITC 1:200	BD Bioscience, Erembodegem, BEL
Ox6-unmarkiert 1:400	Eigenproduktion, MHH
Ox62-PE 1:200	Santa Cruz Biotechnology Inc., Heidelberg
R73-unmarkiert 1:50	Eigenproduktion, MHH
SA-APC 1:100	BD Bioscience, Erembodegem, BEL
SA-PE 1:100	BD Bioscience, Erembodegem, BEL
FoxP3-APC 1:75	eBioscience, NatuTec GmbH, Frankfurt
FoxP3-PerCP 1:75	eBioscience, NatuTec GmbH, Frankfurt
NMS 1:10	Eigenproduktion, UKR

3.5 Geräte

Pipetten 2-1000µl	Eppendorf AG, Hamburg
Pipettierhilfe (Pipetus)	Hirschmann Laborgeräte, Eberstadt
Zentrifugen	Heraeus, Hanau
Mikroskop	Zeiss, Jena
Schüttler (Immunhistochemie)	Heidolph Instruments GmbH & Co.KG
FACSCalibur	BD Bioscience, Erembodegem, BEL
Sterilbank (Lamin-Air)	Heraeus, Hanau
Magnetrührer	Heidolph Instruments GmbH & Co.KG
Brutschrank (Cytoperm)	Heraeus, Hanau
Wasserbad	GFL, Burgwedel

3.6 Programme (Software)

Microsoft Office Word 2007	Microsoft Dtl. GmbH, Unterschleißheim
Windows XP Professional	Microsoft Dtl. GmbH, Unterschleißheim
Graph Pad Prism 5	GraphPad Software, La Jolla, CA, USA
Flow Jo V7.5	Tree Star Inc., OR, USA
EndNote X7	Thomson Reuters Corp., New York, USA

3.7 Chirurgisches Material

Nahtmaterial	BBraun, Melsungen
Einmalskalpelle Fig.10	Feather Safety Razor Co., Ltd., Japan
Desinfektionsmittel	BBraun Melsungen AG, Melsungen
Tabotamb	Johnson & Johnson GmbH, Neuss

3.8 Pharmaka

Äther	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München
Isofluran	Baxter Deutschland GmbH, Unterschleißheim

Xylazin Bernburg 2%

Ketamin 10%

Streptomycin 100 µg/ml

Penicillin 100 U/ml

Serumwerk Bernburg AG, Bernburg

WDT, Garbsen

Seromed, Deisenhofen

Seromed, Deisenhofen

3.9 Versuchstiere

Bei allen in den Versuchen verwendeten Tieren (Ratten) handelt es sich um Inzuchttiere, die sich vor allem in der genetischen Unterschiedlichkeit ihres RT1-Rezeptors (=MHC II) unterscheiden. Für unseren Versuchsaufbau wurden ACI und LEW-Ratten aufgrund ihrer immunologischen Inkompatibilität ausgewählt. Die Versuchstiere hatten zum Versuchszeitpunkt ein Gewicht zwischen 150g und 200g, entsprechend etwa einem Alter von 3 Monaten. Gehalten wurden alle Versuchstiere unter Standardbedingungen (Gruppenhaltung, 12h Hell-Dunkel-Rhythmus, freier Zugang zu Wasser und Nahrung, klimatisierte Raumtemperatur) im Tierstall des Forschungsbaus H4 der Universitätsklinik Regensburg. Regelmäßig fanden tierpflegerische und veterinärmedizinische Kontrollen der Zuchtbestände statt. Die Halte- und Zuchtbedingungen entsprachen den behördlichen Vorgaben. Die Tierversuchsanträge liegen durch den AG-Leiter (Prof. Dahlke) vor.

3.9.1 ACI-Ratten

Die Versuchstiere wurden aus der hauseigenen Zucht entnommen und unter Standardbedingungen im Tierstall des Forschungsbaus herangezogen. Der MHC Klasse I Haplotyp dieser Tiere ist als RT1^a charakterisiert.

3.9.2 Lewis-Ratten

Lewis Ratten entstanden durch Zucht aus Wistar-Ratten durch Dr. Lewis (1950). Die Ratten wurden in der 37. Generation als Inzuchtstamm weitergezüchtet und besitzen den MHC Klasse I Haplotyp RT1^l. Bezogen wurden die Tiere aus dem Zuchtbestand von Charles River, Sulzfeld, Deutschland.

4 Methoden

4.1 Rezepte für Waschlösungen und Puffer

FACS Puffer: 2,5g BSA, 0,5g NaN_3 , 500ml PBS

Erylyse-Puffer: 414,5mg NH_4Cl , 50mg KHCO_3 , 2,1mg EDTA, 50ml Aqua dest.

4.2 Aufarbeitung der Organe und Herstellung einer Zellsuspension

Nach der Entnahme von Herz, Milz, Blut, abdominalen Lymphknoten und dem Oberschenkelknochen des Versuchstieres werden die einzelnen Proben nun für die weiteren Untersuchungen aufbereitet.

Zuerst wird das transplantierte Herz entnommen. Das Herz wird für die spätere immunhistochemische Analyse in 3 Teile geschnitten (Apex, rechter und linker Ventrikel) und sofort in flüssigem Stickstoff kryokonserviert. Danach werden die Milz sowie die abdominalen/mesenterialen Lymphknoten sowie ein Oberschenkelknochen zur Gewinnung des Knochenmarks in dieser Reihenfolge entnommen. Milz, aLK (abdominelle Lymphknoten) und Knochenmark werden mit Hilfe des Stempels einer 2ml Einmalspritze durch ein $100\mu\text{m}$ Zellsieb gedrückt, darunter in einem 14ml Zentrifugenröhrchen, gefüllt mit PBS, aufgefangen. So wird eine homogene Einzelzellsuspension erreicht. Das Knochenmark wird auf gleiche Weise gewonnen wie das für die Zellkultur benötigte Material.

4.3 Färbung für die durchflusszytometrische Analyse

Nach der Aufarbeitung der entnommenen Organe und Organteile werden die Zellen weiter für die durchflusszytometrische Analyse aufbereitet. Zuerst wird die Suspension bei 1500rpm 5min abzentrifugiert und der Überstand verworfen. Das so entstandene Zellpellet wird in 1ml FACS-Medium resuspendiert. Es werden ca. 2×10^7 Zellen (20-100 μ l Zellsuspension) in die Wells einer 96-Well-Platte nach Pipettierschema einpipettiert. Zu der in den Wells befindlichen Zellsuspension wird nun 10 μ l natürliches Mausserum gegeben und resuspendiert, um eine unspezifische Bildung der monoklonalen Antikörper an Epitope der Zielzellen zu verhindern („Fc-Block“). Die Zellen werden folgend wieder bei 1500rpm 2min abzentrifugiert und der Überstand verworfen. Nun können die Primär-Antikörperverdünnungen laut Pipettierschema auf das entstandene Zellpellet aufgebracht und die Platte für 20 min bei 4°C inkubiert werden. Nach der Inkubationszeit werden die Zellen wieder abzentrifugiert, mit 150 μ l FACS-Puffer überschichtet und nochmals abzentrifugiert sowie die Überstände verworfen, bevor die sekundären Antikörper über das Zellpellet gegeben und resuspendiert werden. Um eine ausreichende Antigen-Antikörperbindung zu erreichen, müssen die Zellen wieder für 20min bei 4°C inkubiert werden. Nach einem erneuten Waschvorgang mit FACS-Puffer werden die Zellen in 180 μ l FACS-Puffer aufgenommen und in FACS-Tubes überführt.

4.4 Durchflusszytometrie

Bei der Durchflusszytometrie handelt es sich um ein Messverfahren welches mit Hilfe von Laserstrahlen verschiedener Wellenlängen eine genaue Analyse von Zellpopulationen erlaubt. Durch die Lichtstreuung der Zellen kann eine Aussage über deren Granularität (SSC = Side Scatter), durch die Lichtbrechung über deren Größe getroffen werden (FSC = Forward Scatter). Durch die Markierung von CD-Antigenen der Zellen mit spezifisch fluoreszierenden Antikörpern können je nach Fragestellung weitere Aussagen getroffen werden. Je höher die detektierte Fluoreszenz, desto häufiger ist das markierte Antigen auf der Zelloberfläche einer Zelle vorhanden. Hierfür werden weitere Laserquellen (Kanäle) benötigt die den jeweiligen Fluoreszenzfarbstoff, mit welchem der Antikörper markiert wurde, in seiner spezifischen Wellenlänge anregen. Das emittierte Licht wird dann detektiert. Alleine durch die Analyse von Größe und Granularität können schon verlässliche Aussagen etwa über die zelluläre Zusammensetzung von Blut gemacht werden. Eine Aussage über deren Aktivierungsgrad ist hiermit jedoch nicht möglich. Auch eine Differenzierung innerhalb einer Zellpopulation (z.B. T- und B-Lymphozyten) kann nur durch den Einsatz markierter Antikörper erfolgen. Wichtig bei der Analyse der Zellen ist, dass jeweils nur eine Zelle die Detektoren passiert, anderenfalls würde es zu verfälschten Ergebnissen kommen. Erreicht wird dies durch die Vereinzelung der Zellen in einem schnell fließendem ‚Analysestrom‘ aus FACS-Puffer und einer der Zellsuspension angepassten Ansaugrate der Probe. So können trotzdem große Zellzahlen in kurzer Zeit analysiert werden. Eine Zellzahl von 300/min stellt kein Problem dar.

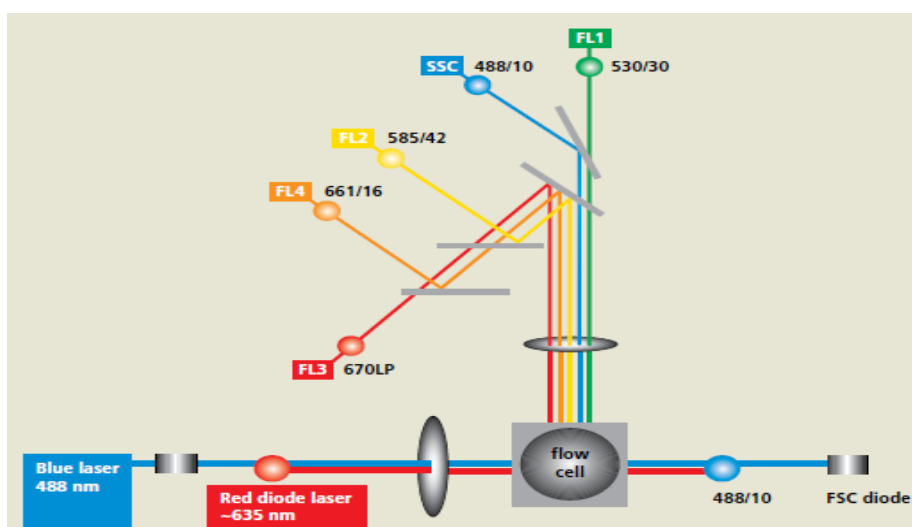


Abb. 5: Schematischer Aufbau des FACScalibur Durchflusszytometers (übernommen aus²⁸⁾)

4.5 Proben/Pipettierschema

<u>1</u> Milz + NMS + CD4-FITC + CD25-Bio + SA-PE + FoxP3-APC	<u>2</u> Knochenmark + NMS + CD4-FITC + CD25-Bio + SA-PE + FoxP3- APC	<u>3</u> Blut + NMS + CD4-FITC + CD25-Bio + SA-PE + FoxP3- APC	<u>4</u> aLK + NMS + CD4-FITC + CD25-Bio + SA-PE + FoxP3- APC	<u>5</u> Milz + NMS + CD3-Bio + CD4-FITC + CD8-PerCP + CD26-PE + SA-APC	<u>6</u> Knochenmark + NMS + CD3-Bio + CD4-FITC + CD8-PerCP + CD26-PE + SA-APC	<u>7</u> Blut + NMS + CD3-Bio + CD4-FITC + CD8-PerCP + CD26-PE + SA-APC	<u>8</u> aLK + NMS + CD3-Bio + CD4-FITC + CD8-PerCP + CD26-PE + SA-APC
<u>9</u> Milz + NMS + CD3-Bio + CD4-FITC + CD8-PerCP + CD90.1-APC + SA-PE	<u>10</u> Knochenmark + NMS + CD3-Bio + CD4-FITC + CD8-PerCP + CD90.1-APC + SA-PE	<u>11</u> Blut + NMS + CD3-Bio + CD4-FITC + CD8-PerCP + CD90.1-APC + SA-PE	<u>12</u> aLK + NMS + CD3-Bio + CD4-FITC + CD8-PerCP + CD90.1-APC + SA-PE	<u>13</u> Milz + NMS + CD3-Bio + CD4-FITC + CD8-PerCP + CD28-PE + SA-APC	<u>14</u> Knochenmark + NMS + CD3-Bio + CD4-FITC + CD8-PerCP + CD28-PE + SA-APC	<u>15</u> Blut + NMS + CD3-Bio + CD4-FITC + CD8-PerCP + CD28-PE + SA-APC	<u>16</u> aLK + NMS + CD3-Bio + CD4-FITC + CD8-PerCP + CD28-PE + SA-APC
<u>17</u> Milz + NMS + CD45R-FITC	<u>18</u> Knochenmark + NMS + CD45R-FITC	<u>19</u> Blut + NMS + CD45R-FITC	<u>20</u> aLK + NMS + CD45R-FITC	<u>21</u> Milz + NMS + Ox6-FITC + Ox62-PE + CD80-Bio + SA-APC	<u>22</u> Knochenmark + NMS + Ox6-FITC + Ox62-PE + CD80-Bio + SA-APC	<u>23</u> Blut + NMS + Ox6-FITC + Ox62-PE + CD80-Bio + SA-APC	<u>24</u> aLK + NMS + Ox6-FITC + Ox62-PE + CD80-Bio + SA-APC
<u>25</u> Milz + NMS + Ox6-FITC + Ox62-PE + CD86-Bio + SA-APC	<u>26</u> Knochenmark + NMS + Ox6-FITC + Ox62-PE + CD86-Bio + SA-APC	<u>27</u> Blut + NMS + Ox6-FITC + Ox62-PE + CD86-Bio + SA-APC	<u>28</u> aLK + NMS + Ox6-FITC + Ox62-PE + CD86-Bio + SA-APC	<u>29</u> Milz + CD4-FITC	<u>30</u> Milz + Ox6-PE	<u>31</u> Milz + PI	<u>32</u> Milz + CD3-Bio + SA-APC

Abb. 6: Pipettierschema der Proben und hinzugefügter Antikörper auf einer 96-Well Rundboden-Platte

Die unterschiedlichen, den Proben zugegebenen Antikörper, ermöglichen eine Differenzierung zwischen den Zelltypen sowie deren Aktivierungsgrad in den zu untersuchenden Proben. Ebenso erfolgt eine Kontrolle der Färbung sowie die Differenzierung von avitalem Zellmaterial (durch Proprium Iodid) in den letzten 4 zu messenden Wells.

4.6 FoxP3-FACS-Färbung

Bei der intrazellulären Färbung von FoxP3 wird ein abgewandeltes Färbeverfahren angewandt. Zuerst werden 100-300µl Zellsuspension direkt in FACS-Tubes gegeben. Dies ist nötig, da bei dieser Art zu färben mehr Zellen zerstört und/oder verloren gehen. Daher wird eine größere Zellzahl benötigt. Nun wird bei 1500rpm und 4°C 2min abzentrifugiert. Im folgenden Text wird dieser Vorgang nur noch als ‚abzentrifugieren‘ beschrieben.

Es wird 10µl NMS über die Zellen geschichtet und resuspendiert, anschließend mit 150µl FACS-Puffer verdünnt und wieder abzentrifugiert. Die Färbung mit gegen CD4 und CD25 gerichteten Anti-Ratten-Antikörpern kann jetzt erfolgen. Nach zwanzigminütiger Inkubationszeit bei 4°C wird mit 150µl FACS-Puffern überschichtet und abzentrifugiert, danach wird der sekundäre Färbeschritt mit Streptavidin-Phycoerythrin (SA-PE) Antikörpern durchgeführt und eine erneute Inkubation bei 4°C für 20 Minuten eingehalten. Nun wird wieder mit FACS-Puffer gewaschen und abzentrifugiert. Das Zellpellet wird anschließend mit der Fix/Perm Working Solution überschichtet, kurz gevortext und dann für 1-18h bei 4°C im abgedunkelten Raum inkubiert. Nach der Inkubationsphase wird mit 1ml FACS-Puffer und direkt danach zweimalig mit 2ml Permeabilisationspuffer gewaschen und zentrifugiert, der Überstand jeweils verworfen. Auf das Zellpellet wird eine 1:10 verdünnte FoxP3 Staining Solution gegeben, resuspendiert und anschließend für 30 min bei 4°C inkubiert. Zur Reinigung wird noch zweimalig mit Permeabilisationspuffer gewaschen und abzentrifugiert. Das nun noch übrige Zellpellet wird in 200µl FACS-Puffer aufgenommen und resuspendiert.

Eine durchflusszytometrische Analyse ist jetzt jederzeit möglich.

4.7 Charakterisierung von Zellen in der Durchflusszytometrie

Die für unsere Untersuchungen interessanten Zellpopulationen befinden sich ausschließlich in dem für Leukozyten charakteristischen ‚Gate‘. Ein solches ‚Gate‘ ist eine durch den Untersucher gesetzte (zunächst 2-dimensionale) Grenze, die im jeweiligen FACS-Plot die zu untersuchende Zellpopulation ein-, sowie die anderen Signale im Plot ausschließt. Beispielhaft für alle erfolgten FACS-Färbungen, sollen hier die entsprechenden ‚Gates‘ dargestellt werden. Diese differieren in ihrem Inhalt je nach Färbung geringfügig und bedürfen einer Anpassung durch den Untersuchenden.

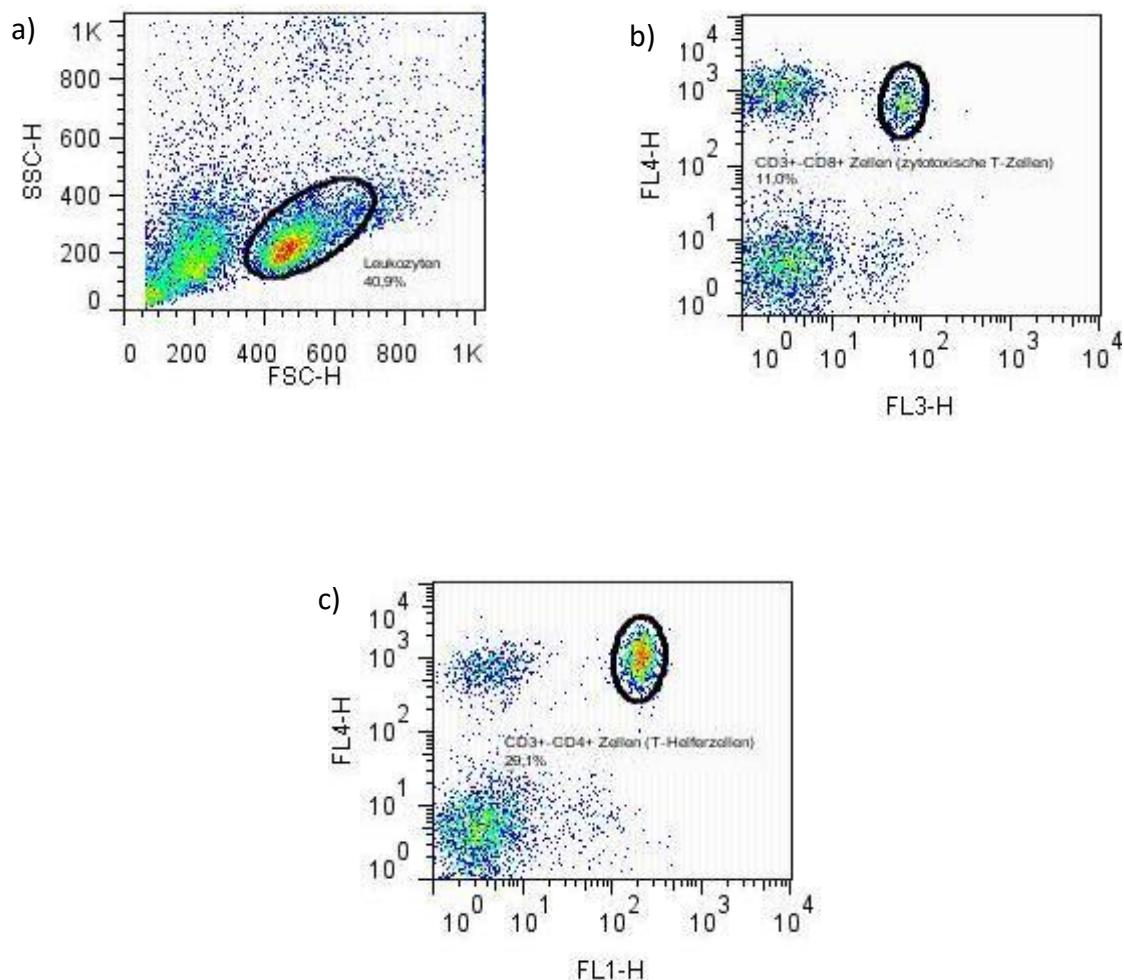


Abb. 7: a) Leukozyten-Gate im FSC/SSC-Scatter (Differenzierung der Zellen nach Größe und Granularität)
 b) CD3+-Zellen (APC;FL4) und CD8+ Zellen (PerCP;FL3) (Differenzierung zwischen nativen und reifen CD8+ T-Zellen)
 c) CD3+-Zellen (APC;FL4) und CD4+ Zellen (FITC; FL1) (Differenzierung zwischen nativen und reifen CD4+ T-Zellen)

4.8 Zellkultur

4.8.1 Kulturmedium für rMSC

Als Kulturmedium für die MSC dient 500ml Dulbecco's modified Eagle's Medium (DMEM), welches zusätzlich mit 50ml fetalem Rinderserum (FCS), 1% Penicillin/Streptomycin sowie 1% Glutamin versetzt wird.

4.8.2 Gewinnung der Stammzellen

Um die mesenchymalen Stammzellen für die Zellkultur zu gewinnen, wird eine Lewis Ratte zuerst mit Sevofluran in Narkose versetzt und anschließend durch zervikale Dislokation getötet. Es wird an der medio-anterioren Seite des Beines ein Schnitt mittels einer Schere gesetzt um eine weitere Präparation des Oberschenkelknochens zu erlauben. Nachdem dieser freigelegt wurde, wird er einerseits auf der Höhe des Kniegelenkes und andererseits möglichst proximal zum Hüftgelenk abgesetzt. Der so gewonnene Oberschenkelknochen wird in steriles PBS eingelegt in der Sterilbank mit ebenfalls sterilem Kulturmedium mit einer 5ml Spritze und Kanüle Typ Nr.1 durchgespült. Die so ausgewaschenen Zellen werden durch ein 5µm Zellsieb gefiltert und vereinzelt. Die Zellsuspension wird nun in ein 50ml Falcontube überführt und 5min mit 1500rpm bei 4°C abzentrifugiert und anschließend in 15ml Kulturmedium resuspendiert. Danach wird die so gewonnene Suspension auf Zellkulturflaschen (175ccm) aufgeteilt.

Alle 24h erfolgt ein Mediumwechsel, um die rMSC, die inzwischen plastikadhärent sind, von den restlichen Zellen des Knochenmarks zu trennen. Um eine möglichst hohe Reinheit der rMSC zu gewährleisten wurden vorher Differenzierungsexperimente durchgeführt aus denen ersichtlich wurde, dass die Zellen in Passage 6-8 den höchsten Reinheitsgrad aufweisen.

Sobald die Zellen in der Kulturflasche ein ausreichend dichtes Wachstum aufweisen, welches durch ein dreidimensionales Wachstum unter dem Durchlichtmikroskop gekennzeichnet ist, werden sie mit 3ml 1% Trypsinlösung für 1-3 Min unter mikroskopischer Kontrolle von dem Kulturflaschenboden gelöst. Nach dem Ablösen wird der Vorgang durch Zugabe von 15ml Kulturmedium abgestoppt und die sich nun in Lösung befindlichen Zellen auf mehrere neue Kulturflaschen verteilt, sodass sich ca. 2mio Zellen in einer Kulturflasche befinden. Das fehlende Volumen wird mit Kulturmedium auf 15ml ergänzt.

4.9 MSC-Splenozyten Proliferationsassay

Um den Einfluss mesenchymaler Stammzellen und INF- γ auf die Splenozytenproliferation zu untersuchen, werden ACI-Splenozyten einer ACI-Ratten-Milz in Einzelzellsuspension wie oben beschrieben überführt und mit Erylysepuffer behandelt. Die so gewonnene erythrozytenfreie Zellsuspension wird mit dem Farbstoff CFSE (Carboxyfluorescein-succinimidyl-ester) behandelt. CFSE diffundiert frei in die zu färbenden Zellen und bildet dort nach Abspaltung seiner Acetyl-Gruppe mit intrazellulären Aminen fluoreszierende Komplexe, die nicht mehr durch die Zellmembran diffundieren können. Bei jeder Zellteilung wird die Menge des fluoreszierenden Materials halbiert, dies ermöglicht eine Aussage über die Proliferation der zu untersuchenden Zellen anhand der Fluoreszenzintensität. Für die Färbung werden $1,5 \times 10^5$ Splenozyten unter sterilen Bedingungen mit PBS gewaschen und gemäß des Herstellerprotokolls des CFSE-Staining-Kits gefärbt. Die gefärbten Zellen werden nun mit ConA (Convalin-A, 2 ng/ml) und INF- γ (50 U/ml) stimuliert und mit Lewis-MSC in einem Verhältnis von 5:1 (Splenozyten/MSC) in 200 μ l Kulturmedium in eine 96-Well-Platte gegeben. Als Kulturmedium wird hier RPMI versetzt mit 0.1% 50mM 2-mercaptoethanol, 1% MEM-nicht-essentielle Aminosäuren, HEPES-Puffer, 1% 100mM Natrium-Pyruvat, Penicillin/Streptomycin, MEM Vitamin solution, 1% 200mM L-Glutamin und 10% FCS benutzt. Nach 4 Tagen Inkubationszeit erfolgt die Auswertung des Assays mittels Durchflusszytometrie.

Splenozyten + ConA	Splenozyten + ConA + MSC	Splenozyten + ConA + MSC + INF γ
--------------------	--------------------------	---

Abb. 8: Pipettierschema für die Inkubation des Proliferationsassays

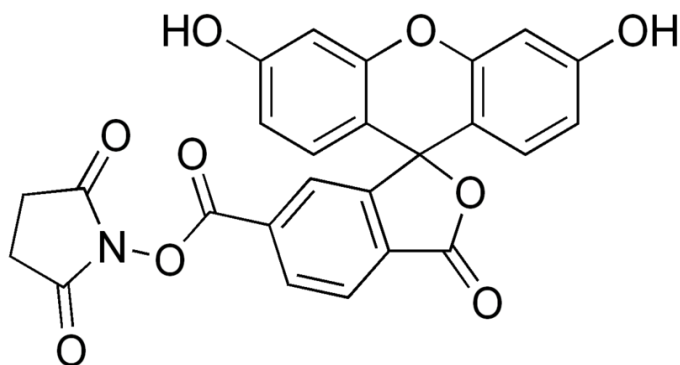


Abb. 9: molekulare Struktur von CFSE

4.10 Anfertigen von Kryoschnitten

Nachdem das Transplantat gemäß dem Versuchsschema wieder entnommen und bei -80°C verwahrt wurde, erfolgt die weitere feingewebliche Untersuchung des Materials.

Das bei -80°C gelagerte Gewebe wird aus den Kryotubes genommen und auf die für das Kryotom geeigneten Trägerplatten mittels Kryogel aufgebracht. Es werden pro Probe acht Schnitte, möglichst in Reihe, in einer Schichtdicke von 10-20µm angefertigt um genügend Reservematerial für eventuelle Nachuntersuchungen bzw. weitere Fragenstellungen zu haben. Danach wird das restliche Gewebematerial wieder bei -80°C verwahrt. Die Gewonnenen Gewebeschnitte werden auf Glasobjektträger für die folgenden Gewebefärbungen aufgebracht und bis zur weiteren Verwendung min 12h bei Raumlufttemperatur verwahrt. Beim Aufbringen der Gewebe wird auf eine faltenfreie Auflage auf dem Objektträger geachtet, sodass keine Gewebeüberlagerung stattfinden kann.

4.11 Hämatoxylin-Eosin-Färbung (HE-Färbung)

Die HE-Färbung ist eine schnelle und einfach durchzuführende Methode bei der feingeweblichen Untersuchung zur Unterscheidung und Beurteilung unterschiedlichster Zellstrukturen. So färbt Hämalaun, welches einen basischen Farbstoff darstellt, alle basophilen Strukturen einer Zelle blau. Eosin ist ein synthetischer Farbstoff der die azidophilen Strukturen der Zellen rötlich färbt. Dazu zählen vor allem die Plasmaproteine der Zelle.

Die zuvor angefertigten und bei Raumluft gelagerten Kryoschnitte werden nun für 5 min in ein Acetonbad getaucht um die Schnitte auf der Objektträgeroberfläche zu fixieren. Nach dem Bad werden sie für einige Stunden bei Raumtemperatur zum Trocknen gelagert. Nach dem Trocknen folgt mit dem Bad in Hämalaunlösung (unverdünnt) der erste Färbeschritt. Die Hämalaunlösung wurde zuvor nach folgendem Rezept in unserem Labor hergestellt: 1g Hämatoxilin, 1l Aqua dest., 0,2g Natriumjodat (NaJO₃), 50g Aluminiumkaliumsulfat, 50g Chloralhydrat sowie 1g Zitronensäure. Hier verbleiben die Proben für 7-15 min. Anschließend werden sie für 15min unter laufendem Leitungswasser gebläut. Der 2. Färbeschritt besteht aus dem Eosin-Bad, in welchem die Schnitte für 30s-2min verbleiben, bevor sie kurz mit dest. Wasser gewaschen werden. Nun erfolgt schrittweise die Entwässerung der Präparate mit Ethanol in aufsteigender Konzentration, 1min 70%, 2min 96%, 2min 100%. Nach der Entwässerung werden die Präparate für 1min in Xylol eingetaucht und gleich anschließend mit Deckgläsern und Eukitt eingedeckt.

4.12 Immunhistochemische Färbung

Als immunhistochemische Färbungen werden feingewebliche Untersuchungen bezeichnet, bei denen mit Hilfe von Antikörpern, Proteine auf Zelloberflächen mikroskopisch detektierbar gemacht werden. Entscheidend für das Gelingen der Untersuchung ist die sorgfältige Etablierung der Antikörper auf dem zu untersuchenden Gewebe, da nur so eine unspezifische Bindung der Antikörper mit hinreichender Sicherheit ausgeschlossen werden kann. Zur Etablierung der Färbungen wurden für jeden der verwendeten Antikörper eine Verdünnungsreihe angelegt und Dünnschnitte damit gefärbt. Für die weiteren Untersuchungen wurde diejenige Antikörperverdünnung ausgewählt, welche mikroskopisch betrachtet, die geringste Anzahl falsch positiv gefärbter Zellen zu richtig positiv gefärbten Zellen erbrachte.

Die Fixierung der Schnitte erfolgt auf gleiche Weise wie bei der HE-Färbung. Danach werden die Gewebeproben auf den Objektträgern vorsichtig mit einem Fettstift umrahmt um eine Auslaufbarriere für den Antikörper zu schaffen. Um eine unspezifische Bindung der Antikörper zu verhindern, müssen diese Bindungsstellen vor dem Färben abgesättigt werden. Dies erfolgt bei diesen Färbungen mit Normalserum der Ziege, der Spezies des sekundären Antikörpers. Um eine adäquate Absättigung zu gewährleisten wird das normale Ziegen Serum (NZS) im Verhältnis 1:10 mit PBS verdünnt und die Präparate mit 100µl der Lösung überschichtet. Zur Inkubation werden die Objektträger für 20min auf den Schüttler gestellt. Nach der Inkubationsphase wird das aufgetragene Serum abgekippt und der primäre Antikörper (R73, ICAM1, Ox6) aufgetragen und die Präparate abermals für 20min auf dem Schüttler inkubiert. Nach dem ersten Färbeschritt werden nicht gebundene Antikörper durch dreimaliges Waschen mit PBS in einer Färbewanne entfernt. Danach wird der sekundäre Antikörper Goat-anit-rat-POX (GAR-POX) in der Verdünnung 1:50 mit PBS auf die Objektträger geschichtet und die Präparate wieder für 20min auf dem Schüttler inkubiert.

Die Substratentwicklung erfolgt nach erneutem dreimaligem Waschen in PBS mit POX-AP-Lösung. Diese wird für 20min auf die Objektträger gegeben und danach mit Leitungswasser abgewaschen. Als letzter Färbeschritt erfolgt nun die Gegenfärbung mit Hämalaun um die Zellkerne genau zu demarkieren. Hierfür werden die Objektträger für 30s in die Färbewanne mit Hämalaun gegeben und nach dem Färben in Leitungswasser gebläut. Anschließend erfolgt das Eindecken mit auf 60°C erwärmter Glyceringelatine.

4.13 Beurteilung der Schnitte

Die Beurteilung der immunhistochemisch gefärbten Kryoschnitte erfolgt durch zwei Untersucher aus der Arbeitsgruppe voneinander unabhängig. Hierzu wird die prozentuale Anzahl der positiv gefärbten Zellen pro high-power-field (HPF) (40x Vergrößerung) bewertet. Pro Schnitt und Auswerter werden 5 HPF begutachtet und ein Immunhistochemie-Score (IHS) nach Soslow²⁹ durchgeführt. Dieser beinhaltet zum einen den geschätzten prozentualen Anteil der gefärbten Zellen (quantity score), sowie zum anderen die geschätzte Intensität der Färbung (staining intensity score). Die Rohdaten beider Untersucher werden dann zum IHS (Immunhistochemiescore), indem die Scores beider Untersucher miteinander multipliziert werden.

Score	% Anteil gefärbter Zellen
1	0-25%
2	26-50%
3	51-75%
4	76-100%

Score	Intensität
0	negativ
1	gering
2	mittelgeradig
3	stark

Abb. 10: Auswertungsschema und Bildung des IHS (Immunhistochemie-Score) der immunhistochemisch behandelten Feingewebsschnitte

4.14 Interferon- γ Serum-Level ELISA

Die Serum INF- γ Level der Versuchstiere werden mittels eines Sandwich-ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay) erhoben. Dieser wurde als ‚ready to use-KIT‘ von der Firma BD Biosciences bezogen und die Proben der Tiere anhand des vorgeschriebenen Herstellerprotokoll behandelt. Zuerst werden die wells der 96-well-Platte mit dem Capture-Antikörper beschichtet und über 12h bei 4°C inkubiert, danach mit Puffer gewaschen und anschließend mit FBS (fetal-bovine-serum) geblockt, um Kreuzreaktionen zu verhindern. Folgend werden die Proben in die Wells gegeben und wieder für 2h inkubiert. Nach einem erneuten Waschvorgang wird der Detektionsantikörper einpipettiert und für 1h inkubiert. Nach nochmaligem Waschen erfolgt die Entwicklung der HRP-markierten Antikörper über 30min. Anschließend wird die Reaktion durch die Zugabe von 1M H₃PO₄-Lösung gestoppt und die Absorption gemessen. Die Auswertung erfolgt mittels eines Plate-Readers bei einer Lichtwellenlänge von 450nm.

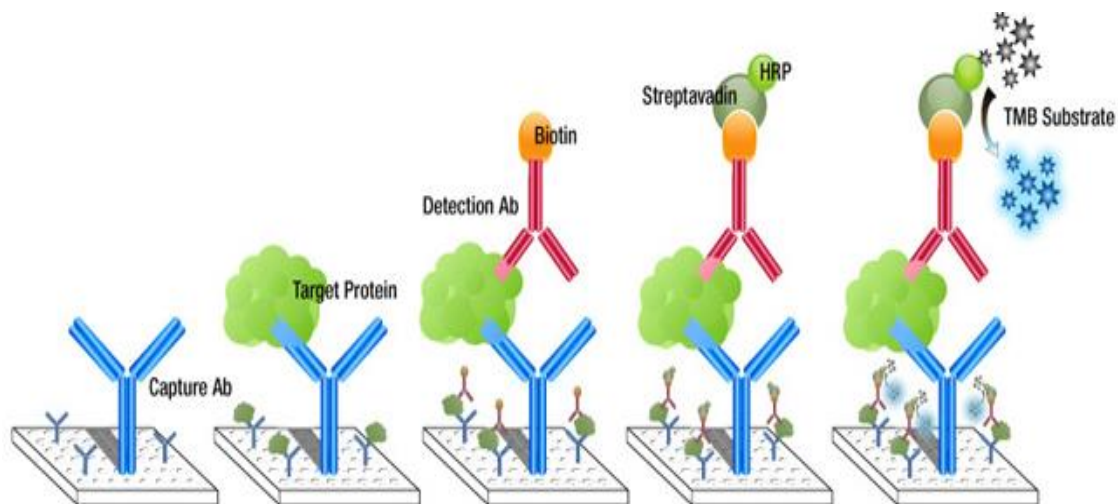


Abb. 11: Aufbau und Funktionsweise eines ELISA-Tests (©abcam®)³⁰

4.15 Versuchsaufbau

Die gewonnenen und kultivierten LEW-rMSC werden den ACI-Ratten der Gruppe 2 und 4 am Tag -4 in die Schwanzvene injiziert. Die heterologe, heterotope Herztransplantation eines LEW-Herzes erfolgt bei allen Gruppen am Tag 0. Danach wird nach folgendem Gruppenschema verfahren.

4.15.1 Gruppe 1

Die Tiere werden ohne weitere Immunsuppression oder Stammzelltherapie transplantiert.

4.15.2 Gruppe 2

Die Tiere erhalten zusätzlich zur Herztransplantation eine Stammzelltherapie mit LEW-rMSC am Tag -4.

4.15.3 Gruppe 3

Die Tiere erhalten zusätzlich zur Herztransplantation eine Therapie mit Mycophenolat-Mofetil (MMF) für 8 Tage inklusive Tag 0.

4.15.4 Gruppe 4

Die Tiere erhalten zusätzlich zur Herztransplantation eine Stammzelltherapie mit LEW-rMSC am Tag -4 und zusätzlich eine Therapie mit Mycophenolat-Mofetil (MMF) für 8 Tage inklusive Tag 0.

Alle Tiere werden gemäß ihrem Schema behandelt und an den entsprechenden Auswertungstagen getötet und aufgearbeitet.

Tag der Auswertung	Tag 0	Tag 1	Tag 3	Tag 10
Gruppe 1 (HTx)	Tier 1-3	Tier 4-6	Tier 7-9	Tier 10-12
Gruppe2 (HTx+rMSC)	Tier 13-15	Tier 16-18	Tier 19-21	Tier 22-24
Gruppe3 (HTx+MMF)	Tier 25-27	Tier 28-30	Tier 31-33	Tier 34-36
Gruppe4 (HTx+MMF+rMSC)	Tier 37-39	Tier 40-42	Tier 43-45	Tier 46-48

Abb. 12: Einteilung und Nummerierung der Versuchstiere im Versuchsaufbau

4.15.5 Ziel des Veruchsaufbaus

Um eine genauere Vorstellung der immunologischen Mechanismen zu bekommen, wird besonderes Augenmerk in den Analysen auf die antigen-präsentierenden Zellen (APCs) und deren Migration und Infiltration in das transplantierte Organ gelegt. Dazu werden die gewonnenen Zellen und Gewebe wie beschrieben untersucht. Im von den Versuchstieren gewonnenen peripheren Blut wird mittels ELISA Essay die Konzentration von INF- γ bestimmt, um zu versuchen den wichtigen Einfluss von INF- γ nicht nur in-vitro³¹, sondern auch in-vivo zu beweisen

4.15.6 Zeitlicher Ablauf des Versuchsaufbaus

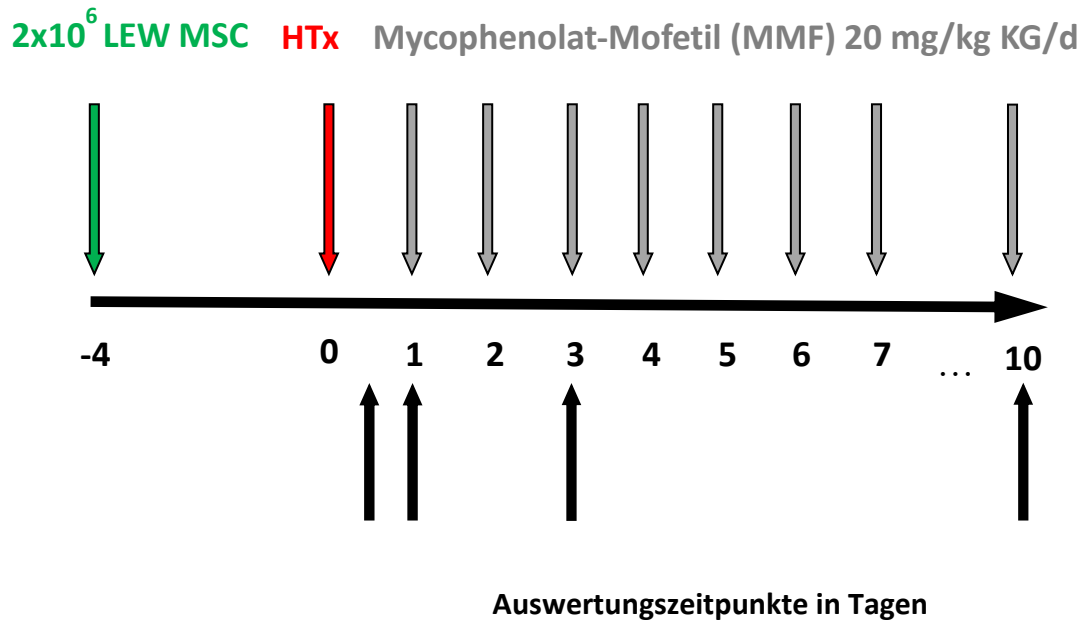


Abb. 13: Zeitlicher Ablauf des Versuchsaufbaus, Zeiten der Medikationsverabreichung sowie Auswertezeitpunkte der Versuchstiere

Am Tag -4 vor der Transplantation werden den vorgesehenen Ratten über die Schwanzvene 2×10^6 LEW MSC gespritzt. Am Tag 0 erfolgt die allogene Transplantation des LEW Spenderherzens in die Abdominalhöhle des ACI Tieres. Ab dem Tag 0 erfolgt ebenfalls die Injektion von (20mg MMF/kg BW) im 24 Stunden Rhythmus bis Tag 7 in die Schwanzvene der Tiere. Die Auswertung erfolgt wie bereits beschrieben an den Zeitpunkten 12 Stunden, Tag1, Tag 3 und Tag 10.

4.16 Operationsverfahren

4.16.1 Spendertier

Die Spenderratte wird mit einer Ketamin-Xylanzin Intraperitonealanästhesie narkotisiert. Es wird sowohl der Thorax als auch das Abdomen eröffnet um Zugang zu den großen Bauch- und Thoraxgefäßen zu erlangen. Im Abdomen wird die Vena Cava dargestellt und 20 I.E Heparin injiziert. Anschließend werden alle zum Herzen zu- und abführenden Gefäße mit einigen Millimetern Abstand zum Organ ligiert (Aorta, V. cava superior et inferior, A. und Vv. pulmonalis). Das Spenderherz wird entnommen und mit einer sterilen Kochsalzlösung gespült. Anschließend wird es bis zur Transplantation in sterilem PBS Puffer konserviert.

4.16.2 Empfängertier

Die Empfängerratte wird ebenfalls narkotisiert. Der operative Zugang zu den großen Bauchgefäßen erfolgt mittels medianer Laparotomie. Aorta und A. pulmonalis des Spenderorgans werden End-to-side mit Aorta abdominalis und V. cava inferior des Empfängertieres unter Zuhilfenahme eines Mikroskops oder einer Lupe anastomosiert. Während der Prozedur wird der Blutfluss in der Aorta mittels Bulldog-Klemmen unterhalb der Nierenarterien und proximal der Bifurcation der V. cava unterbrochen um einen möglichst geringen Blutverlust zu gewährleisten. Zu beachten ist dabei, dass die kalte Ischämiezeit eine Stunde nicht übersteigen sollte, da sich zeigte, dass eine verlängerte Zeit mit einer erhöhten postoperativen Mortalität des Empfängertieres verbunden ist. Zudem sind die Organe und durchtrennte Muskeln stets mit einem befeuchteten Tuch nass zu halten. Nach erfolgreicher Transplantation und Rückverlagerung der Bauchorgane an ihre anatomische Position erfolgt der Verschluss des Abdomens mittels fortlaufender Nahttechnik. Anschließend werden die Tiere zur weiteren postoperativen Überwachung und Analgesie zurück in die Tierstallungen verbracht. Dort steht ihnen zudem eine Wärmequelle zur Verfügung. Die Überwachung findet durch fachkundiges Personal statt.

4.17 Postoperatives Vorgehen

Nach der Operation erfolgt eine tägliche Kontrolle der Funktionalität des Transplantates mittels manueller Palpation. Dabei wird die Ratte mit der einen Hand am Schwanz gegriffen, mit der anderen Hand wird vorsichtig das Abdomen von beiden Seiten her palpiert. Zusätzlich zu den täglichen palpatorischen Kontrollen, werden die Tiere tierpflegerisch und veterinärmedizinisch im Forschungsbau H4 der Universitätsklinik Regensburg unter Standardbedingungen gehalten und überwacht.



Abb. 14: tägliche palpatorische Kontrolle der Transplantatvitalität



Abb. 15: Entnahme des Transplantates (hier bereits erfolgt), Milz, Femur, Blutproben sowie der abdominalen Lymphknoten

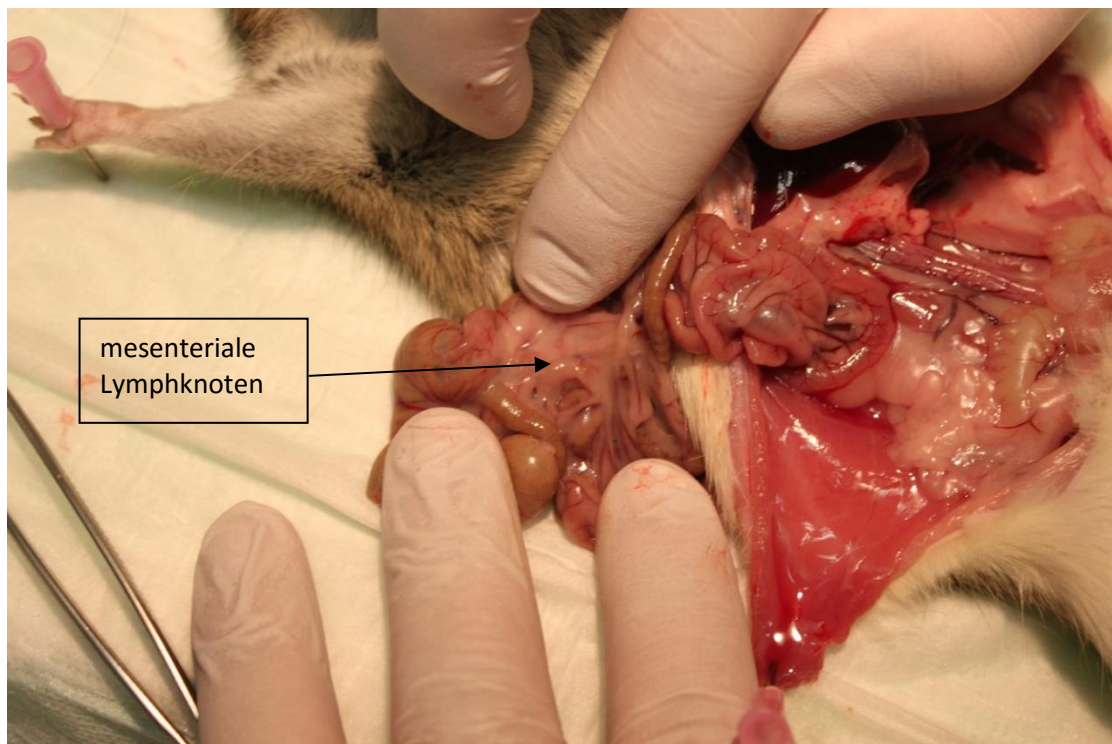


Abb. 16: Darstellung mesenterialer Lymphknoten vor der Entnahme und Aufbereitung

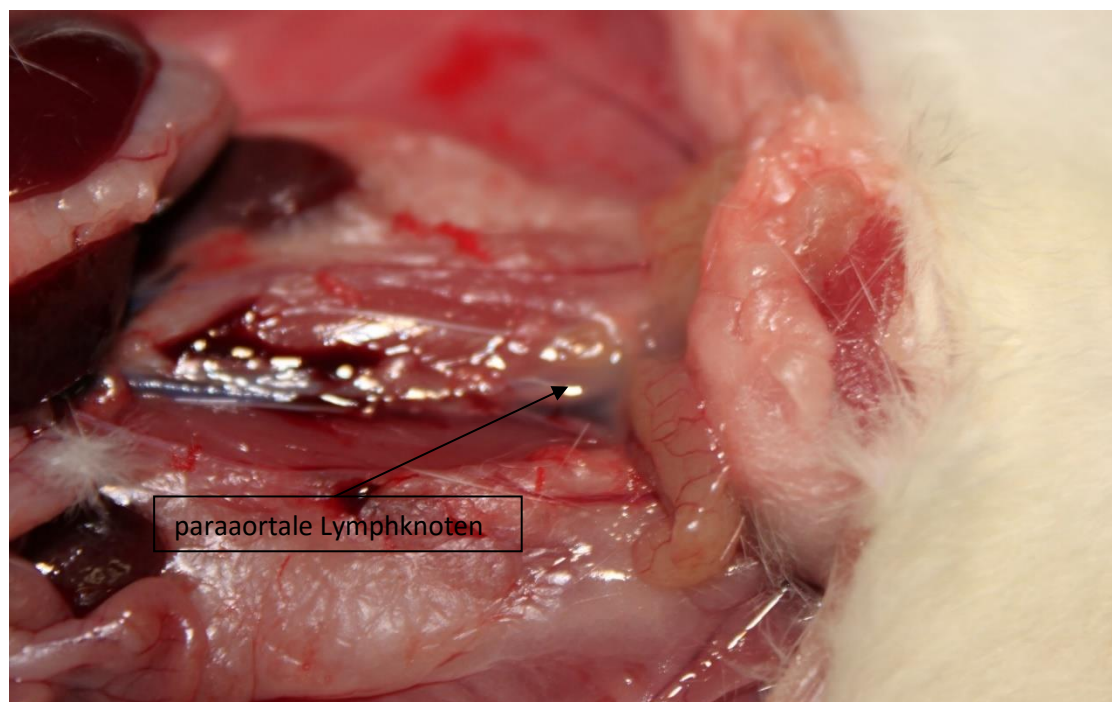


Abb. 17: Darstellung paraaortaler Lymphknoten vor der Entnahme und Aufbereitung

4.18 Statistik

Die Auswertung der Versuchsergebnisse erfolgte mit Hilfe der Statistiksoftware GraphpadPrism sowie Microsoft Excel. Zur statistischen Beurteilung der Ergebnisse wurde ein einseitiger T-Test angewandt. Dieser dient der statistischen Auswertung der erbrachten Ergebnisse der durchflusszytometrischen- und immunhistochemischen Untersuchungen. Eine Signifikanz wurde bei $p < 0.05$ angenommen. Die Abweichung der untersuchten Proben wird mit Hilfe der Fehlerbalken in den Balkendiagrammen um den Mittelwert dargestellt.

5 Ergebnisse

5.1 Ergebnisse der Durchflusszytometrie

5.2 MSC aktivieren CD4+ und CD8+ Zellen in sekundär lymphatischen Organen

Nach der Transplantation der Herzen und der den Gruppen zugeteilten Behandlung, Gruppe 1 mit alleiniger Transplantation, Gruppe 2 mit zusätzlicher Gabe von MSC, Gruppe 3 mit zusätzlicher Gabe von MMF und Gruppe 4, die sowohl MSC als auch MMF erhält, ist mit einer Reaktion des Immunsystems des Empfängertieres auf das Transplantat zu rechnen. Diese Immunreaktion sollte in den sekundär lymphatischen Organen nachvollziehbar sein, und sich zwischen den verschiedenen Gruppen unterscheiden.

Um den Grad der Aktivierung der T-Zellen des Immunsystems der Tiere besser einschätzen zu können, wurden in der durchflusszytometrischen Analyse mehrere Aktivierungsmarker und kostimulatorische Marker auf den T- und B- Lymphozyten sowie auf dendritischen Zellen (DCs) bestimmt. Für aktivierte T-Zellen wurde auf den Oberflächenmarker CD28 zurückgegriffen, der als kostimulatorischer Rezeptor für das Oberflächenmolekül B7 fungiert.

Auf den dendritischen Zellen wurde der Oberflächenmarker Ox6 als kennzeichnendes Merkmal ausgewählt in Kombination mit den kostimulatorischen Signalen CD80/86 als Aktivierungsmarker. Abdominale/mesenteriale sowie paraaortale Lymphknoten erscheinen aufgrund der Nähe zum Transplantat und unter Beachtung der Lymphabflussbahn als geeignetste zu untersuchende Lymphstationen.

abdominale Lymphknoten CD4+CD28+

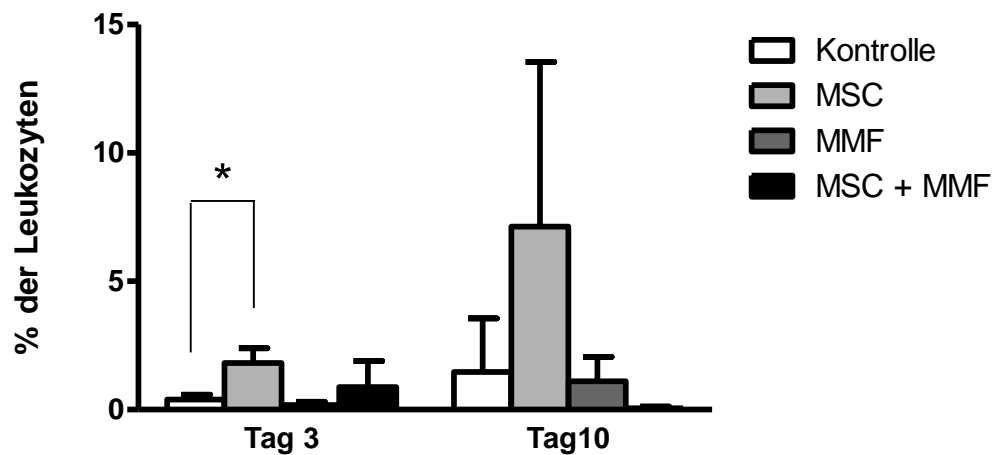


Abb. 18: Dargestellt ist der Prozentsatz der CD4+CD28+ Lymphozyten (aktivierte T-Zellen) in der durchflusszytometrischen Analyse der abdominalen Lymphknoten der untersuchten Tiergruppen. Untersucht wurden 3 Tiere je Gruppe (n=3) und Untersuchungszeitpunkt. Die Balken stellen die Standardabweichung innerhalb der Gruppen dar.

* $p < 0.05$, einseitiger T-Test

Ungeachtet des geringen Unterschiedes zwischen den einzelnen Gruppen konnte eine statistisch signifikant erhöhte CD4+CD28+ Zellfraktion am Tag 3 in abdominalen Lymphknoten derer Tiere, mit MSC Behandlung (Gruppe 2) im Vergleich zur Kontrollgruppe ohne Behandlung, nachgewiesen werden (Abb. 18). Am Tag 10 lässt sich ebenfalls diese Tendenz erkennen. Bezüglich der Expression des Aktivierungsmarker lässt sich an Tag 3 kein Unterschied zwischen mit MSC behandelten Tieren und Tieren der Gruppe welche die MMF- MSC Ko-Therapie erhalten hatten erkennen. An Tag 10 jedoch, zeichnet sich ein deutlicher Unterschied ab. Hier ist bei den Tieren, welche einer MMF- MSC Ko-Therapie unterzogen wurden, im Vergleich zu den rein MSC behandelten Tieren, ein geringerer Anteil CD4+CD28+ Zellen zu verzeichnen.

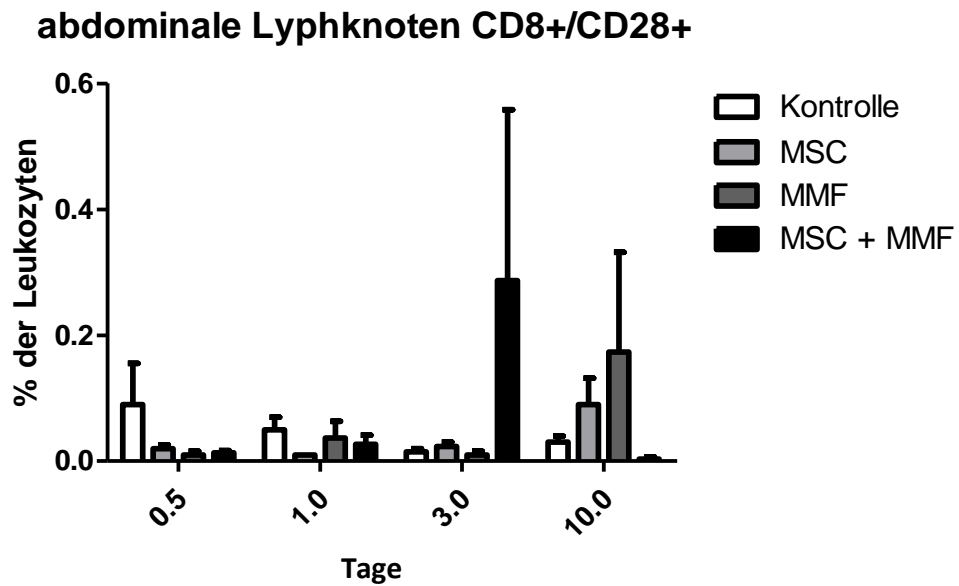


Abb. 19: Dargestellt ist der Prozentsatz der CD8+/CD28+ Lymphozyten (aktivierte T-Zellen) in der durchflusszytometrischen Analyse der abdominalen Lymphknoten der untersuchten Tiergruppen. Untersucht wurden 3 Tiere je Gruppe (n=3) und Untersuchungszeitpunkt. Es zeigt sich kein statistisch signifikanter Unterschied zwischen den Tiergruppen.

Beim prozentualen Anzahl der CD8+/CD28+ Zellen in abdominalen Lymphknoten konnte bei dieser Gruppe keine statistisch signifikante Veränderung festgestellt werden. An Tag 10 jedoch, lässt sich auch wie in der Untersuchung der CD4+/CD28+ Zellen bei der MMF-MSK Ko-Therapiegruppe eine verminderte Expression der Aktivierungsmarker erkennen. In allen anderen Gruppen scheint dies nicht der Fall zu sein.

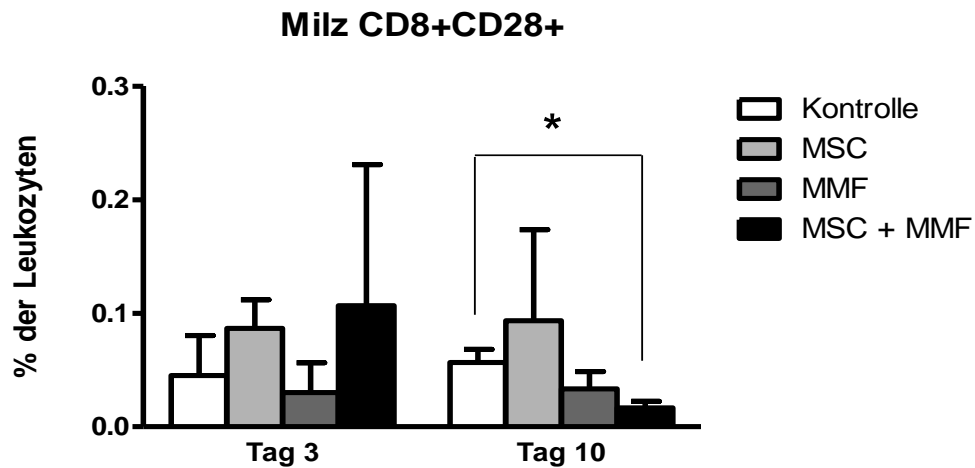


Abb. 20: prozentualer Anteil CD8+CD28+ T-Lymphozyten in der Milz. Zu erkennen ist eine signifikant verringerte Fraktion der aktivierten T-Zellen in der Gruppe der MSC+MMF Kotherapie im Vergleich zur Referenzgruppe. Untersucht wurden 3 Tiere je Gruppe (n=3) und Untersuchungszeitpunkt.

* $p < 0.05$, einseitiger T-Test

In der Milz konnte am Tag 3 eine erhöhte Anzahl von CD8+/CD28+ Zellen bei Tieren der Ko-Therapiegruppe im Vergleich zur Kontrollgruppe nachgewiesen werden.

Dieser Effekt konnte für CD4+/CD28+ Zellen in der Milz nicht nachgewiesen werden.

Auch wenn nicht statistisch signifikant, lässt sich trotzdem eine Tendenz an Tag 3, bei Tieren die eine Behandlung mit MSC und MMF erfahren haben (Gruppe 4), erkennen. Diese weisen einen höheren Anteil sowohl CD4+/CD28+ Zellen als auch CD8+/CD28+ Zellen in Milz und abdominalen Lymphknoten auf. Tiere der Gruppe 2, mit alleiniger MSC Therapie, zeigten einen hohen Anteil von CD4+/CD28+ Zellen an Tag 10 in den abdominalen Lymphknoten (Abb.18), was die häufig ablaufende Abstoßung um den Tag 6 widerspiegelt, die sich sowohl bei den 10-Tage-Tieren im eigenen Versuchsaufbau bestätigte als auch in publizierten Daten von Popp *et al.*^{11 32} findet. Die MSC-MMF Ko-Therapiegruppe 4 hingegen, zeigte an Tag 10 sowohl in Milz als auch in den aLK ein geringeres Level an CD4+/CD28+ (Abb.18) und CD8+/CD28+ (Abb.19) Lymphozyten.

5.3 Transplantatfunktionalität im Versuchsaufbau

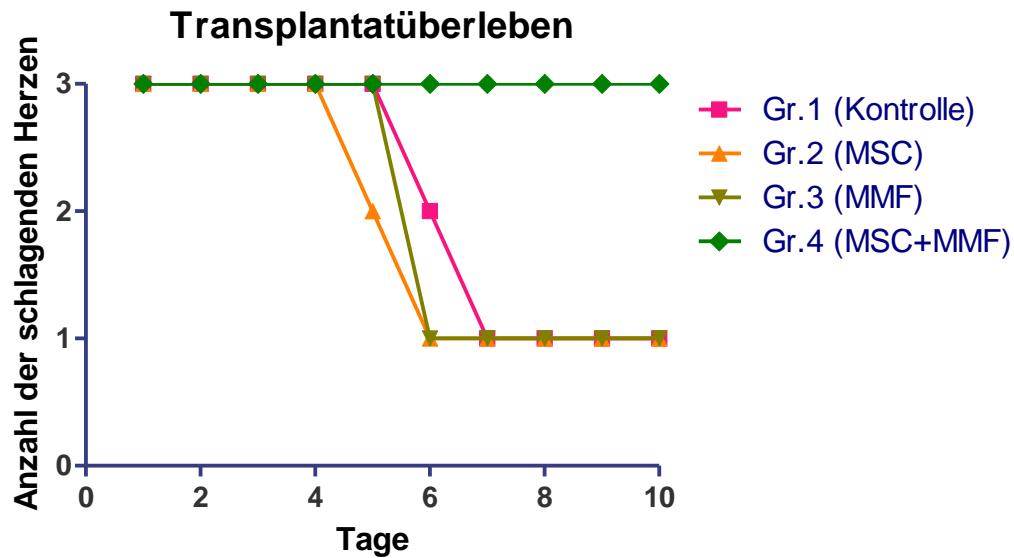


Abb.21: tägliche palpatorische Kontrollen der Herzaktion und die durch Sistieren der Herzaktion gekennzeichnete Abstoßung der Spenderorgane im zeitlichen Verlauf des Versuchsaufbaus innerhalb der verschiedenen Versuchsgruppen.

Zur Überwachung der Transplantatfunktion wurden täglich palpatorische Untersuchungen der Versuchstiere wie beschrieben durchgeführt. Hierbei zeigte sich im Einklang mit den bereits vorangegangenen Arbeiten unserer Arbeitsgruppe¹¹ eine ablaufende Abstoßung im Sinne eines Sistierens der Herzaktion des Transplantates um den Tag 6 bei jenen Tieren, welche keiner Ko-Therapie unterzogen wurden. Im Vergleich dazu, waren in der Gruppe derer Tiere, welche sowohl MMF als auch die mesenchymalen Stammzellen erhalten hatten, eine Funktionalität des Transplantates über den Untersuchungszeitraum gegeben (Abb. 21).

5.4 MSC verzögern die APC Aktivierung in sekundär lymphatischen Organen

Antigenpräsentierende Zellen (APCs) stellen eine wichtige Säule im immunologischen Mechanismus der Transplantatabstoßung dar. Auf MHC Klasse II, in der Ratte Ox6 genannt, werden sowohl körpereigene als auch körperfremde Peptide präsentiert. Eine Erkennung von Fremdmaterial durch Lymphozyten und phagozytierende Zellen erfolgt durch die Expression eines kostimulatorischen Signals. Wir untersuchten in unserem Versuchsaufbau CD80 und CD86. Aktivierte APC weisen als Oberflächenmarker sowohl MHCII als auch das kostimulatorische Signal auf. Durch anteilig hohe Zahlen aktivierter MHCII und CD80/86 positiver Zellen besteht die Möglichkeit eine akute Abstoßung über die effektive Aktivierung von T-Effektorzellen einzuleiten^{33 34 35}.

An Tag 1 ist die Anzahl der aktivierten APCs, die als Charakteristikum Ox6+/CD86+ Oberflächenmarker besitzen, in Milz und Lymphknoten der Gruppe mit MSC Behandlung im Vergleich zu den Gruppen ohne MSC Behandlung signifikant reduziert. In der Milz ist dieser Effekt MMF unabhängig zu beobachten. Auch im peripheren Blut kann dies tendenziell, wenn auch nicht statistisch signifikant, nachvollzogen werden.

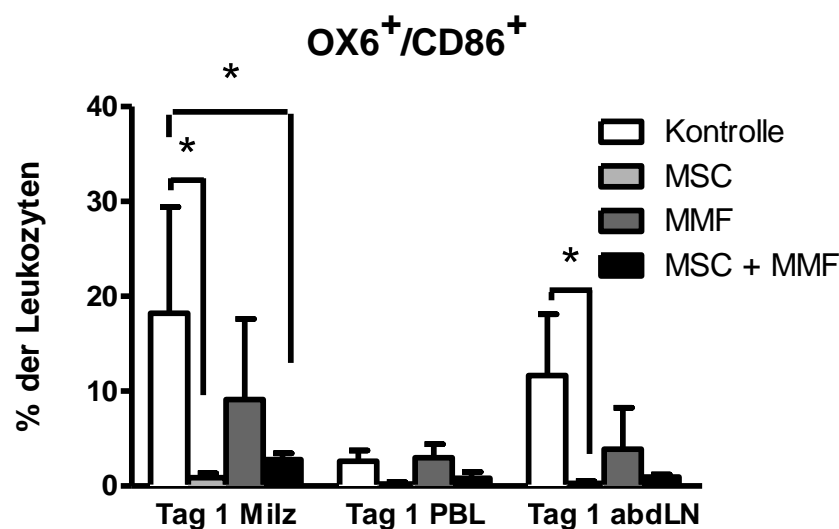


Abb. 22: prozentualer Anteil der Ox6+/CD86+ Zellen am Tag 1 nach Transplantation in Milz peripherem Blut und abdominalen Lymphknoten. *p<0.05, einseitiger T-Test

Nach 10 Tagen ist der Effekt, der verminderten APC Präsenz in den Tiergruppen mit MSC Behandlung, nicht mehr nachweisbar, sodass es sich eher um eine Verzögerung und nicht um eine komplette Inhibition der APC-Aktivierung in sekundär lymphatischen Organen handelt. In der Zusammenschau mit den immunhistochemischen Befunden (Abb. 23), ergibt sich das Bild, dass die aktivierten APC in den sekundär lymphatischen Organen zwar am Tag 10 wieder voll vorhanden sind, jedoch nicht in der Lage sind, das transplantierte Organ wirksam abzustößen.

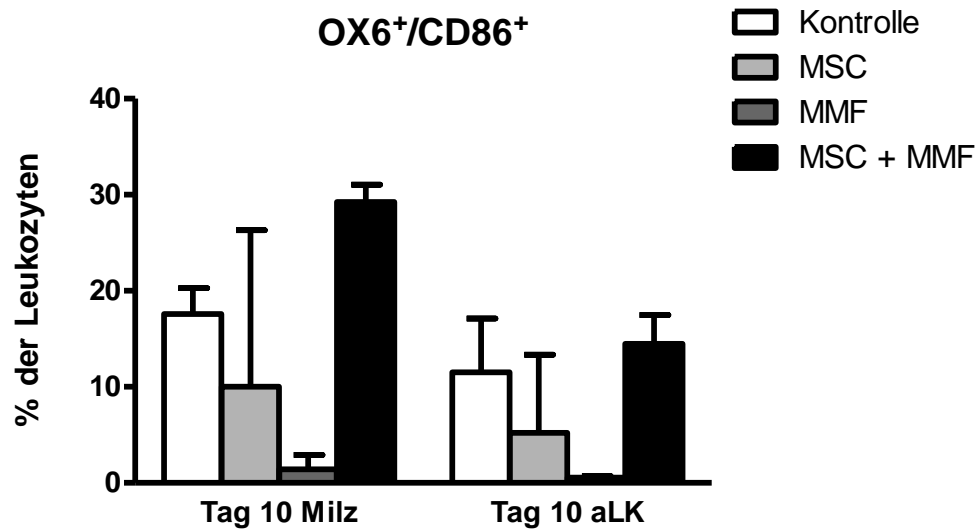


Abb. 23: prozentualer Anteil der OX6/CD86⁺ Zellen an Tag 10 nach der Transplantation in Milz und abdominalen Lymphknoten. Die vorher signifikant verringerte Anzahl an positiv gefärbten Zellen bei Tieren, welche einer Therapie mit MSC unterzogen wurden, ist nicht mehr nachweisbar.

5.5 Ergebnisse der Immunhistochemie

Aufgrund der Anzahl und der Verteilung der positiv gefärbten Zellen (Abb. 23), sowie dem durchgeführten Scoring konnte gezeigt werden, dass in der Versuchsgruppe 4 an Tag 10 nach der Transplantation deutlich weniger Ox6+ (MHC II positive Zellen) als in allen anderen Gruppen zu finden sind. Dies deutet stark auf eine geringere bis keine Abstoßungsreaktion durch das Immunsystem des Empfängertieres gegen das Transplantat hin. Im Gegensatz dazu zeigte sich bei Gruppe 2 (nur MSC Behandlung), in Einklang mit den bisherigen Ergebnissen unserer Arbeitsgruppe, bereits an Tag 3 eine deutliche leukozytäre Infiltration des transplantierten Herzens, was auf eine beschleunigte Abstoßung hindeutet. Bei der Kontrollgruppe war dies, ebenfalls wie erwartet, an Tag 10 zu beobachten.

Um eine genauere Bestimmung der infiltrierenden Zellen vorzunehmen, wurden die Proben auf die Expression des Oberflächenmarkers R73 (α/β -Kette des T-Zell-Rezeptors) untersucht. Hier zeigte sich, dass in der MSC/MMF Gruppe 4, trotz der Aktivierung der T-Zellen in sekundär lymphatischen Organen durch die MSC, kaum bis keine T-Lymphozyten im Transplantat zu finden waren, wohingegen in allen anderen Versuchsgruppen eine Migration in das Transplantat stattfand.

Um diese Beobachtung genauer erklären zu können, untersuchten wir die Expression des Adhäsionsmoleküls ICAM1, welches für die Transmigration und Diapedese von Lymphozyten in das Gewebe von entscheidender Bedeutung ist. ICAM1 findet sich vor allem auf vaskulärem Endothel sowie auf Makrophagen und Lymphozyten. Seine Expression wird durch Interleukin-1 und TNF- α verstärkt. In diesem Versuchssetting stellte sich heraus, dass die Expression des ICAM1 Oberflächenmarkers in der MSC-MMF Gruppe, im Gegensatz zu den anderen beiden Versuchsgruppen und der Kontrollgruppe, wesentlich verringert war.

Bezüglich der Expression des Oberflächenantigens Ox6 (MHC II) auf T-Zellen, kann wie bereits beschrieben, eine massive Infiltration der transplantierten Organe derer Tiere beobachtet werden, welche nicht einer Kotherapie unterzogen wurden. Im Gegensatz dazu finden sich in den Transplantaten der Gruppe 4 fast keine Ox6 positiv gefärbten Zellen.

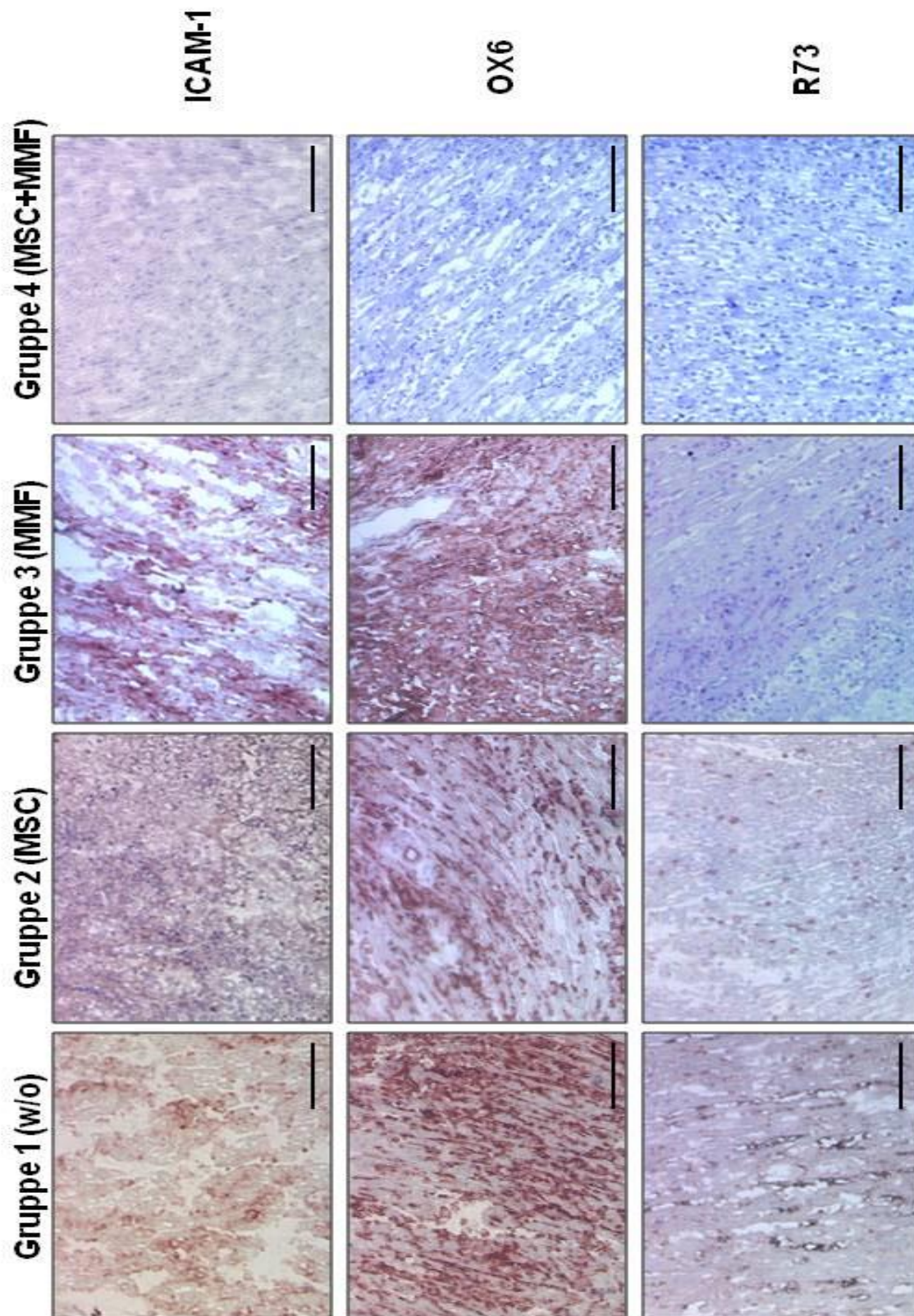


Abb. 24: Beispielhafte Darstellung der Feingewebsschnitte nach der immunhistochemischen Färbung mit markierten Antikörpern gegen ICAM-1, Ox6 und R73. Der dargestellte Maßstab entspricht 100µm.

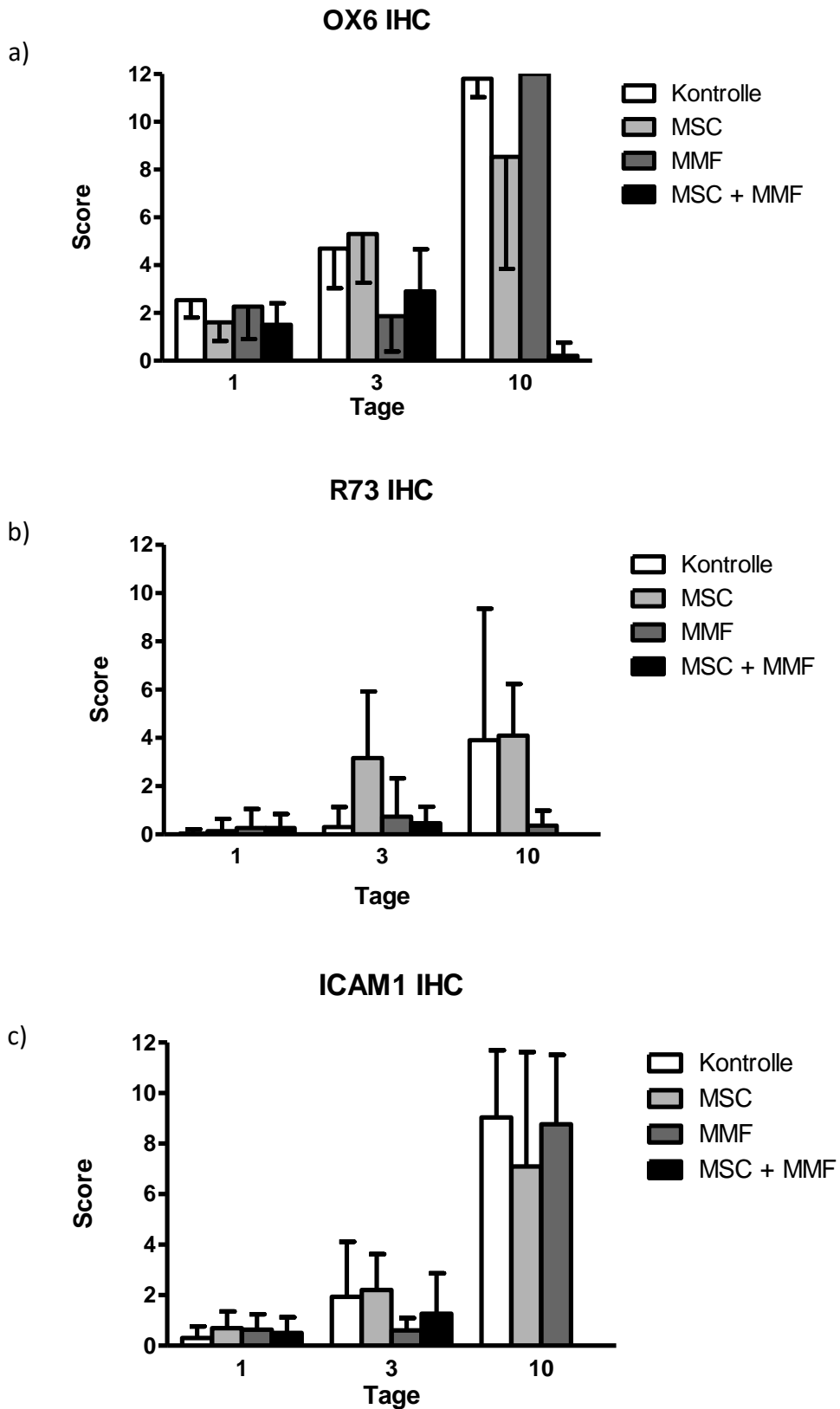


Abb. 25: Auswertung der immunhistochemisch gefärbten Gewebeschnitte in 40x Vergrößerung und deren graphische Darstellung nach Erstellung des Immunhistochemie-Score nach Soslow ²⁹.

- a) Scoring der Ox6 gefärbten Schnitte
- b) Scoring der R73 gefärbten Schnitte
- c) Scoring der ICAM 1 gefärbten Schnitte

5.5.1 Wirkung von MMF und MSC auf die Adhäsionsmoleküle CD31 und E-Selectin des Endothels

Um die Wirkung von MMF und MSC auf das Endothel des Transplantates weiter zu untersuchen, verglichen wir die Expression des Adhäsionsmoleküls CD31 und E-Selectin auf Zellen der Kontrollgruppe 1 und der MMF/MSC Gruppe 4. CD31 (PECAM-1) wird auf Endothelzellen, Thrombozyten, Monozyten und neutrophilen Granulozyten exprimiert und spielt bei der Migration von Immunozyten eine entscheidende Rolle³⁶. E-Selectin als Zelladhäsionsmolekül wird nur auf Endothelzellen exprimiert und wird durch Zytokinstimulation vermehrt gebildet³⁷. Die Expression von CD31 war bei Gruppe 4-Tieren im Vergleich zu Tieren der Gruppe 1 deutlich vermehrt.

Gegenläufig dazu, war die Expression von E-Selectin in der Gruppe 4 im Vergleich zu Gruppe 1 signifikant verringert, so dass angenommen werden kann, dass die MMF/MSC Kotherapie die Migration in das transplantierte Organ verhindert und dies, zumindest zum Teil, durch eine Modulation des Aktivierungsgrades des Allograftendothels geschieht.

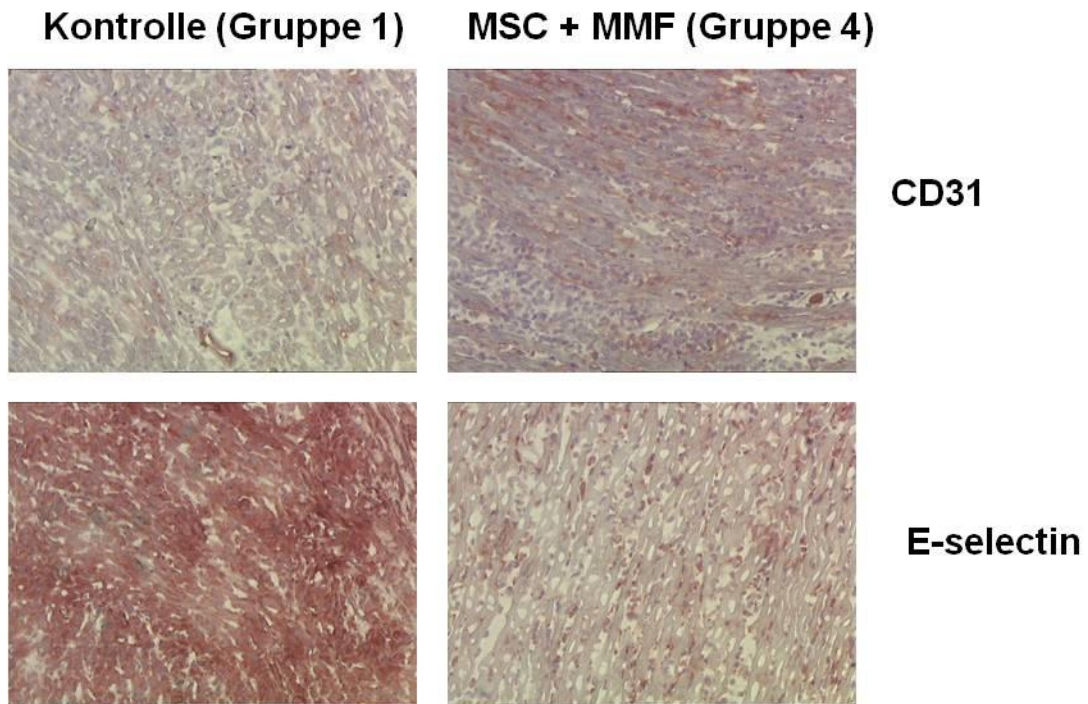


Abb. 26: Darstellung immunhistochemisch mittels Antikörpern gegen E-Selectin und CD31 gefärbter, repräsentativer Gewebeschnitte der transplantierten Herzen der Gruppe 1 und 4 des Auswertungstages 10

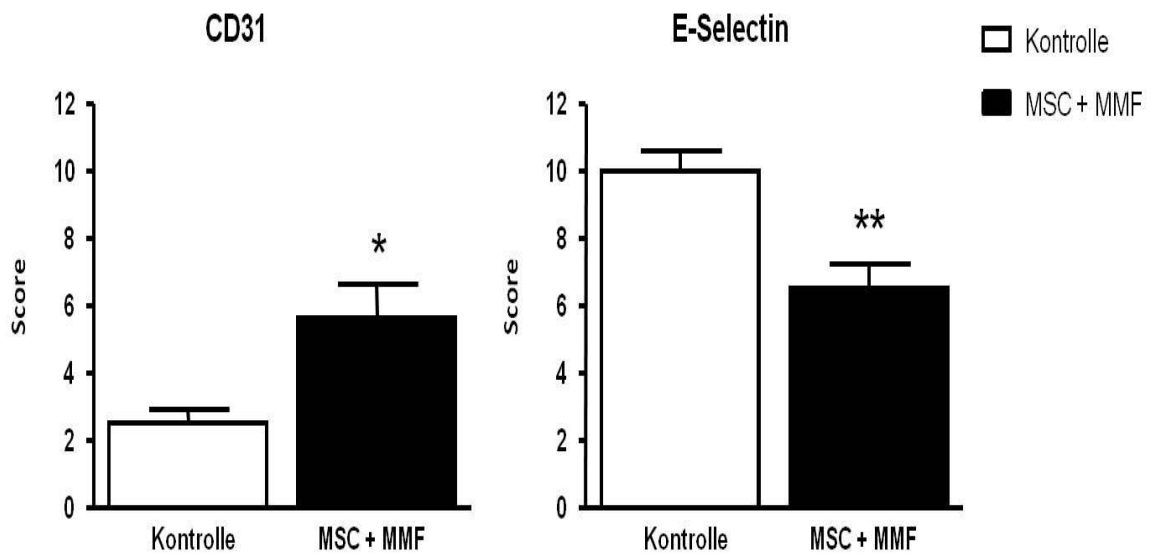


Abb. 27: Scoring der CD31 und E-Selectin immunhistochemisch gefärbten Schnitte der Gruppen 1 und 4. am Tag 10; * $p < 0.05$ (einseitiger T-Test); ** $p < 0.001$ (einseitiger T-Test)

5.6 MMF verhindert nicht die Interferon- γ Produktion und ermöglicht die Aktivierung von MSC

Da in der Literatur beschrieben wurde, dass durch Zytokine z.B. INF- γ aktivierte MSC ein höheres immunsuppressives Potenzial besitzen^{31 38}, stellte sich uns die Frage, ob MMF die INF- γ Produktion beeinflusst oder diese gar verhindert und somit eine INF- γ getriggerte MSC Aktivierung ausschließt.

Um diese Hypothese zu überprüfen, versetzten wir MSC mit ConA stimulierten und CFSE gefärbten Splenozyten. Einer Probengruppe wurde INF- γ zugesetzt, die andere Probengruppe wurde ohne INF- γ inkubiert. Mit Hilfe der Durchflusszytometrie analysierten wir die Proliferationsrate der CFSE-gefärbten T-Lymphozyten, die durch die Verdünnung des CFSE-Farbstoffes nachgewiesen werden kann. Der Versuch zeigte, dass INF- γ das immunsuppressive Potenzial der MSC erhöht und die Proliferation von T-Lymphozyten einschränkt, obwohl INF- γ alleine die Proliferation erhöhen sollte⁶.

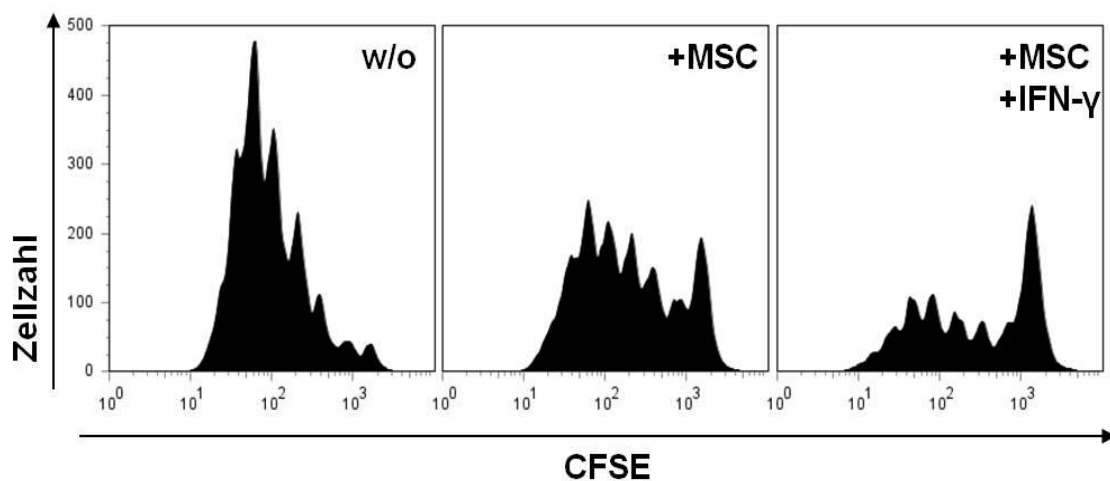


Abb. 28: Einfluss von INF- γ (50U/ml) und MSC (3×10^4) auf CFSE gefärbte Splenozyten ($1,5 \times 10^5$) in der in-Vitro Ko-Kultur unter Proliferationsstimulation mittels ConA (2ng/ml). Gezeigt ist die durchflusszytometrische Analyse der Proliferation durch zellteilungsbedingte Abnahme der Fluoreszenzintensität.

Aufgrund dieser Beobachtung stellte sich die Frage, in wieweit das INF- γ -Level der Versuchstiere im Serum durch MMF beeinflusst wird, da dies für eine erfolgreiche Therapie entscheidend sein könnte.

Wir untersuchten hierfür die Seren der Kontrollgruppe (Gruppe 1) sowie die Seren der Gruppe 3 (MMF) am Tag 1,3 und 10 auf ihre INF- γ -Level.

In diesem Versuchsaufbau zeigten sich annähernd gleiche Werte für INF- γ , sowohl bei der Kontrollgruppe, als auch bei der mit MMF behandelten Versuchsgruppe, sodass angenommen werden kann, dass MMF keinen Einfluss auf das INF- γ -Level im peripheren Blut der Versuchstiere hat.

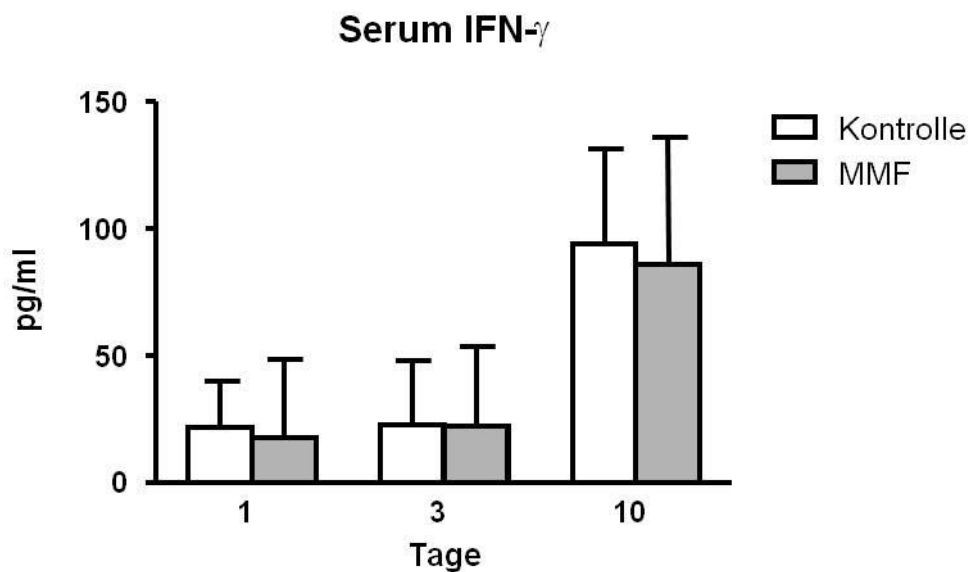


Abb. 29: Serum INF- γ -Level der Versuchstiere der Kontrollgruppe (Gruppe 1) und der MMF behandelten Tiere (Gruppe 3)

6 Diskussion

MSC haben sich als vielversprechende Therapiemöglichkeit in Kombination mit mehreren bekannten Immunsuppressiva bei Organtransplantationen herauskristallisiert^{39 40}. Auch wenn weiterhin eine Immunsuppression mit etablierten Immunsuppressiva nötig sein wird, ist es von essentieller Bedeutung, das Immunsuppressionschema in einer Art und Weise zu modifizieren, sodass ein möglichst großer synergistischer Effekt mit MSCs erreicht werden kann. Damit wäre eine Reduktion der immunsuppressiven Medikation möglich, womit auch eine Verminderung der unerwünschten Nebenwirkungen einhergehen würde. Auch wäre eine Verbesserung des Transplantatüberlebens durch eine kombinierte pharmakologische und zelluläre Therapie denkbar.

Vorausgehende tierexperimentelle Arbeiten unserer Arbeitsgruppe haben gezeigt, dass MMF in Kombinationstherapie mit MSC in Bezug auf das Transplantatüberleben den Calcineurininhibitoren überlegen ist^{11 41}. Es ist jedoch unklar, wie genau die Interaktion zwischen MMF und MSCs einen synergistischen Effekt erzeugt. Diese Arbeit zielte darauf ab, den Einfluss der MMF/MSC-Kombinationstherapie auf die Infiltration des Spenderorgans durch Leukozyten, die Aktivierung von APC, sowie die T-Zell-Aktivierung in sekundär lymphatischen Organen, dem peripheren Blut und dem Knochenmark zu untersuchen.

Unsere Ergebnisse zeigen, dass MSC sowohl CD4 als auch CD8 positive T-Zellen zwar aktivieren, diese jedoch durch MMF eliminiert werden können. Dies scheint wahrscheinlich, da MMF das einzige der zurzeit verwendeten Immunsuppressiva ist, für welches diese Eigenschaft belegt werden konnte¹². Ersichtlich wird diese, in der Literatur beschriebene Eigenschaft, in den erhöhten Anteilen aktivierter T-Zellen in abdominalen Lymphknoten derer Tiere, welche einer reinen MSC Behandlung unterzogen wurden (Abb. 18, 19). Dies spiegelt die ablaufende Immunreaktion auf die verabreichten immunogenen MSC wider. Komplementär hierzu, und in Einklang mit der Beschreibung, dass MMF aktivierte T-Zellen eliminiert, finden sich an Tag 10 weniger aktivierte CD4 als auch CD8 T-Zellen sowohl in den untersuchten Lymphknoten als auch in der Milz der Tiere, mit einer MMF-MSC-Ko-Therapie (Abb. 18-20). Dass diese Beobachtung am deutlichsten vor allem an Tag 10 zu beobachten

ist, ist am ehesten auf die Dauer bis zur vollständigen therapeutischen Immunsuppression von MMF zu deuten, da die Verabreichung des Medikamentes erst mit der Transplantation der Herzen begonnen wurde. Die mesenchymalen Stammzellen hingegen wurden bereits 4 Tage prä Transplantation verabreicht (Abb. 13) und lösen somit innerhalb des Organismus eine ablaufende Immunreaktion aus, da zu diesem Zeitpunkt noch keine Immunsuppression besteht. Hinweise darauf finden sich auch den Untersuchungen von Chaigne-Delalande *et al*, in denen periphere Lymphozyten von gesunden Spendern *in vitro* durch Stimulation aktiviert, und schließlich mit MMF inkubiert wurden. Im zeitlichen Verlauf von 5 Tagen zeigt sich hier ein zunehmender Zelltod der Lyphozyten¹².

Uneinigkeit in der Literatur besteht weiterhin bezüglich der Immunogenität von MSC, da in ersten Untersuchungen zu diesem Thema angenommen wurde, dass MSC als „immunoprivilegiert“ einzustufen sind und selbst keine Immunantwort auslösen^{42 43 44}. Neuere Untersuchungen haben jedoch gezeigt, dass MSC durchaus ein immunogenes Potential besitzen und eine Immunantwort auslösen können, die zu ihrer Eliminierung durch das Empfängerimmunsystem führt^{45 46 47}. Zudem konnte in vorangegangenen Versuchen unserer Arbeitsgruppe ebenfalls die Immunogenität der MSC nachgewiesen werden. Popp *et al*¹¹ konnten in dieser Versuchsreihe, zeigen, dass zum einen der Zeitpunkt der Verabreichung der MSC eine Rolle für die Toleranz des Transplantates spielt, als auch deren Dignität. So wurde festgestellt, dass die Verabreichung der MSC am Tag -4 vor der Transplantation im Vergleich zur Verabreichung am Tag der Transplantation mit einem besseren Transplantatüberleben einhergeht. Bezogen auf die Dignität der MSC war klar ersichtlich dass LEW MSC bei der Transplantation von LEW Herzen in Kombination mit MMF ein Langzeitüberleben des Transplantates erzeugen. Interessanter Weise war dies auch bei der Verabreichung von LEW Splenozyten der Fall. Bei der Verabreichung von ACI MSC konnte dies nicht in diesem Maße bestätigt werden, auch wenn eine Verbesserung des Transplantatüberlebens ersichtlich wurde. In Bezug auf die Vorsensibilisierung konnte bereits in diesem Versuchsaufbau festgestellt werden, dass die Verabreichung von LEW MSC ohne weitere Immunsuppression zu einer frühen Abstoßung des Transplantates führt, was ebenfalls für die Sensibilisierung des Empfängertieres durch die verabreichten MSC spricht.

Als weiteres wichtiges Standbein des Immunsystems untersuchten wir die Rolle der dendritischen Zellen als potente antigenpräsentierende Zellen innerhalb des Versuchsaufbaus. Es konnte gezeigt werden, dass vor allem in sekundär lymphatischen Organen (Milz und Lymphknoten), eine initiale ausgeprägte Inhibition der Ox6/CD86 positiven Zellen bei den Tieren mit einer MSC Therapie besteht. Vor allem am Tag 1 ist dieser Effekt zu beobachten. In der Milz ist dies unabhängig von MMF signifikant nachweisbar (Abb. 22), jedoch lässt sich diese Tendenz auch im peripheren Blut und den Lymphknoten nachvollziehen. Es konnte bereits mehrfach nachgewiesen werden, dass MSC die Differenzierung und Ausreifung antigenpräsentierender Zellen verhindern können⁴⁸⁻⁵¹. Spaggiari *et al* konnten in vitro die Inhibition der Ausreifung von durch Lipopolysaccharid stimulierten Monozyten, zu dendritischen Zellen durch die Anwesenheit von MSC abhängig von PGE₂ zeigen⁴⁸. Wie auch in unseren Beobachtungen in vivo, konnten Djouad *et al* in vitro eine verminderte Expression der kostimulatorischen Oberflächenmoleküle CD40 und CD86 auf dendritischen Zellen in der Ko-Kultur von dendritischen Zellen mit MSC beobachten⁴⁹.

In unseren Versuchen waren am Tag 10 in Milz und Lymphknoten im Vergleich zur Kontrollgruppe wieder gleiche bis erhöhte Anteile der aktivierten dendritischen Zellen zu erkennen (Abb. 23). Nach der initialen Verminderung der Anzahl aktivierter dendritischer Zellen (Abb. 22) kann davon ausgegangen werden, dass MSC zwar die APC Aktivierung verlangsamen, diese jedoch in-vivo nicht komplett unterdrücken und Proliferation, Ausreifung und Aktivierung weiterhin stattfinden. Unter Einbeziehung des Aspektes, dass MSC in-vitro die Fähigkeit haben, auch regulatorische APCs zu rekrutieren und deren Ausreifung zu fördern^{52 53 54} und bereits eine kleine Anzahl an regulatorischen APCs ausreichend ist um eine Transplantatakzeptanz durch das Empfängerimmunsystem zu erzielen⁵⁵, kann vermutet werden, dass regulatorische APCs auch eine Rolle in unserem Versuchsaufbau spielen.

Diese Vermutung wird durch die Beobachtung gestützt, dass an Tag 10 bei Tieren die mit MSC und MMF behandelt wurden, fast kein T-Zell-Infiltrat in den Transplantaten festgestellt werden konnte. Trotz der Tatsache, dass wir nur geringfügig erhöhte Zahlen an CD4+/CD28+ aktivierten T-Zellen in den abdominalen Lymphknoten der ausschließlich mit MSC behandelten Tiere im Vergleich zur Kontrollgruppe am Tag 3 fanden (Abb. 18), konnten wir eine frühe Infiltration durch T-Zellen in das Transplantat

dieser Tiere immunhistochemisch beweisen (Abb. 25b). Diese Beobachtung verdeutlicht die ablaufende, gezielte Immunantwort auf das Spenderorgan die aufgrund der Vorsensibilisierung des Empfängertieres durch LEW MSC, ohne MMF, erfolgt. Durch die Kombinationstherapie von MSC und MMF scheint diese gezielte Transmigration und Abstoßung trotz des Nachweises ähnlicher Aktivierung in abdominalen Lymphknoten von MSC (Gruppe 2) und MSC+MMF (Gruppe 4) behandelten Tieren, nicht zu erfolgen.

Immunhistochemisch ließ sich durch die Kombinationstherapie eine verminderte Transmigration von aktivierten T-Zellen (R73) und antigenpräsentierender Zellen (Ox6) in das Transplantat zeigen (Abb. 24). Verantwortlich scheint unter anderem eine geringere Expression des Adhäsionsmoleküls ICAM1, welches essentiell für Transmigration und Diapedese ist⁵⁶, zu sein. Auch wenn es sich bei Transmigration und Diapedese der Leukozyten um komplexe immunologische Vorgänge handelt, welche einer Vielzahl von intra- und extrazellulären Mechanismen bedürfen, stellt ICAM1 neben anderen Adhäsionsmolekülen einen wichtigen Faktor dabei dar. Im zeitlichen Verlauf des Versuches, ist mit Fortschreiten der Untersuchungszeitpunkte eine progrediente verminderte Expression von ICAM1 bei der MMF/MSC Gruppe zu sehen. Besonders ausgeprägt ist der Effekt an Tag 10 und alleinig in der Gruppe der Kombinationstherapie nachweisbar, wohingegen an den vorhergehenden Untersuchungszeitpunkten nur geringe Unterschiede zwischen den einzelnen Versuchsgruppen bestehen (Abb. 25c). Glomsda *et al* konnten zeigen, dass MMF die Expression von ICAM1 auf Monozyten vermindert⁵⁷. In unserer Versuchsreihe ist dieser Effekt nur für die Kombinationstherapiegruppe nachweisbar.

In den folgenden immunhistochemischen Untersuchungen des Endothels auf die Adhäsionsmoleküle PECAM-1 (Platelet-endothelial cell adhesion molecule) = CD31 und E-Selektin, ebenfalls am Tag 10 konnte für E-Selektin, welches rein auf Endothelzellen nach Zytokinstimulation exprimiert wird, eine signifikant verminderte Expression festgestellt werden (Abb. 27). Durch diese Modulation des Endothels, welche eine Verminderte Expression von ICAM1 und E-Selektin durch MMF und MSC vermuten lässt, ist als Effekt eine verminderte Transmigration von Leukozyten in das Transplantat wahrscheinlich.

Da die in-vitro Blockierung von CD31 (PECAM-1) die Transmigration von Leukozyten verhindert³⁶, erwarteten wir ebenfalls eine verminderte Expression des Adhäsionsmoleküls im immunhistochemischen Nachweis in den transplantierten Herzen der Tiere der MMF/MSC Gruppe. Überraschender Weise war genau das Gegenteil der Fall. Wir fanden eine höhere Expression von CD31 Oberflächenmarkern in den Transplantaten der MMF/MSC Gruppe als in der Vergleichsgruppe. Aus diesem Resultat folgerten wir, im Einklang mit aktuellen Ergebnissen, dass eine erhöhte Expression von CD31 durchaus vorteilhaft für die Regulation der T-Zell-Aktivierung sein kann. Ma *et al.* konnten mittels eines Maus-Modelles zeigen, dass eine CD31 Defizienz sowohl mit einem geringeren Tumorwachstum, als auch mit einer schnelleren Abstoßung eines Hauttransplantates einhergeht⁵⁸. Zudem wird durch die Expression von CD31 die Arterioskleroseneigung innerhalb des Transplantates abgemildert⁵⁹.

Zusammenfassend kann davon ausgegangen werden, dass MMF und MSC synergistisch durch Modulation des Endothels die Infiltration des Transplantates durch T-Zellen und APCs verhindern. Wir nehmen an, dass MMF in Kombination mit MSC die Adhäsion und Transmigration von Leukozyten aus den Gefäßen durch das Endothel in das Transplantat beeinflusst. Es ist bereits bekannt, dass MMF die Interaktion von APCs und Endothel verhindert⁵⁷. Dies wird durch unsere Untersuchung der Expression von ICAM-1 auf den Endothelien der Transplantate bestätigt. Hier findet eine Down-Regulation des Adhäsionsmoleküls statt. Ebenfalls herunter geregelt war die Expression von E-Selektin in den Transplantaten, was für einen zusätzlichen Einfluss von MMF und MSC auf die Endothelaktivierung, welche entscheidend für die Transmigration der Leukozyten ist, spricht.

MSC benötigen, um ihr volles immunsuppressives Potential ausschöpfen zu können, proinflammatorische Zytokine. Dies wurde in-vitro bereits nachgewiesen^{38 60}. Durch Renner *et al* wurde dieser Zusammenhang für viele Zytokine mittels einer Co-Kultur von MSC und Splenozyten beschrieben³¹. In diesen Versuchen wurden MSC mit Splenozyten in Co-Kultur inkubiert und mit verschiedenen Zytokinen versetzt. Proinflammatorische Zytokine zeigten im Vergleich zu antiinflammatorischen Zytokinen eine geringere Proliferationsrate der Splenozyten innerhalb der Co-Kultur. Speziell das von T-Zellen stammende INF- γ ist maßgeblich dafür verantwortlich, dass MSC ihr immunsuppressives Potential entfalten können⁶¹. Dies untermauert auch

unsere Untersuchung der Co-Kulturen, bei der wir eine Inhibition der Proliferation durch MSC bei Mitogen (ConA) stimulierten T-Lymphozyten nachweisen konnten. Dieser Effekt wurde durch INF- γ signifikant verstärkt (Abb. 28).

Aufgrund dieser Beobachtungen gehen wir davon aus, dass MSC in-vivo zuerst aktiviert werden müssen um das Transplantatüberleben zu verlängern. Da sich die Level von INF- γ im Serum der ausschließlich mit MMF behandelten Tiere nicht von denen der Kontrollgruppe unterscheidet (Abb. 29), gehen wir ebenso davon aus, dass MMF nicht mit der INF- γ Synthese und Ausschüttung interferiert und somit für die Aktivierung der MSC kein Hindernis darstellt. Dies deckt sich auch mit der Beobachtung, dass MMF nicht die Aktivierung von T-Lymphozyten beeinflusst und so eine Ausschüttung von INF- γ ermöglicht. Cyclosporin hingegen beeinflusst die Zytokinproduktion und könnte somit potenziell einer Aktivierung von MSC im Wege stehen⁶². In der Zusammenschau der Ergebnisse ergibt sich, dass Cyclosporin in Kombination mit MSC im Gegensatz zu MMF, nicht in der Lage ist das Transplantatüberleben in-vivo zu verlängern⁴¹, da ein essentieller Bestandteil des beobachteten Effektes auf der Ausschüttung von INF- γ beruht.

Zusammenfassend schließen wir aus den Beobachtungen und Befunden, dass allogene MSC nach intravenöser Applikation in einem Organtransplantationssetting eine Immunantwort auslösen und Effektor T-Zellen aktivieren. Zu diesem Zeitpunkt könnten MSC selbst als APC fungieren oder als Ziele für den ‚direct recognition pathway‘ dienen^{63 64}. Wenn man die schnelle Aktivierung von T-Zellen durch MSC bedenkt, würde man eine frühzeitigere Abstoßung der Transplantate bei MSC/MMF und rein MSC behandelten Tieren (Gruppe 2+4) erwarten. Tatsächlich finden sich nahezu keine aktivierten T-Zellen am Tag 10 nach der Transplantation in den sekundär lymphatischen Organen derer Tiere, welche mit MSC und MMF behandelt wurden. Interessanterweise ist genau diese Beobachtung gut mit der Eigenschaft von MMF Einklang zu bringen, spezifisch auf aktivierte T-Zellen zu wirken und diese zu eliminieren¹². Wir nehmen an, dass durch die Applikation von MMF jene T-Zellen, die durch die injizierten allogenen MSC aktiviert wurden, eliminiert werden, während dies bei einer reinen Behandlung mit MSC nicht der Fall ist. In Zusammenhang mit diesem Ergebnis fanden wir am Tag 10 nach der Transplantation nur wenige Ox6+ APCs in den Transplantaten der MMF/MSC Gruppe (Abb. 25a).

Durch diese Arbeit konnten Hinweise auf die Wirkweise der mesenchymalen Stammzellen in Kombination mit dem Immunsuppressivum MMF erbracht werden. Letztendlich bleibt der genaue Wirkmechanismus auch aufgrund der vielfältigen Beeinflussungsmöglichkeiten des Immunsystems weiterhin in großen Teilen unklar und bedarf weiterer Forschungsanstrengungen. Aufgrund der geringen Studienpopulation der Versuchstiere waren in diese Arbeit nicht immer signifikante Ergebnisse zu erzielen, es zeichnen sich jedoch häufig gut ersichtliche Tendenzen ab, die u.a. Gegenstand dieser Diskussion waren und als solche beschrieben wurden.

Ein interessanter Ansatzpunkt für weitere Erkenntnisse könnte die Untersuchung der Rolle von Interleukin-2 in unserem Versuchssetting darstellen. CD28 als Aktivierungsmarker der zytotoxischen T-Zellen stellt zusätzlich ein potentes Signal für die Produktion von Interleukin-2 dar⁶⁵, welches wiederum für die Differenzierung nativer T-Zellen eine Rolle spielt.

Trotz der noch vorhandenen Unwägbarkeiten bieten MSC einzigartige Möglichkeiten im Rahmen der Transplantationsmedizin, sowohl im Bereich der Hämatonkologie in der die immunsuppressive Therapie mittels MSC bereits etabliert ist, als auch bei der Transplantation solider Organe. Im Bereich der Transplantation von Soliden Organen wurde bereits eine Phase 1 Studie zur Verträglichkeit von MSC begonnen⁶⁶. Gerade im Bereich der humanen Organtransplantation ist es jedoch oft nicht möglich, wie in unserem Versuchsaufbau auf MSC des Spenders zurück zu greifen, sodass nur bereits vorhandene MSC als Therapeutikum in Frage kommen. Innerhalb der nächsten Jahre ist aufgrund der aktuellen Forschungsergebnisse und Anstrengungen zu erwarten, dass MSC als additives Therapeutikum neben der bereits fest verankerten medikamentösen Immunsuppression eine Rolle spielen werden.

7 Zusammenfassung

Mesenchymale Stammzellen haben sich in den letzten Jahren immer mehr zu einer vielversprechenden Möglichkeit bei der Therapie verschiedenster Krankheitsbilder entwickelt. In der Transplantationsmedizin bieten sie sich als komplementäre Therapieform zu den etablierten, immunsuppressiven Therapien an und eröffnen neue Möglichkeiten. Am erfolgreichsten werden MSCs heute schon in der Therapie der Graft-versus-Host-Disease eingesetzt. Bei unseren Untersuchungen stellte sich heraus, dass durch die Verabreichung mesenchymaler Stammzellen in Kombinationstherapie mit MMF bei der Transplantation solider Organe, ein Vorteil, bezogen auf das Transplantatüberleben im Tiermodell zu erreichen ist.

Ein entscheidender Mechanismus für diese Beobachtung könnte sein, dass durch die am Tag -4 vor der Transplantation in die Schwanzvene injizierten MSC, T-Zellen zwar vorsensibilisiert werden, diese jedoch durch die 7-tägige Gabe von 20mg/kgKG Mycophenolat-Mofetil wieder eliminiert werden. Die frühe Aktivierung der APCs wird durch einen hohen Anteil aktivierter APCs (Ox6+/CD86+) an Tag 1 in abdominalen Lymphknoten als auch in der Milz beschrieben. Dies konnte in den Untersuchungen zum einen der CD4+/CD28+ T-Zellen in abdominalen Lymphknoten sowie den CD8+/CD28+ T-Zellen der Milz, in denen eine deutliche Expression von Aktivierungsmarkern durchflusszytometrisch vorlag, als auch durch die ausbleibende Migration der APCs in das Transplantat der Versuchsgruppe, immunhistochemisch gezeigt werden. Zudem spricht die verminderte Anzahl CD8+/CD28+ T-Zellen an Tag 10 im Vergleich von MMF und MSC behandelten Tieren zu den Tieren der Kontrollgruppe für These der Elimination durch MMF. Auch der prozentuale Anteil der Ox6+/CD86+ Zellen im peripheren Blut und der Milz an Tag 1 der Untersuchungen unterstützt dies.

Nicht zuletzt benötigen mesenchymale Stammzellen eine Umgebung der Zytokinstimulation um effektiv immunsuppressiv wirken zu können. In den im Versuchsaufbau gemessene INF- γ Level im Serum der Versuchstiere aller Gruppen konnten keine Unterschiede festgestellt werden, sodass davon ausgegangen werden kann, dass eine effektive Aktivierung der MSC möglich ist und keine Beeinflussung durch MMF vorliegt.

In der Zusammenschau der Ergebnisse ergibt sich das Bild, dass der Erfolg der Kombinationstherapie von MSC und MMF auf mehreren Standbeinen fußt. Einerseits erfolgt eine Modulation des Endothels der transplantierten Organe. Damit wird eine verringerte Transmigration der APCs und Leukozyten in das Transplantat erreicht. Andererseits werden aktivierte Lymphozyten durch die Verabreichung von MMF eliminiert. Gleichzeitig werden Ausreifung und Differenzierung der antigenpräsentierenden Zellen verzögert, aber nicht verhindert. Auch unter diesem Aspekt ist eine mögliche Rolle regulatorischer APCs denkbar.

8 Summary

Mesenchymal stem cells (MSC) are promising candidates for the therapy of a variety of diseases. In transplant medicine MSC could become a complementary form of therapy to the currently used 'state of the art' immunosuppression. MSCs are currently most successful in the treatment of graft-versus-host reactions after bone marrow transplantation. In animal models of solid organ transplantation, MSC prolong survival of transplanted heart grafts whilst MSC alone cause accelerated graft rejection. To find the mechanism behind this observation we transplanted LEW hearts into the abdominal cavity of ACI rats. 4 Groups were created: (Gr. 1 only transplantation, Gr.2 MSC treatment, Gr.3 MMF treatment, Gr. 4 MMF and MSC treatment). After 12h, 1 day, 3 days, and 10 days blood, abdominal and paraaortal lymph nodes, bone marrow, spleen cells and the heart graft were harvested and taken for further investigation. In the subsequent analysis it became obvious that the application of allogenic mesenchymal stem cells in combination with short-term immunosuppression using mycophenolate-mofetil (MMF) is beneficial for graft survival in the described rat model. The mechanism responsible for this observation may be that the MSC injected in the tail vein on day -4 prior to transplantation can trigger the pre-sensitization of T-cells and that these activated T-cells are subsequently eliminated by the application of MMF. In addition APCs (antigen presenting cells) play an important role in this setting. MSC seem to delay dendritic cells activation, but cannot completely prevent them from maturation and differentiation, so that a regulatory influence of APC is still possible. Animals treated with MSC showed a high infiltration with T-cells compared to animals treated with MMF and MSC representing accelerated rejection of the graft. The controlled reduction of intracellular adhesion molecule 1 (CAM1) and E-Selectin at the endothelium by the combination of MMF and MSC is responsible for the attenuated transmigration of lymphocytes. In vitro enhanced T-cell suppression by MSC could be observed by the additional presence of INF- γ . Based on our results, MMF did not influence INF- γ levels in vivo. In conclusion our data show a unique synergistic protective effect by the combination of MMF and MSC in the organ transplant setting. Further investigation will help to develop new innovative strategies of immuno-protective treatment in human organ transplantation.

9 Anhänge

9.1 Abbildungsverzeichnis

Abb. 1: Auszug aus dem Eurotransplant Jahresbericht 2012

Abb. 2: genomische und nichtgenomische Wirkweise von Cortison innerhalb der Zelle (Graphik übernommen aus:⁷⁾

Abb. 3: Wirkmechanismus von MMF auf die De-Novo-Purin-Biosynthese^{13,14} (mod. Darstellung nach Allison *et al*)

Abb. 4: Differenzierung embryonaler Stammzellen in die jeweiligen Gewebe

Abb. 5: Schematischer Aufbau des FACScalibur Durchflusszytometers (übernommen aus²⁸⁾)

Abb. 6: Pipettierschema der Proben und hinzugefügter Antikörper auf einer 96-Well Rundboden-Platte

Abb. 7:

- a) Leukozyten-Gate im FSC/SSC-Scatter (Differenzierung der Zellen nach Größe und Granularität)
- b) CD3⁺-Zellen (APC;FL4) und CD8⁺ Zellen (PerCP;FL3) (Differenzierung zwischen nativen und reifen CD8⁺ T-Zellen)
- c) CD3⁺-Zellen (APC;FL4) und CD4⁺ Zellen (FITC; FL1) (Differenzierung zwischen nativen und reifen CD4⁺ T-Zellen)

Abb. 8: Pipettierschema für die Inkubation des Proliferationsassays

Abb. 9: molekulare Struktur von CFSE

Abb. 10: Auswertungsschema und Bildung des IHS (Immunhistochemiescore) der immunhistochemisch behandelten Feingewebschnitte

Abb. 11: Aufbau und Funktionsweise eines ELISA-Tests (©abcam[®])³⁰

Abb. 12: Einteilung und Nummerierung der Versuchstiere im Versuchsaufbau

Abb. 13: Zeitlicher Ablauf des Versuchsaufbaus, Zeiten der Medikationsverabreichung sowie Auswertzeitpunkte der Versuchstiere

Abb. 14: tägliche palpatorische Kontrolle der Transplantatvitalität

Abb. 15: Entnahme des Transplantates (hier bereits erfolgt), Milz, Femur, Blutproben sowie der abdominalen und mesenterialen Lymphknoten

Abb. 16: Darstellung mesenterialer Lymphknoten vor der Entnahme und Aufbereitung

Abb. 17: Darstellung paraaortaler Lymphknoten vor der Entnahme und Aufbereitung

Abb. 18: Prozentualer Anteil CD4⁺ CD28⁺ Lymphozyten (aktivierte T-Zellen) in der durchflusszytometrischen Analyse der abdominalen Lymphknoten der untersuchten Tiergruppen. Untersucht wurden 3 Tiere je Gruppe (n=3) und Untersuchungszeitpunkt.

* $p < 0,05$, einseitiger T-Test

Abb. 19: Prozentualer Anteil CD8⁺ CD28⁺ Lymphozyten (aktivierte T-Zellen) in der durchflusszytometrischen Analyse der abdominalen Lymphknoten der untersuchten Tiergruppen. Untersucht wurden 3 Tiere je Gruppe (n=3) und Untersuchungszeitpunkt.

Abb. 20: Prozentualer Anteil CD8⁺CD28⁺ T-Lymphozyten in der Milz. Zu erkennen ist eine signifikant verringerte Fraktion der aktivierten T-Zellen in der Gruppe der MSC+MMF Kootherapie im Vergleich zur Referenzgruppe. Untersucht wurden 3 Tiere je Gruppe (n=3) und Untersuchungszeitpunkt.

* $p < 0,05$, einseitiger T-Test

Abb.21: tägliche palpatorische Kontrollen der Herzaktion und die durch Sistieren der Heraktion gekennzeichnete Abstoßung der Spenderorgane im zeitlichen Verlauf des Versuchsaufbaus innerhalb der verschiedenen Versuchsgruppen.

Abb. 22: Prozentualer Anteil Ox6⁺/CD86⁺ Zellen am Tag 1 nach Transplantation in Milz peripherem Blut und abdominalen Lymphknoten. * $p < 0,05$, einseitiger T-Test

Abb. 23: Prozentualer Anteil Ox6⁺/CD86⁺ Zellen am Tag 10 nach der Transplantation in Milz und abdominalen Lymphknoten. Die vorher signifikant verringerte Anzahl an positiv gefärbten Zellen bei Tieren, welche einer Therapie mit MSC unterzogen wurden ist nicht mehr nachweisbar.

Abb. 24: Beispielhafte Darstellung der Feingewebsschnitte nach der immunhistochemischen Färbung mit markierten Antikörpern gegen ICAM-1, Ox6 und R73. Der dargestellte Maßstab entspricht 100µm.

Abb. 25: Auswertung der immunhistochemisch gefärbten Gewebeschnitte in 40x Vergrößerung und deren graphische Darstellung nach Erstellung des Immunhistochemie-Score nach Solsow.

- a) Scoring der Ox6 gefärbten Schnitte
- b) Scoring der R73 gefärbten Schnitte
- c) Scoring der ICAM 1 gefärbten Schnitte

Abb. 26: Darstellung immunhistochemisch mittels Antikörpern gegen E-Selectin und CD31 gefärbter repräsentativer Gewebeschnitte der transplantierten Herzen der Gruppe 1 und 4 des Auswertungstages 10

Abb. 27: Scoring der CD31 und E-Selectin immunhistochemisch gefärbten Schnitte der Gruppen 1 und 4. am Tag 10; * $p < 0.05$ (einseitiger T-Test); ** $p < 0.001$ (einseitiger T-Test)

Abb. 28: Einfluss von $\text{INF-}\gamma$ (50U/ml) und MSC (3×10^4) auf CFSE gefärbte Splenozyten ($1,5 \times 10^5$) in der in-Vitro Ko-Kultur unter Proliferationsstimulation mittels ConA (2ng/ml). Gezeigt ist die durchflusszytometrische Analyse der Proliferation durch zellteilungsbedingte Abnahme der Fluoreszenzintensität.

Abb. 29: Serum $\text{INF-}\gamma$ -Level der Versuchstiere der Kontrollgruppe (Gruppe 1) und der MMF behandelten Tiere (Gruppe 3)

9.2 Literaturverzeichnis

1. Barnard CN. Human cardiac transplantation. An evaluation of the first two operations performed at the Groote Schuur Hospital, Cape Town. *Am J Cardiol* 1968;22:584-96.
2. Tiroke A, Herrmann G, Barth J, Sievers HH, Haverich A, Simon R. [Fatal Aspergillus sepsis following orthotopic heart transplantation]. *Dtsch Med Wochenschr* 1995;120:912-6.
3. Eurotransplant. Yearly Statistic. Leiden2013 14.01.2013.
4. De-Lin G, Lu-Lin M, Bu-Lang H. Effects of HLA matching on the results of kidney transplantation (81 case reports). *Transplant Proc* 1998;30:3498-9.
5. Neumann UP, Langrehr JM, Lang M, et al. Impact of HLA matching upon outcome after liver transplantation. *Transplant Proc* 2002;34:1499-500.
6. Murphy K. Janeway's Immunobiology: Garland Science; 2012.
7. Estler C-J, Schmidt H. Pharmakologie und Toxikologie: Schttauer; 2007.
8. Collins RH. Tacrolimus (FK506) versus cyclosporin in prevention of liver allograft rejection. *Lancet* 1994;344:949.
9. McAlister VC, Haddad E, Renouf E, Malthaner RA, Kjaer MS, Gluud LL. Cyclosporin versus tacrolimus as primary immunosuppressant after liver transplantation: a meta-analysis. *Am J Transplant* 2006;6:1578-85.
10. Borders EB, Bivona C, Medina PJ. Mammalian target of rapamycin: biological function and target for novel anticancer agents. *Am J Health Syst Pharm* 2010;67:2095-106.
11. Popp FC, Eggenhofer E, Renner P, et al. Mesenchymal stem cells can induce long-term acceptance of solid organ allografts in synergy with low-dose mycophenolate. *Transpl Immunol* 2008;20:55-60.
12. Chaigne-Delalande B, Guidicelli G, Couzi L, et al. The immunosuppressor mycophenolic acid kills activated lymphocytes by inducing a nonclassical actin-dependent necrotic signal. *J Immunol* 2008;181:7630-8.
13. Allison AC. Mechanisms of action of mycophenolate mofetil. *Lupus* 2005;14 Suppl 1:s2-8.
14. Rassow J, Hauser K, R. N, Deutzmann R. Duale Reihe Biochemie: Thieme; 2006.
15. von Bonin M, Stolzel F, Goedecke A, et al. Treatment of refractory acute GVHD with third-party MSC expanded in platelet lysate-containing medium. *Bone Marrow Transplant* 2009;43:245-51.

16. Brunstein CG, Miller JS, Cao Q, et al. Infusion of ex vivo expanded T regulatory cells in adults transplanted with umbilical cord blood: safety profile and detection kinetics. *Blood* 2011;117:1061-70.
17. Hoffmann P, Ermann J, Edinger M, Fathman CG, Strober S. Donor-type CD4(+)CD25(+) regulatory T cells suppress lethal acute graft-versus-host disease after allogeneic bone marrow transplantation. *J Exp Med* 2002;196:389-99.
18. Alison MR, Poulsom R, Jeffery R, et al. Hepatocytes from non-hepatic adult stem cells. *Nature* 2000;406:257.
19. Clarke DL, Johansson CB, Wilbertz J, et al. Generalized potential of adult neural stem cells. *Science* 2000;288:1660-3.
20. Castro. Failure of bone marrow cells to transdifferentiate into neural cells in vivo. *Science* 2002:1299.
21. Dong W, Du J, Shen H, et al. Administration of embryonic stem cells generates effective antitumor immunity in mice with minor and heavy tumor load. *Cancer Immunol Immunother* 2010;59:1697-705.
22. Arnhold S, Klein H, Semkova I, Addicks K, Schraermeyer U. Neurally selected embryonic stem cells induce tumor formation after long-term survival following engraftment into the subretinal space. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2004;45:4251-5.
23. Stewart TA, Mintz B. Successive generations of mice produced from an established culture line of euploid teratocarcinoma cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1981;78:6314-8.
24. Prockop DJ. Further proof of the plasticity of adult stem cells and their role in tissue repair. *J Cell Biol* 2003;160:807-9.
25. Horwitz EM, Le Blanc K, Dominici M, et al. Clarification of the nomenclature for MSC: The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy* 2005;7:393-5.
26. Pittenger MF, Mackay AM, Beck SC, et al. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science* 1999;284:143-7.
27. Machado Cde V, Telles PD, Nascimento IL. Immunological characteristics of mesenchymal stem cells. *Rev Bras Hematol Hemoter* 2013;35:62-7.
28. Biosciences B. BD Facscalibur The flow cytometer for your routine cell analysis needs. 2009.

29. Soslow RA, Dannenberg AJ, Rush D, et al. COX-2 is expressed in human pulmonary, colonic, and mammary tumors. *Cancer* 2000;89:2637-45.
30. Products Data Sheet. 2015. (Accessed 17.03.2015, 2015, at http://www.epitomics.com/products/product_info/1257.)
31. Renner P, Eggenhofer E, Rosenauer A, et al. Mesenchymal stem cells require a sufficient, ongoing immune response to exert their immunosuppressive function. *Transplant Proc* 2009;41:2607-11.
32. Popp FC, Eggenhofer E, Renner P, et al. Mesenchymal stem cells can affect solid organ allograft survival. *Transplantation* 2009;87:S57-62.
33. Reed AJ, Noorchashm H, Rostami SY, et al. Alloreactive CD4 T cell activation in vivo: an autonomous function of the indirect pathway of alloantigen presentation. *J Immunol* 2003;171:6502-9.
34. Brennan TV, Jaigirdar A, Hoang V, et al. Preferential priming of alloreactive T cells with indirect reactivity. *Am J Transplant* 2009;9:709-18.
35. Ochando JC, Krieger NR, Bromberg JS. Direct versus indirect allorecognition: Visualization of dendritic cell distribution and interactions during rejection and tolerization. *Am J Transplant* 2006;6:2488-96.
36. Muller WA, Weigl SA, Deng X, Phillips DM. PECAM-1 is required for transendothelial migration of leukocytes. *J Exp Med* 1993;178:449-60.
37. Ley K, Kansas GS. Selectins in T-cell recruitment to non-lymphoid tissues and sites of inflammation. *Nat Rev Immunol* 2004;4:325-35.
38. Hoogduijn MJ, Crop MJ, Korevaar SS, et al. Susceptibility of human mesenchymal stem cells to tacrolimus, mycophenolic acid, and rapamycin. *Transplantation* 2008;86:1283-91.
39. Dahlke MH, Hoogduijn M, Eggenhofer E, et al. Toward MSC in solid organ transplantation: 2008 position paper of the MISOT study group. *Transplantation* 2009;88:614-9.
40. Hoogduijn MJ, Popp FC, Grohnert A, et al. Advancement of mesenchymal stem cell therapy in solid organ transplantation (MISOT). *Transplantation* 2010;90:124-6.
41. Inoue S, Popp FC, Koehl GE, et al. Immunomodulatory effects of mesenchymal stem cells in a rat organ transplant model. *Transplantation* 2006;81:1589-95.

42. Le Blanc K, Tammik L, Sundberg B, Haynesworth SE, Ringden O. Mesenchymal stem cells inhibit and stimulate mixed lymphocyte cultures and mitogenic responses independently of the major histocompatibility complex. *Scand J Immunol* 2003;57:11-20.
43. Tse WT, Pendleton JD, Beyer WM, Egalka MC, Guinan EC. Suppression of allogeneic T-cell proliferation by human marrow stromal cells: implications in transplantation. *Transplantation* 2003;75:389-97.
44. Di Nicola M, Carlo-Stella C, Magni M, et al. Human bone marrow stromal cells suppress T-lymphocyte proliferation induced by cellular or nonspecific mitogenic stimuli. *Blood* 2002;99:3838-43.
45. Nauta AJ, Westerhuis G, Kruisselbrink AB, Lurvink EG, Willemze R, Fibbe WE. Donor-derived mesenchymal stem cells are immunogenic in an allogeneic host and stimulate donor graft rejection in a nonmyeloablative setting. *Blood* 2006;108:2114-20.
46. Eliopoulos N, Stagg J, Lejeune L, Pommey S, Galipeau J. Allogeneic marrow stromal cells are immune rejected by MHC class I- and class II-mismatched recipient mice. *Blood* 2005;106:4057-65.
47. Badillo AT, Beggs KJ, Javazon EH, Tebbets JC, Flake AW. Murine bone marrow stromal progenitor cells elicit an in vivo cellular and humoral alloimmune response. *Biol Blood Marrow Transplant* 2007;13:412-22.
48. Spaggiari GM, Abdelrazik H, Becchetti F, Moretta L. MSCs inhibit monocyte-derived DC maturation and function by selectively interfering with the generation of immature DCs: central role of MSC-derived prostaglandin E2. *Blood* 2009;113:6576-83.
49. Djouad F, Charbonnier LM, Bouffi C, et al. Mesenchymal stem cells inhibit the differentiation of dendritic cells through an interleukin-6-dependent mechanism. *Stem Cells* 2007;25:2025-32.
50. Beyth S, Borovsky Z, Mevorach D, et al. Human mesenchymal stem cells alter antigen-presenting cell maturation and induce T-cell unresponsiveness. *Blood* 2005;105:2214-9.
51. Ramasamy R, Fazekasova H, Lam EW, Soeiro I, Lombardi G, Dazzi F. Mesenchymal stem cells inhibit dendritic cell differentiation and function by preventing entry into the cell cycle. *Transplantation* 2007;83:71-6.
52. Li YP, Paczesny S, Lauret E, et al. Human mesenchymal stem cells license adult CD34+ hemopoietic progenitor cells to differentiate into regulatory dendritic cells through activation of the Notch pathway. *J Immunol* 2008;180:1598-608.

53. Gur-Wahnon D, Borovsky Z, Beyth S, Liebergall M, Rachmilewitz J. Contact-dependent induction of regulatory antigen-presenting cells by human mesenchymal stem cells is mediated via STAT3 signaling. *Exp Hematol* 2007;35:426-33.
54. Zhang B, Liu R, Shi D, et al. Mesenchymal stem cells induce mature dendritic cells into a novel Jagged-2-dependent regulatory dendritic cell population. *Blood* 2009;113:46-57.
55. Turnquist HR, Raimondi G, Zahorchak AF, Fischer RT, Wang Z, Thomson AW. Rapamycin-conditioned dendritic cells are poor stimulators of allogeneic CD4+ T cells, but enrich for antigen-specific Foxp3+ T regulatory cells and promote organ transplant tolerance. *J Immunol* 2007;178:7018-31.
56. Schnoor M. Endothelial actin-binding proteins and actin dynamics in leukocyte transendothelial migration. *J Immunol* 2015;194:3535-41.
57. Glomsda BA, Blaheta RA, Hailer NP. Inhibition of monocyte/endothelial cell interactions and monocyte adhesion molecule expression by the immunosuppressant mycophenolate mofetil. *Spinal Cord* 2003;41:610-9.
58. Ma L, Mauro C, Cornish GH, et al. Ig gene-like molecule CD31 plays a nonredundant role in the regulation of T-cell immunity and tolerance. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2010;107:19461-6.
59. Ensminger SM, Spriewald BM, Steger U, Morris PJ, Mak TW, Wood KJ. Platelet-endothelial cell adhesion molecule-1 (CD31) expression on donor endothelial cells attenuates the development of transplant arteriosclerosis. *Transplantation* 2002;74:1267-73.
60. English K, Barry FP, Field-Corbett CP, Mahon BP. IFN-gamma and TNF-alpha differentially regulate immunomodulation by murine mesenchymal stem cells. *Immunol Lett* 2007;110:91-100.
61. Krampera M, Cosmi L, Angeli R, et al. Role for interferon-gamma in the immunomodulatory activity of human bone marrow mesenchymal stem cells. *Stem Cells* 2006;24:386-98.
62. Reem GH, Cook LA, Vilcek J. Gamma interferon synthesis by human thymocytes and T lymphocytes inhibited by cyclosporin A. *Science* 1983;221:63-5.
63. Stagg J, Pommey S, Eliopoulos N, Galipeau J. Interferon-gamma-stimulated marrow stromal cells: a new type of nonhematopoietic antigen-presenting cell. *Blood* 2006;107:2570-7.

64. Chan JL, Tang KC, Patel AP, et al. Antigen-presenting property of mesenchymal stem cells occurs during a narrow window at low levels of interferon-gamma. *Blood* 2006;107:4817-24.
65. Bour-Jordan H, Blueston JA. CD28 function: a balance of costimulatory and regulatory signals. *Journal of clinical immunology* 2002;22:1-7.
66. Soeder Y, Loss M, Johnson CL, et al. First-in-Human Case Study: Multipotent Adult Progenitor Cells for Immunomodulation After Liver Transplantation. *Stem Cells Transl Med* 2015;4:899-904.

10 Danksagung

Ich möchte diese Gelegenheit nutzen um mich herzlich bei Prof. Dr. Marc-H. Dahlke für die Fragestellung und Überlassung dieses interessanten Themas sowie dessen Betreuung zu bedanken. Ebenfalls eingeschlossen in diesen Dank, sind selbstverständlich alle Teammitglieder der Arbeitsgruppe, Dr. E. Eggenhofer, PD Dr. F. Popp sowie Dr. P. Renner ohne deren fachliche Unterstützung und wissenschaftlichen Diskurs sowie die Mentorentätigkeiten zum Erlernen wissenschaftlichen Arbeitens, diese Dissertation nicht möglich gewesen wäre.

Bei Irina Kucuk und Matthias Hornberg möchte ich mich für die herausragende technische Laborarbeit und die Vermittlung sowohl der laborchemischen Grundlagen als auch der manuellen Tätigkeiten bedanken.

Meiner Familie gebührt an diese Stelle besondere Erwähnung und Dank, da sie mich bisher in allen Lebenslagen tatkräftig unterstützte und mir nicht zuletzt das Studium der Humanmedizin ermöglicht hat.