

*AUS DEM LEHRSTUHL FÜR CHIRURGIE  
PROF. DR. MED HANS-JÜRGEN SCHLITT  
DER FAKULTÄT FÜR MEDIZIN  
DER UNIVERSITÄT REGENSBURG*

*SYNERGISMUS ZWISCHEN MYCOFENOLATMOFETIL UND MESENCHYMALEN STAMMZELLEN  
IN EINEM F1-MAUS-MODEL*

Inaugural – Dissertation  
zur Erlangung des Doktorgrades  
*der Medizin*

der  
Fakultät für Medizin  
der Universität Regensburg

vorgelegt von  
*Yorick Soeder*

2017



*AUS DEM LEHRSTUHL FÜR CHIRURGIE  
PROF. DR. MED HANS-JÜRGEN SCHLITT  
DER FAKULTÄT FÜR MEDIZIN  
DER UNIVERSITÄT REGENSBURG*

*SYNERGISMUS ZWISCHEN MYCOFENOLATMOFETIL UND MESENCHYMALEN STAMMZELLEN  
IN EINEM F1-MAUS-MODEL*

Inaugural – Dissertation  
zur Erlangung des Doktorgrades  
*der Medizin*

der  
Fakultät für Medizin  
der Universität Regensburg

vorgelegt von  
*Yorick Soeder*

2017

Dekan: *Prof. Dr. Dr. Torsten E. Reichert*

1. Berichterstatter: *Prof. Dr. med. Marc H. Dahlke, PhD*

2. Berichterstatter: *PD Dr. med. Arne Kandulski*

Tag der mündlichen Prüfung: *08. Januar 2018*

## **Inhalt**

Inhalt .....	1
1 Einleitung und Fragestellung .....	3
1.1 Transplantationen sind notwendig .....	3
1.2 Immunsuppression ist nach Transplantation unumgänglich .....	4
1.3 Begriffserklärung: Stammzelle .....	7
1.4 Hämatopoetische Stammzellen in der Organtransplantation .....	7
1.5 Mesenchymale Stammzellen (MSC) .....	8
1.6 Etablierung des fl-Modells .....	11
1.7 Fragestellung und Zielsetzung .....	13
2 Material und Methoden .....	14
2.1 Material .....	14
2.1.1 Verbrauchsmaterial .....	14
2.1.2 Chemikalien .....	14
2.1.3 Antikörper .....	15
2.1.4 Chirurgisches und sonstiges Material .....	15
2.1.5 Geräte .....	15
2.1.6 Programme .....	16
2.2 Labormethoden .....	16
2.2.1 Versuchstiere .....	16
2.2.2 Gewinnung, Aufreinigung und Langzeitkultivierung von MSC .....	17
2.2.3 Differenzierung der MSC .....	17
2.2.4 Effektorzellen: Einzelzellsuspension & CFSE-Färbung .....	18
2.2.5 Zellaufbereitung & Durchflusszytometrie .....	19
2.2.6 Proliferationsanalyse .....	21
2.2.7 Applikation der Immunsuppressiva .....	22
2.2.8 Tiermodell .....	23
2.2.9 Versuchs- & Gruppendesign .....	24
3 Ergebnisse .....	30
3.1 Etablierung des fl-Modells .....	30
3.2 Effekt von MSC auf die T-Zell-Proliferation .....	34
3.3 Effekt der medikamentösen Immunsuppression auf die T-Zell-Proliferation .....	35
3.3.1 Mycophenolat Mofetil .....	36

3.3.2	Ciclosporin A.....	37
3.3.3	Sirolimus.....	38
3.4	Effekt der Kombinationstherapie.....	40
3.4.1	Mycofenolat Mofetil & MSC.....	40
3.4.2	Ciclosporin A & MSC.....	42
3.4.3	Sirolimus + MSC.....	43
3.5	Proliferationsanalyse der CD8-T-Zellen.....	44
4	Diskussion.....	46
4.1	Eignung des fl-Modells zur Beurteilung der T-Zell-Proliferation in-vivo.....	46
4.2	Dosisabhängige Wirkung der Immunsuppressiva in der Profilerationsanalyse.....	47
4.3	CD4-T-Zell-Proliferation unter kombinierter Therapie mit MSC und medikamentöser Immunsuppression.....	49
4.4	Fazit.....	51
4.5	Ausblick.....	53
5	Zusammenfassung.....	54
6	Literatur.....	56
7	Lebenslauf.....	62
8	Eidesstattliche Erklärung.....	63
9	Danksagung.....	64

# 1 Einleitung und Fragestellung

## 1.1 Transplantationen sind notwendig

Die Organtransplantation stellt eine der wichtigsten medizinischen Errungenschaften des vergangenen Jahrhunderts dar. Sie bietet in akut lebensbedrohlichen Situationen einen kurativen Ausweg und verbessert die Lebenserwartung und Lebensqualität chronisch kranker Patienten<sup>(1)</sup>. In Europa wurden im Jahr 2016 über 6100 Organe alleine nach postmortaler Spende transplantiert<sup>(2)</sup>, bei einer zunehmenden Anzahl an Lebendspenden. In Deutschland meldet die Deutsche Stiftung Organtransplantation (DSO) im selben Jahr inklusive Lebendspenden die Transplantation von 2094 Nieren, 888 Lebern, 328 Lungen, 297 Herzen und 97 Pankreata<sup>(3)</sup>. Für Patienten mit terminaler Niereninsuffizienz ist eine Dialyse als Nierenersatzverfahren möglich, um die Wartezeit bis zu einer Transplantation, selbst bei völligem Organausfall, für bis zu mehrere Jahre zu überbrücken. Häufig geht dies jedoch mit enormer Beeinträchtigung der Lebensqualität einher. Für Patienten die an einer terminalen Herz-, Lungen- oder Lebererkrankung leiden bleibt eine Transplantation oft der einzige kurative Therapieansatz. Die Indikation zur Organtransplantation besteht laut Richtlinien der Bundesärztekammer bei terminaler Insuffizienz eines Organs oder Organsystems aufgrund einer nicht rückbildungsfähig fortschreitenden oder durch einen genetischen Defekt bedingten Erkrankung. Diese muss nach den Richtlinien das Leben des Patienten gefährden oder die Lebensqualität hochgradig einschränken und durch die Transplantation kurativ behandelt werden können<sup>(1)</sup>. Ausschlaggebend für die Aufnahme in die Eurotransplant-Warteliste ist neben der unzweifelhaften Notwendigkeit der voraussichtliche Erfolg einer Transplantation. Dabei sind das Überleben des Empfängers, eine langfristig gesicherte Funktion des Transplantats und eine verbesserte Lebensqualität zentrale Aspekte dieses Erfolges<sup>(1)</sup>.

Zu Beginn der Transplantationsmedizin stellten vor allem chirurgische und perioperative Komplikationen sowie hyperakute Abstoßungen die Medizin vor große Probleme. Hyperakute Abstoßungen kommen durch bereits vor der Transplantation zirkulierende, spenderspezifische Antikörper, zum Beispiel durch eine zuvor stattgehabte Bluttransfusion, zustande. Akute Abstoßungen hingegen sind T-Zell vermittelt und basieren auf dem Erkennen von fremden Major-Histocompatibility-Complexen (MHC) durch das Immunsystem des Empfängers. Insbesondere Nierentransplantate zeigen nach durchgemachter akuter Abstoßung häufig irreversible Funktionseinschränkungen. Vorbeugend wird deshalb vor einer Nierentransplantation eine Typisierung der im Blut des

Empfängers vorhandenen Antikörper (CrossMatch) und humanen Leukozytenantigene (HLA; synonym zu MHC) von Spender und Empfänger durchgeführt, um eine ideale Kombination aus Spender- und Empfängerantigenen zu erreichen und die Gefahr von akuten Abstoßungsreaktionen zu reduzieren.

Dennoch werden auch bei idealer MHC-Kombination, und selbst bei Transplantationen im Rahmen einer Lebendspende zwischen eineiigen Zwillingen Abstoßungsreaktionen beobachtet. Die Ätiologie dieser Abstoßung wird in der Literatur unterschiedlich diskutiert, wahrscheinlich ist sie auf das Vorliegen von non-MHC-Komplexen, den sog. Minor-Histocompatibility-Complex-Antigenen (miHA) zurückzuführen. Dabei handelt es sich um Peptide mit intrazellulärem Ursprung, die ebenfalls auf der Zelloberfläche präsentiert werden und dort für eine CD4- oder CD8-T-Zell vermittelte Immunantwort sorgen<sup>(4)</sup>. miHA unterscheiden sich auch bei nah blutsverwandten Personen und selbst bei monozygoten Zwillingen<sup>(5,6)</sup>. Das Risiko einer akuten Abstoßung macht somit, auch bei bestmöglichem Matching, die medikamentöse Immunsuppression nach Transplantation unumgänglich.

## **1.2 Immunsuppression ist nach Transplantation unumgänglich**

Langzeitakzeptanz von Transplantatorganen kann mit sehr gutem klinischen Erfolg durch medikamentöse immunsuppressive Therapie erreicht werden. Während das Absetzen dieser Therapie in den meisten Fällen eine Abstoßungsreaktion zufolge hat, birgt allerdings auch deren längerfristiger Einsatz eine Vielzahl relevanter Risiken und Gefahren.

Auf der einen Seite ermöglicht also die medikamentöse immunsuppressive Therapie das Überleben des Transplantats, da das Immunsystem nicht gegen das allogenetische Organ vorgeht. Auf der anderen Seite sind auch moderne Immunsuppressiva nicht ausreichend spezifisch, sodass gehäuft opportunistische Infektionen auftreten. Dies geschieht dann in einer grundsätzlich vorhersehbaren Reihenfolge<sup>(7)</sup>, wobei das Spektrum von spender- oder empfängerbedingten, meist nosokomialen, resistenten Keimen, über mykotische und virale Erreger wie Pneumocystis jirovecii, Hepatitis-Viren, Herpes simplex und Cytomegalievirus bis zu ambulant erworbenen Pneumonien oder Harnwegsinfekten reicht. Die Entwicklung von Infektionen kann teilweise durch medikamentöse Prophylaxe abgeschwächt oder ganz verhindert werden, dem steht die Schwächung des Immunsystems durch intensivierte medikamentöse Immunsuppression, medikamentös-toxische Leukopenie und Infektionen durch immunmodulatorisch wirksame Erreger wie das Epstein-Barr-Virus entgegen. Dadurch können für immunkompetente Personen harmlose Expositionen bei transplantierten Patienten

zu schwerwiegenden Infektionen führen, wobei Dosis, Dauer und Ablauf der immunsuppressiven Therapie die Hauptrisikofaktoren darstellen<sup>(8)</sup>. Kurzfristige Reduzierung der Immunsuppression kann dabei zwar hilfreich sein um den akuten Entzündungsprozess zu bewältigen, birgt aber gleichzeitig auch die Gefahr der akuten Transplantatabstoßung.

Nicht nur Infektionen treten gehäuft auf, auch die Inzidenz von Tumorerkrankungen nimmt unter Immunsuppression zu. So liegt zum Beispiel die Inzidenz maligner Neoplasien nach Nierentransplantation 20 Jahre nach der Transplantation bei 40% im Vergleich zu einer Inzidenz von 6% in einer nichttransplantierten Kontrollgruppe gleichen Alters<sup>(9)</sup>. Die häufigsten Tumorentitäten bei organtransplantierten Patienten sind non-melanoma-skin-cancer mit einer Inzidenz von 41% - 82%<sup>(10)</sup>. Die häufigsten Formen des Hautkrebses bei organtransplantierten Patienten sind demnach das Plattenepithelkarzinom mit einem 65- bis 250-fach erhöhtem Risiko und das Basalzellkarzinom mit einem 10-fach erhöhten Risiko. Weitere häufigere Entitäten stellen die post-transplant-lymphoproliferative-disease (PTLD) mit einer Inzidenz von 1% - 5% und das Kaposi-Sarkom mit einer Inzidenz von 6%<sup>(11)</sup> dar, letzteres tritt in diesem Patientenkollektiv somit ähnlich häufig auf wie bei HIV-infizierten Patienten. Tumorerkrankungen treten bei Organempfängern nicht nur häufiger auf, sondern wachsen auch schneller und aggressiver. Pathophysiologisch spielen hier immunsuppressive Medikamente eine entscheidende Rolle, vor allem Ciclosporin erhöht das Risiko einer malignen Entartung dosisabhängig. So zeigten Dantal et al in einer randomisierten Studie, dass Patienten mit einem Ciclosporin-Plasmaspiegel von 150-250 ng/ml signifikant häufiger an Tumoren der Haut erkrankten als solche mit low-dose-Ciclosporin (75-150ng/ml)<sup>(12)</sup>. Auch OKT3 und Tacrolimus erhöhen das Risiko verschiedener Tumorerkrankungen in diesem Zusammenhang<sup>(13,14)</sup>.

Neben dem vermehrten Auftreten von infektiologischen und malignen Ereignissen unter den gängigen immunsuppressiven Medikamenten, zeigen diese selbst eine Reihe starker unerwünschte Wirkungen, sie wirken teilweise toxisch.

Der Calcineurininhibitor Ciclosporin löst eine progrediente Intimafibrose mit daraus folgender zunehmender Glomerulosklerose aus. Außerdem führt er sowohl zu Schäden im Nierentubulus als auch zu renaler interstitieller Fibrose und wirkt damit direkt akut und chronisch nephrotoxisch. Des Weiteren erhöht Ciclosporin durch Verschlechterung von Risikofaktoren wie arterieller Hypertonie, Hyperlipidämie und Diabetes mellitus die kardiovaskuläre Morbidität und Mortalität<sup>(15,16)</sup>. Schließlich wirkt Ciclosporin bei 25%-40%

der Patienten neurotoxisch mit Symptomen, die von Tremor über Schlaflosigkeit, Halluzination oder Dysarthrie bis hin zu Psychose, Manie oder Status epilepticus reichen<sup>(17)</sup>. Der mTOR-Inhibitor Sirolimus gilt als Alternative zu Calcineurininhibitoren, wirkt sich jedoch, laut Studienlage, nicht signifikant positiv auf die glomeruläre Filtrationsrate aus und geht sogar mit gesteigerter Proteinurie einher<sup>(18)</sup>. Ebenso ließen sich in der CONVERT-Studie keine Vorteile für das Patienten- oder Transplantat-Überleben nach Nierentransplantation zeigen, jedoch ein deutlich gesteigertes Risiko für nachteilige Wirkungen wie Hyperlipidämie, Diabetes, Diarrhoe, Knochenmarksdepression oder Infertilität<sup>(19)</sup>. Mycophenolsäure (Mycophenolic acid, MPA), bzw. das klinisch verwendete Prodrug Myophenolat mofetil (MMF) greift durch Inhibierung der Inosin Monophosphat Dehydrogenase (IMPDH) in den Purinstoffwechsel der Lymphozyten ein und unterbindet dadurch effektiv deren Proliferation. Es wirkt weit weniger toxisch, es treten jedoch selten Fälle von Knochenmarksdepression auf. Häufig führt es zu gastrointestinalen Beschwerden wie Diarrhoe, Übelkeit, Erbrechen und abdominellen Schmerzen, deren Auftreten sich limitierend auf die Dosis von MMF auswirken und die trotz Entwicklung einer magensaftresistenten Darreichungsform (enteric-coated mycophenolate sodium, EC-MPS), praktisch unverändert fortbestehen<sup>(20)</sup>.

Die Transplantatakzeptanz fordert mit meist dosisabhängigen, unerwünschten Nebenwirkungen der lebenslangen medikamentösen Immunsuppression ihren Preis und reduziert das Wohlbefinden des transplantierten Patienten. Somit ergibt sich ein zweigeteiltes Bild: Während die Kurzzeitergebnisse der Organtransplantation durch Fortschritte bei der Immunsuppression und dem HLA-Matching akzeptabel sind und die Gefahr einer akuten Abstoßung in den letzten Jahrzehnten deutlich reduziert werden konnte, bleiben chronische Abstoßungsreaktionen, welche zumindest zum Teil HLA-Antikörper-bedingt sind, sowie unerwünschte Nebenwirkungen durch langfristige Einnahme von immunsuppressiven Medikamenten problematisch.

Neben neuen pharmakologischen Entwicklungen und neuen Formulierungen bekannter Wirkstoffe, welche z.B. durch Retardierung einen verminderten Spitzenspiegel bei vergleichbarer immunsuppressiver Wirksamkeit aufweisen und damit in ihrer Toxizität reduziert werden<sup>(21)</sup>, gibt es eine Reihe vollständig neuer Ansätze um mit minimiertem Einsatz an Immunsuppressiva Abstoßungen zu verhindern und im Idealfall gar vollständige immunologische Toleranz eines allogenen Transplantatorganes zu erreichen<sup>(22)</sup>. Der Begriff „operationale Toleranz“ bezeichnet hierbei einen Zustand, in dem immunkompetente

Transplantatempfänger keine Immunantwort gegen spenderspezifische Antigene zeigen<sup>(23,24)</sup> und somit keine medikamentöse Immunsuppression mehr benötigen. In der Ära der Zelltherapie wird in diesem Zusammenhang vor allem der therapeutische Einsatz von Stammzellen als vielversprechender Ansatz diskutiert.

### **1.3 Begriffserklärung: Stammzelle**

Embryonale Stammzellen (Synonym: pluripotente Stammzellen) sind undifferenzierte Zellen, die in der Lage sind zu praktisch jeder Gewebeart in allen 3 Keimblattarten (Entoderm, Mesoderm, Ektoderm) zu differenzieren. Adulte Stammzellen (Synonym: multipotente Stammzellen) hingegen sind bereits differenziert und können in einem Organismus nur innerhalb des bereits vorgegebenen Keimblattes weiter ausdifferenzieren. Beispiele hierfür sind hämatopoetische Stammzellen (HSC) und mesenchymale Stammzellen (MSC). Stammzell-Homöostase bezeichnet dabei das Gleichgewicht, in dem sich Stammzellen sowohl kontinuierlich, zum Zweck der Selbsterneuerung, in mit der Ausgangszelle identische Tochterzellen teilen, als auch in Progenitor-Zellen, welche zwar noch pluripotent sind, aber sich nicht mehr teilen<sup>(25,26)</sup>. Von den Progenitor-Zellen ausgehend erfolgt dann, sowohl im Rahmen der Embryogenese, als auch der Zellregeneration in adulten Organismen, die weitere Ausdifferenzierung zu funktionell heterogenen Zellpopulationen<sup>(27)</sup>. Lange war man der Meinung, dass multipotente Zellen innerhalb einer Keimblattlinie oder Gewebeart ausdifferenzieren. Heute weiß man, dass in vitro und in vivo mit bestimmten Verfahren selbst entdifferenzierte Zellen zu pluripotenten Stammzellen dedifferenziert werden können. Dies wird in der Literatur als „nuclear reprogramming“ bezeichnet<sup>(28,29)</sup>.

### **1.4 Hämatopoetische Stammzellen (HSC) in der Organtransplantation**

Hämatopoetische Stammzellen stellen den größten Teil der adulten Knochenmarksstammzellen dar. Sie werden seit über einem halben Jahrhundert erforscht und sind in der klinischen Anwendung insbesondere in der Therapie von malignen Bluterkrankungen etabliert. HSC sind schnell expandierende Zellen. Pluripotente (primitive) HSC exprimieren die Oberflächenantigene CD34, CD133, CD90(Thy-1), während sie auf der Zelloberfläche negativ für CD38 sind und sich das Oberflächenantigenprofil mit zunehmender Differenzierung der HSC verändert. Anhand dieser Charakterisierung lassen sie sich aus Knochenmarkspunktaten (BMSC) und peripherem Blut (PBSC) extrahieren<sup>(30,31)</sup>.

Auch in der Transplantationsmedizin finden HSC in kleinen, monozentrischen Studien eine Verwendung, wobei hier zusätzlich zum zu transplantierenden soliden Organ HSC des Spenders übertragen werden. Ziel dieser Knochenmarkstransplantation, die allogene zur HLA-Konfiguration des Empfängers und autogene zu der des Transplantorgans erfolgt, ist es das Immunsystem des Empfängers durch hämatopoetische Stammzellen des Spenders hin zu einer lympho-hämatopoetischen Chimäre zu verändern, in der gleichzeitig das hämatopoetische System des Spenders und des Empfängers aktiv sind. Hierzu ist es notwendig das Immunsystem des Empfängers vor einer Transplantation durch toxische Präkonditionierung oder Bestrahlung ganz oder teilweise zu depletieren. Kawai et al beschreiben dieses Prinzip mit einem nicht myeloablativen medikamentösen Regime unter Verwendung von Cyclophosphamid, CD2-Antikörpern, Cyclosporin A sowie Bestrahlung des Thymus vor einer kombinierten, nicht vollständig HLA-gematchten Nierentransplantation in Kombination mit der intravenösen Injektion von Knochenmark des Spenders<sup>(32)</sup>. In 7 von 10 Patienten konnte die Entstehung eines vorübergehenden Chimärismus gezeigt werden. In diesen Patienten gelang das Ausschleichen der perioperativ begonnenen immunsuppressiven Medikation. Allerdings traten im Langzeitverlauf bei 4 dieser Patienten Zeichen der chronischen Abstoßung auf<sup>(32,33)</sup>. Da die Knochenmarkstammzellen zur Induktion einer möglichen Toleranz vom Organspender stammen müssen und die Verabreichung des verwendeten Präkonditionierungsregimes 7 Tage vor der Transplantation begonnen werden muss, wird deutlich, dass sich diese Form der Toleranzinduktion, sofern sie sich klinisch durchsetzt, nicht für postmortale Spenden eignet.

### **1.5 Mesenchymale Stammzellen (MSC)**

Mesenchymale Stammzellen (MSC) repräsentieren eine unabhängige, mesodermale Stammzelllinie<sup>(34)</sup>. Sie lassen sich aus dem Knochenmark, in dem sie eine deutlich kleinere Nische besetzen als HSC, und aus peripherem Blut, aber auch aus anderen Geweben wie Fett, Lungen-, Muskel-, Plazentagewebe oder Zahnpulpa isolieren<sup>(35-39)</sup>. MSC sind mononukleäre Zellen. Sie lassen sich unter einfachen Bedingungen *in vitro* in Dulbecco Modified Eagle Medium (DMEM) unter Zugabe von 20% fetalem Kälberserum (FCS) kultivieren und expandieren. Im Gegensatz zu hämatopoetischen Vorläuferzellen wachsen sie plastikadhärent und zeigen unter dem Mikroskop eine typische Form mit fibroblastenähnlichen Ausläufern. Auf ihrer Oberfläche exprimieren mesenchymale Stammzellen unter anderem die Antigene CD29, CD44, CD73(SH3), CD105(SH2) sowie CD166<sup>(40-42)</sup>. Außerdem exprimieren sie

CD90, ein Oberflächenantigen, das auch von hämatopoetischen Stammzellen exprimiert wird, sind jedoch negativ für CD14, CD34 und CD45. MSC können durch Proliferation zu Stromazellen eine Nische für HSC schaffen und darüber hinaus deren Expansion mittels Zytokinen und Wachstumsfaktoren unterstützen<sup>(43)</sup>. Unter definierten Bedingungen differenzieren MSC in vitro unter anderem in Chondrozyten, Osteoblasten, Adipozyten, Nerven- und Muskelzellen<sup>(44,45)</sup>. Da derzeit kein spezifisches Oberflächenantigen für MSC bekannt ist und differenzierte Fibroblasten ein sehr ähnliches Oberflächenantigenprofil und eine ähnliche mikroskopische Morphologie besitzen, wird in vitro zusätzlich zum oben genannten Antigenprofil die Fähigkeit zur Differenzierung in Adipozyten, Chondrozyten und Osteoblasten zur sicheren Unterscheidung eingesetzt. Die International Society for Cellular Therapy definiert diese Eigenschaften - Plastikadhärenz, Oberflächenantigenprofil und Differenzierungsfähigkeit - als Minimal Kriterien für humane Mesenchymale Stammzellen<sup>(46,47)</sup>.

MSC besitzen neben den o.g. replikativen Eigenschaften, welche im Rahmen klinischer Studien unter anderem bereits in der Therapie von Knorpelschäden<sup>(48)</sup>, Myokardinfarkt<sup>(49,50)</sup> und Schlaganfall<sup>(51)</sup> eingesetzt werden, auch immunmodulatorische Eigenschaften. In der Transplantationsmedizin sind sie klinisch bereits nach Knochenmarkstransplantationen bei malignen Erkrankungen zur Therapie einer Graft-versus-host-disease (GVHD) im Einsatz, bei der aus den transplantierten HSC proliferierte myeloische und lymphatische Zellen eine T-Zell-Antwort gegen die allogenen Wirtszellen initiieren<sup>(52,53)</sup>. Während humane und murine MSC in vitro trotz MHC-I Expression wenig immunogen sind, ist die Situation in vivo umstritten<sup>(54-56)</sup>. In Kultur schütten sie neben anderen löslichen Faktoren die Interleukine (IL) 6 und 8, Prostaglandin E2 (PGE2) und vascular endothelial growth factor (VEGF) aus. Sowohl humanen als auch murinen MSC sind in in-vitro-Versuchen weitreichende immunmodulatorische Fähigkeiten zugeschrieben worden. So haben Aggarwal et al gezeigt, dass humane MSC dosisabhängig in Mixed Lymphocyte Reactions (MLRs) mit allogenen peripheren mononukleären Blutzellen (PBMC) die Ausschüttung des pro-inflammatorischen Interferon- $\gamma$  (IFN $\gamma$ ) durch aktivierte T-Helfer-1 (TH1)-Zellen und natürliche Killerzellen (NK-Zellen), sowie des ebenfalls pro-inflammatorischen Tumornekrose-Faktor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) durch dendritische Zellen (DC) deutlich reduzieren. TH2-Zellen und DC hingegen setzen signifikant mehr anti-inflammatorisches IL-4 und IL-10 frei<sup>(56)</sup>. Darüber hinaus wurde eine insgesamt signifikant verminderte Proliferation von pro-inflammatorischen TH1-Zellen und eine verstärkte Proliferation von immunsupprimierenden regulatorischen T-Zellen (T<sub>reg</sub>), sowie ein Shift von pro-inflammatorischen DC hin zu einem regulatorischen Phänotyp

beobachtet. In diesem Versuchsaufbau zeigte sich eine deutlich erhöhte Ausschüttung von IL6, IL8, PGE und VEGF. Darüber hinaus war die Immunmodulation nach Inhibierung von PGE2 umkehrbar. Auch Indoleamin-2,3-Dioxygenase (IDO), ein Enzym welches im Tryptophan-Stoffwechsel beteiligt ist und eine immunsupprimierende Wirkung hat, welche zum Beispiel die Abstoßung des Fetus in der Schwangerschaft verhindert, wird von MSC ausgeschüttet<sup>(57)</sup>. Zusätzlich zu löslichen Faktoren sind auch membranständige Moleküle bei der MSC-vermittelten Immunmodulation bekannt, allen voran programmed-death-ligand 1 (PD-L1) und HLA-G1<sup>(58)</sup>. Ob lösliche Faktoren oder Zell-Zell-Kontakte die maßgebliche Rolle bei der Orchestrierung des immunmodulatorischen Effekts der MSC spielen, ist weiterhin ungeklärt.

In-vitro-Versuche mit murinen Zellen zeigten ähnliche Ergebnisse. Auch hier ließen sich viele der o.g. Faktoren als maßgeblich am MSC-Effekt identifizieren<sup>(55,59-61)</sup>. In-vivo zeigen MSC in verschiedenen Tiermodellen, von der Maus bis zum Affen, ebenfalls eine immunmodulatorische Wirkung, indem sie Abstoßungsreaktionen von Haut- und Herztransplantaten signifikant verzögern<sup>(59,62)</sup>. Allerdings wird beim alleinigen Einsatz von MSC bestenfalls eine Verlängerung des Transplantatüberlebens von Tagen bis Wochen erreicht. Klinisch relevante Effekte scheinen nicht durch die Anwendung von MSC alleine, sondern in einer induktiven Kombination mit niedrig dosierten immunsuppressiven Medikamenten erreicht werden zu können. Dabei konnte hier insbesondere der Nachweis eines synergistischen Effektes von MSC und niedrig dosiertem MMF als Induktionstherapie erbracht werden. Es wurde gezeigt, dass ein kombiniertes Regime in einem murinen, allogenen Herztransplantationsmodell Langzeitakzeptanz bewirken kann und ferner die Infiltration des Transplantats durch antigenpräsentierende Zellen und T-Zellen unterbunden wird<sup>(22,63,64)</sup>. Anders als MMF zeigen Calcineurininhibitoren, Sirolimus und Steroide in Kombination mit humanen MSC in vitro keinen supprimierenden Effekt auf die T-Zell-Proliferation<sup>(65)</sup>. Ciclosporin A hat auch im murinen Modell keinen proliferationshemmenden Effekt<sup>(66)</sup>.

Um MSC in der Klinik einsetzen und das ideale Regime für klinische Studien definieren zu können, ist es essentiell, die in-vivo-Interaktion zwischen MSC und den zur Verfügung stehenden Immunsuppressiva zu verstehen. Die Entfaltung der immunsuppressiven Aktivität der MSC scheint dabei in hohem Maße abhängig von der Wahl des Co-Immunsuppressivums<sup>(55,67)</sup>.

Wie oben bereits ausgeführt greifen MSC auf verschiedenen Ebenen in die T-Zellantwort ein: Direkt, durch Zell-Zell-Kontakt und lösliche Faktoren (IDO, PGE<sub>2</sub>). Indirekt über die Induktion von immunsuppressiv wirkenden T<sub>reg</sub>, sowie Reduzierung der Antigenpräsentation durch dendritische Zellen und deren Reprogrammierung von einem pro-inflammatorischen hin zu einem regulatorischen Phänotyp. Alleine diese zusammenfassende Darstellung verdeutlicht, dass das Zusammenspiel zwischen MSC und PDMC in Kombination mit verschiedenen Immunsuppressiva eine Komplexität beinhaltet, die in-vitro vollumfänglich nicht zufriedenstellend betrachtet werden kann.

## 1.6 Etablierung des f1-Modells

Eine Mixed-Lymphocyte-Reaction (MLR) ist ein Versuchsaufbau, der prinzipiell außerhalb eines Organismus in einer Petrischale (in-vitro) stattfindet. MLRs sind einfache Systeme, bei denen in einem geeigneten Medium eine oder mehrere Zellpopulationen unter definierten Bedingungen einander ausgesetzt werden können. Dabei können im Versuchsaufbau zusätzlich Mediatoren wie Zytokine oder Mitogene ergänzt werden. Sie eignen sich besonders um einfache Thesen über direkte und indirekte Wechselwirkungen zwischen den einzelnen eingesetzten Bestandteilen zu überprüfen. Jedoch ist die Aussagekraft der Ergebnisse einer solchen MLR auf die Gegebenheiten in einem lebenden Organismus begrenzt, da hier viele weitere Einflussgrößen vorhanden sind, die zellbiologische Reaktionen beeinflussen können.

Um die zellbiologischen Abläufe, die bei einer akuten Abstoßung auftreten in-vivo untersuchen zu können, wird in diesem Modell zunächst eine f1-Generation durch Kreuzung von C3H-Mäusen (C3H) mit C57BL/6-Mäusen (BL6) gezüchtet. C3H-Mäuse zeichnen sich unter anderem durch den MHC-II Haplotyp H2<sup>kk</sup> aus, der Haplotyp der C57BL/6-Mäuse ist H2<sup>bb</sup>. Die f1-Generation (C3B6) aus einer Kreuzung der beiden erstgenannten trägt entsprechend den MHC-II Haplotyp H2<sup>kb</sup>.

Bei Injektion von BL6-Lymphozyten in C3B6-Mäuse werden diese Lymphozyten aufgrund des dem C3B6 bekannten H2<sup>b</sup>-Haplotyps nicht abgestoßen, initiieren jedoch in der Folge eine vollständige T-Zell Antwort gegen die Antigene des C3H-Elternteils im Sinne einer graft-versus-host Reaktion. Bei Aufarbeitung einer Einzelzellsuspension der lymphatischen Organe eines C3B6 Tieres können die injizierten Effektorzellen anschließend durch den H2<sup>bb</sup>-Haplotyp nach entsprechender Färbung durchflusszytometrisch identifiziert und analysiert werden.

Um eine Proliferationsanalyse der BL6-Effektorzellen zu ermöglichen stehen eine Reihe an fluoreszenten Markern zur Verfügung. Die variabelsten und gebräuchlichsten sind PKH26 und Carboxyfluorescein succinimidyl ester (CFSE). Da mit dem kostengünstigeren CFSE homogenere Färbungen zu erreichen sind, wird dies für die Proliferationsanalyse verwendet. CFSE ist ein Farbstoff, der ursprünglich zur Markierung von Zellen verwendet wurde. Er durchdringt die Zellmembran und bindet kovalent für mehrere Wochen an intrazelluläre Proteine. Dadurch eignet er sich auch als Proliferationsmarker, da er bei Teilung der markierten T-Zellen anteilig in den Tochterzellen verbleibt. Die Fluoreszenz einer CFSE-gefärbten T-Zelle kann, in immer schwächerer Ausprägung, bis zur achten Teilung durchflusszytometrisch detektiert, die T-Zellen mithin anhand der Stärke der Restfluoreszenz einer Proliferationsstufe zugeordnet werden<sup>(68)</sup>.

Dieses Model kann somit als „in-vivo-MLR“ verstanden werden, in dem sich die BL6-Lymphozyten als Effektorzellen in einem lebenden Organismus untersuchen lassen. Im Unterschied zu einer MLR in-vitro entspricht dies also einer graft-versus-host Reaktion in einem realen immunologischen Milieu.

## **1.7 Fragestellung und Zielsetzung**

Das für diese Arbeit etablierte Maus-Model soll folgende Fragen klären:

- 1 Ist das fl-Maus-Model geeignet um eine Proliferationsanalyse der Effektorzellen im Sinne einer „in-vivo-MLR“ durchführen zu können?
- 2 Lassen sich die Wirkung von MSC und der immunsuppressiven Wirkstoffe MMF, Ciclosporin A und Sirolimus auf die Effektorzellen durch diese Proliferationsanalyse erfassen?
- 3 Zeigen MSC in Kombination mit einem der Wirkstoffe einen verstärkten Effekt, der auf einen Synergismus in-vivo schließen lässt?

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Material

#### 2.1.1 Verbrauchsmaterial

Einmal-Injektions-Kanülen (20G, 26G, 27G)	Becton Dickinson USA
Einmalskalpell	Feather, Japan
Eppendorf Cups (0,5 ml, 1,5 ml, 2 ml)	Eppendorf, Hamburg
FACS-Röhrchen	Sarstedt, Nümbrecht
gentleMACS Tubes	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach
Kompressen	Hartmann, Heidenheim
Mikrotiterplatten (6-, 12-, 24-well, Flachboden)	Becton Dickinson, USA
Mikrotiterplatten (96-well, Rundboden)	Corning Inc., USA
Pipetten (2 ml, 10 ml, 25 ml, 50 ml)	Corning Inc., USA
Pipetten (5 ml)	Greiner, Frickenhausen
Pipettenspitzen	Sarstedt, Nümbrecht
Spritzen (2ml)	Sarstedt, Nümbrecht
Zellkulturflaschen (75 cm <sup>2</sup> , 175 cm <sup>2</sup> )	Corning Inc., USA
Zellsieb (40 µm, 100 µm)	Becton Dickson, USA
Zentrifugenröhrchen (15 ml, 50 ml)	Greiner, Frickenhausen

#### 2.1.2 Chemikalien

Äther	Sigma-Aldrich, USA
DMEM	Gibco, Invitrogen, Germany
CellCept® (Mycofenolat Mofetil/MMF)	Roche Pharma, Schweiz
CFSE	Invitrogen, USA
Ethanol	Merck, Darmstadt
Fetales Kalb Serum (FCS)	Biochrom AG, Berlin
Natriumchlorid 0,9%	Braun, Melsungen
PBS	Sigma-Aldrich, USA
Penicillin/Streptomycin	Invitrogen, USA

Propidiumiodid (PI)	Sigma-Aldrich, USA
Rapamune® (Sirolimus)	Pfizer, USA
ITS-Premix	Becton Dickinson, USA
Erylysepuffer	Eigenproduktion (UKR)
FACS-Puffer	Eigenproduktion (UKR)
Sandimmun® (Ciclosporin A)	Novartis Pharma, Schweiz
Trypsin-EDTA	Sigma-Aldrich, USA
Tryptanblau	Biochrom AG, Berlin
Ziegenserum	PromoCell, Heidelberg
Dexamethason	Sigma-Aldrich, USA
Ascorbinsäure	Sigma-Aldrich, USA
Natriumpyruvat	Invitrogen, USA
transforming growth factor $\beta$ 1 (TGF- $\beta$ 1)	R&D Systems, Wiesbaden
Insulin	Sanofi-Aventis, Frankreich
3-Isobutyl-1-Methylxanthin	Sigma-Aldrich, USA
$\beta$ -Glycerolphosphat	Sigma-Aldrich, USA

### 2.1.3 Antikörper

Antikörper-Spezifität	Spezies	Klon	Ig-Subklasse	Bezugsquelle
H2K <sup>k</sup> -PE	Maus	36-7-5	IgG2a, $\kappa$	Becton Dickinson, USA
CD4-APC	Ratte	RM4-5	IgG2a, $\kappa$	Becton Dickinson, USA
CD8-APC	Ratte	53-6.7	IgG2a, $\kappa$	Becton Dickinson, USA

### 2.1.4 Chirurgisches und sonstiges Material

Neubauer-Zählkammer	Sarstedt, Nümbrecht
Pinzette, anatomisch	Aeskulap, Tuttlingen
Pinzette, chirurgisch	Aeskulap, Tuttlingen
Präparierschere	Aeskulap, Tuttlingen
Restrainer (Apparatur zur Injektion)	Eigenbau

### 2.1.5 Geräte

Analysewaage (LC 210)	Labor Center, Nürnberg
-----------------------	------------------------

Brutschrank (Cytoperm)	Heraeus, Hanau
Durchflusszytometer (FACSCalibur)	Becton Dickinson, USA
Magnetrührer (RCT B)	IKA-Werke, Staufen
Lichtmikroskope:	Zeiss, Jena
Tischzentrifuge (5415D)	Eppendorf, Hamburg
Pipetten (2 µl, 10 µl, 100 µl, 200 µl, 1000 µl)	Eppendorf, Hamburg
Rüttler (Vortex-Genie 2)	Scientific Industries, USA
Sterilbank (Lamin-Air)	Heraeus, Hanau
Zentrifuge (Megafuge 1.0 R)	Heraeus, Hanau
Wasserbad (SW-20C)	Julabo, Seelbach
gentleMACS Dissociator	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach

### 2.1.6 Programme

Acrobat Reader 9.0	Adobe
FlowJo V 7.1.3 und X	Tresstar Inc. Ashland, USA
GraphPad Prism Version 5 und 7	Graph Pad Software Inc.
Microsoft Excel 2010 und Excel for MAC	Microsoft Corp.
Microsoft Word 2010 und Word for MAC	Microsoft Corp.
Zotero (www.zotero.org)	Center for History and New Media, George Mason University, Fairfax, USA

## 2.2 Labormethoden

### 2.2.1 Versuchstiere

Für die in-vivo Versuche und die MSC-Gewinnung wurden 6 Wochen alte Mäuse der Stämme C57BL/6NCrl (MHC-Haplotyp H2K<sup>b</sup>), C3H/HeJ (MHC-Haplotyp H2K<sup>k</sup>), B6C3F1/J (MHC-Haplotyp H2K<sup>kb</sup>), welche über Charles River Inc. Sulzfeld, Deutschland bezogen wurden, verwendet. Alle Tiere wurden unter Standardbedingungen im Tierhaus der Medizinischen Fakultät der Universität Regensburg gehalten und wogen zu Versuchsbeginn zwischen 20 und 30g. Alle Tierexperimente wurden in Übereinstimmung mit den Bestimmungen des Bezirks Oberpfalz und des UKR durchgeführt, eine entsprechende Tierversuchsgenehmigung durch die zuständige Regierung von Unterfranken liegt vor.

## **2.2.2 Gewinnung, Aufreinigung und Langzeitkultivierung von MSC**

Zur Gewinnung des Knochenmarks wurden sechs Wochen alte Mäuse (B6, B6C3) in tiefer Äthernarkose durch zervikale Dislokation getötet. Die Femur-, Tibia und Humerusknochen wurden entnommen und vorsichtig von umgebendem Weichteilgewebe gereinigt. Unter sterilen Kautelen wurden die Epiphysen abgetrennt und das Knochenmark durch Einbringen einer 20g Spritzenkanüle und Spülen mit einer 5ml Spritze herausgespült. Nach Resuspension wurde 75cm<sup>2</sup> Kulturflaschen mit der gewonnenen Knochenmarkslösung in Dulbecco modified Eagle medium (DMEM) mit einer Glukosekonzentration von 4500mg/l (im folgenden HG) und Glutamin, sowie zusätzlich 10% fetalem Kalbserum und 1% Penicillin/Streptomycin beimpft und bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> kultiviert. Nach 24, 48 und 72 Stunden wurden nicht adhärenente Zellen durch Wechsel des Mediums entfernt, anschließend erfolgte der Medienwechsel alle 3 Tage. Nach 2 Wochen wurden die adhärenente Zellen mit 0,5%igem Trypsin-EDTA gelöst und in 175cm<sup>2</sup> Kulturflaschen ausplattiert.

Aus dieser Kultur hervorgegangene Zellen wurden als Zellen der 1. Passage bezeichnet. Bei Ausbreitung des Monolayers über mehr als 80% der Fläche (Konfluenz) in der 1. Passage wurden die Zellen mit 0,5%igem Trypsin-EDTA über einen Zeitraum von 5 Minuten bei 37°C gelöst. Trypsin wurde durch Zugabe von FCS-haltigem Medium gestoppt, die Zellen im Verhältnis 1 : 3 in neue 175cm<sup>2</sup> ausplattiert. Das Medium wurde in der Folgezeit jeden 3. Tag gewechselt. Die Zellen wurden bis zur 25. Passage kultiviert, für Tierversuche wurden jedoch nur Zellen bis zur 10. Passage verwendet.

## **2.2.3 Differenzierung der MSC**

Die Fähigkeit zur Differenzierung und damit der Nachweis ihrer multipotenten Eigenschaften ist neben dem unter 1.5 genannten Oberflächenantigenprofil eine der, von der International Society of Cellular Therapy in ihren Richtlinien genannten Minimalkriterien, um die Definition für MSC zu erfüllen<sup>(46)</sup>. Um diese zu erfüllen führten wir eine in-vitro Differenzierung in Adipozyten, Chondrozyten und Osteoblasten durch<sup>(69)</sup>.

### **2.2.3.1 Differenzierung in Osteoblasten**

MSC wurden auf 6-well-Platten in einer Konzentration von 150.000 Zellen pro Well in DMEM-Medium ohne weitere Zusätze ausplattiert und für 24h inkubiert, um den Zellen

Adhärenz zu ermöglichen. Anschließend wurde nach Verwerfen des Überstandes osteogenes Medium (DMEM mit dem Zusatz von 0,1  $\mu$ M Dexamethason, 0,3mM Ascorbinsäure und 10 mM  $\beta$ -Glycerolphosphat) hinzugefügt. Die Zellen wurden so für zwei Wochen kultiviert, alle drei Tage wurde das Medium gewechselt. Abschließend erfolgte der Nachweis der osteogenen Differenzierung mittels von-Kossa-Färbung.

### **2.2.3.2 Differenzierung in Chondrozyten**

Zur chondrogenen Differenzierung wurde DMEM-HG mit dem Zusatz von 0,1  $\mu$ M Dexamethason, 0,2  $\mu$ M Ascorbinsäure, 0,2  $\mu$ M Natriumpyruvat, 10ng/ml transforming growth factor  $\beta$ 1 und 1% eines kommerziellen ITS(Insulin, Transferrin, Selen)-Premix als Differenzierungsmedium versetzt. Anschließend wurden 200.000 MSC in ein 15ml Plastikröhrchen gegeben, nach einem Waschschrift mit dem Differenzierungsmedium inkubiert, bei 1200 rpm und 4°C für 5 Minuten zentrifugiert und das so entstandenen Zellpellet anschließend für 16 Tage inkubiert. Nach 16 Tagen wurde das Pellet in Paraffin eingebettet. Um intrazelluläre Glucosaminoglykane nachzuweisen erfolgte eine Alcian-Blue-Färbung.

### **2.2.3.3 Differenzierung in Adipozyten**

MSC wurden in 12-Well-Platten in Kulturmedium (s. 2.2.1) ausgesät und bis zur Konfluenz belassen. Das Differenzierungsmedium bestand aus DMEM-HG mit Zusatz 1% Penicillin/Streptomycin, 15 U/ml Insulin, 1  $\mu$ M Dexamethason, 5% Ziegenserum und 0,1 mg/ml 3-Isobutyl-1-Methylxanthin. Die MSC wurden nach einem Waschschrift für drei Tage in dem Differenzierungsmedium kultiviert und nach Verwerfen der Überstände zur Zellreifung erneut in DMEM-HG mit Zusatz von 1% Penicillin/Streptomycin und 15 U/ml Insulin für zwei Tage belassen. Es erfolgte eine Red-Oil-O-Färbung zum Nachweis der Adipozyten.

### **2.2.4 Effektorzellen: Einzelzellsuspension & CFSE-Färbung**

B6 Mäuse wurden in tiefer Äthernarkose durch zervikale Dislokation getötet. Nach Entnahme wurden die Milzen mit einem Skalpell zerkleinert und anschließend mit dem gentleMACS zu einer Einzelzellsuspension verarbeitet und durch ein 100  $\mu$ m Sieb gegeben. Erythrozyten

wurden mit einer Erylyse-Pufferlösung, bestehend aus 8,34g/l NH<sub>4</sub>Cl, 0,37g/l EDTA und 1g NaHCO<sub>3</sub> in einem Liter zweifach destilliertem Wasser, lysiert und die verbleibenden B6-Splenozyten zweimal mit PBS gewaschen und erneut durch ein 40µm-Sieb gegeben.

Die somit in einer Einzelzellsuspension vorliegenden Zellen wurden mit 0,25 µl Carboxyfluorescein Diacetat Succinimidyl Ester (CFSE) und 50 µl PBS pro 10<sup>6</sup> Zellen für 5 Minuten bei 37°C inkubiert. Die Färbung wurde mit der Zugabe von FCS (Endkonzentration 10%) gestoppt und die Zellen wurden zweimal mit FCS-haltigem Puffer und zweimal mit PBS gewaschen. Die Zellen wurden bis zur Injektion auf Eis gelegt.

## **2.2.5 Zellaufbereitung & Durchflusszytometrie**

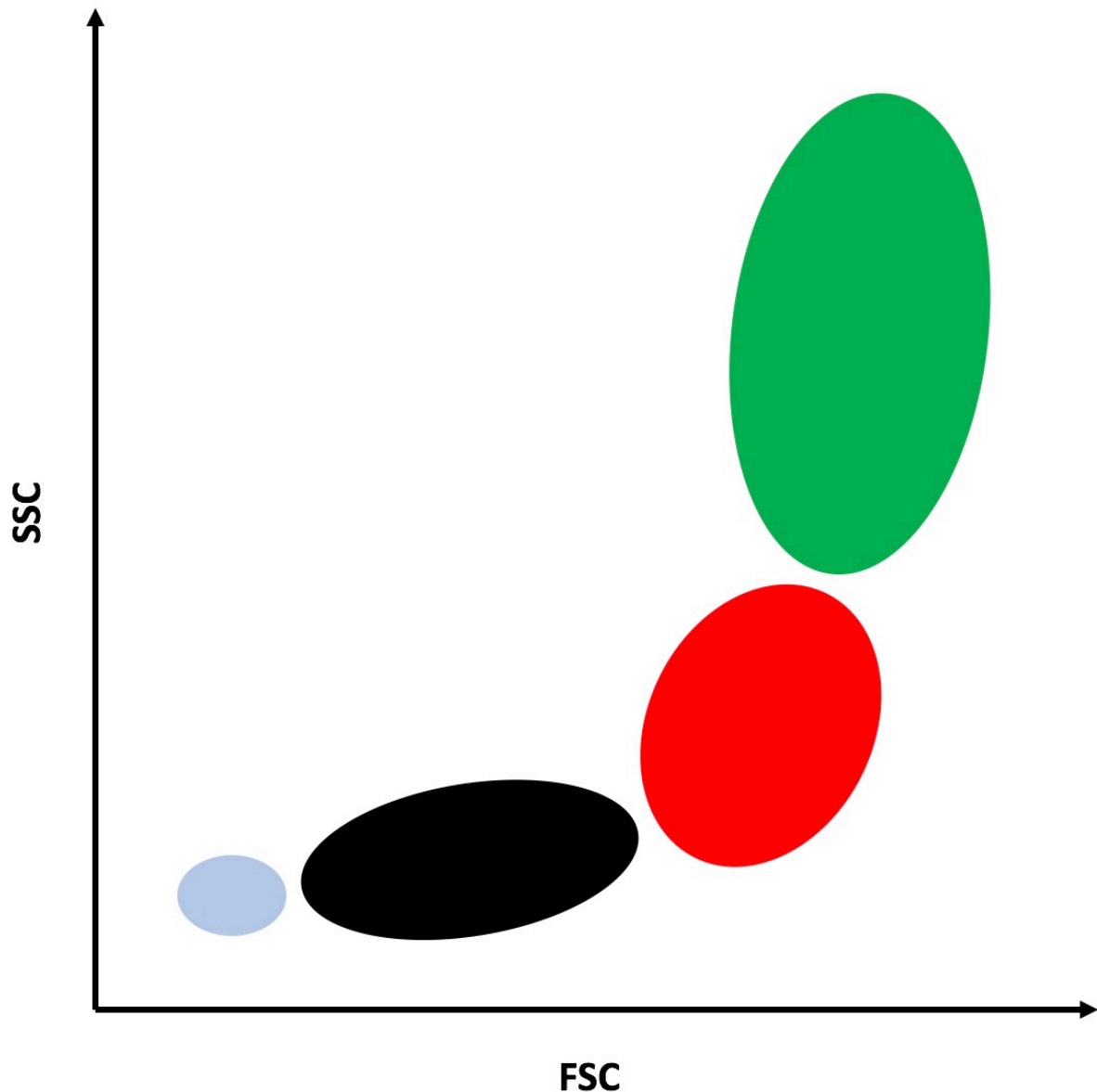
### **2.2.5.1 Funktionsprinzip der Durchflusszytometrie**

Die Durchflusszytometrie ist eine apparative Methode zur Analyse und Differenzierung von Einzelzellen anhand ihrer Größe und Granularität, sowie ihrer Oberflächenantigene unter Zuhilfenahme von fluoreszenten Antikörpern. In einem Durchflusszytometer fließen einzelne Zellen in Suspension durch eine sehr feine Küvette, wobei sie in einem definierten Winkel mit Laserlicht angestrahlt werden. Lichtbrechung und Emissionen dieser Zelle werden dann durch verschiedene Messdioden erfasst.

Die Größe einer Zelle korreliert dabei mit dem Vorwärtsstreulicht, also der Beugung des eintreffenden Laserlichts im flachen Winkel (Forward Scatter, FSC). Die Granularität einer Zelle wird durch das Seitwärtsstreulicht (Side Scatter, SSC) quantifiziert. Sie ist ein Maß für die Brechung des Lichtes im rechten Winkel zum Laserlicht und wird zum Beispiel durch die Größe des Zellkerns und die Anzahl der intraplasmatisch vorhandenen Vesikel oder Lysosomen beeinflusst.

Zur Markierung von Oberflächenantigenen werden monoklonale, fluoreszente Antikörper eingesetzt, welche bei Anregung durch den Laser Licht in einer bestimmten Wellenlänge emittieren. In einem speziellen Verfahren können nach Fixierung und Permeabilisierung der Zellen auch intrazelluläre Antigene gefärbt werden. Durch die Kombination mehrerer Laser und den Einsatz von Filtern lässt sich so in einer einzigen Messung eine qualitative Aussage über verschiedene markierte extra- und intrazelluläre Antigene treffen. Die gemessene Leuchtstärke einer spezifischen Wellenlänge korreliert dabei mit der Anzahl der auf der Zelloberfläche gebundenen Antikörpern mit der entsprechenden Emission. Die Ergebnisse

dieser Messungen können auf verschiedene Arten dargestellt werden, zur Analyse wird üblicherweise der sogenannte Dotplot verwendet, ein Graf bei dem für jede gemessene Zelle auf X- und Y-Achse jeweils die Emissionsstärken verschiedener Fluoreszenzen oder Vorwärts- und Seitwärtsstreuung dargestellt werden.



*Abbildung 1 Sinnbildliche Darstellung eines Dotplots nach Analyse von Splenozyten. Typische Anordnung von Debris (blau), Lymphozyten (schwarz), Monozyten & Makrophagen (rot) und Granulozyten (grün).*

### **2.2.5.2 Zellaufbereitung**

Die Versuche wurden in Vorversuchen nach 24; 48; 72; 96 und 120 Stunden beendet, in den Hauptversuchen wurden die Versuche nach 48 Stunden beendet. Die F1-Mäuse wurden hierfür in tiefer Äthernarkose durch zervikale Dislokation getötet. Nach Entnahme der Milz

wurde wie unter 2.2.3 beschrieben eine Einzelzellsuspension hergestellt, die Zellen anschließend in einer Neubauer-Kammer gezählt.

### **2.2.5.3 Durchführung der Durchflusszytometrie**

Die suspendierten Zellen wurden in einer Konzentration von  $5 \times 10^6$  Zellen pro ml PBS resuspendiert und mit sättigenden Mengen von Phycoerythrin(PE)- und Allophycocyanin(APC)-konjugierten Antikörpern gegen CD4, CD8 und H2kk versetzt und für 20 Minuten im Dunkeln bei Raumtemperatur inkubiert. Nach Zentrifugation mit 1500 rpm bei 4°C für 5 Minuten wurden sie in FACS-Puffer (PBS mit der Zugabe von 0,5% bovines Serum-Albumin und 0,1% Natriumazid) resuspendiert. Für den Nachweis lebender Zellen wurde Propidiumiodid (PI) unmittelbar vor der Analyse hinzugefügt. Die Analyse wurde anschließend an einem FACS-Calibur Durchflusszytometer durchgeführt.

### **2.2.5.4 Auswertung der durchflusszytometrischen Daten**

Die erhaltenen Daten wurden mit der PC-Software FlowJo V7.1.3 ausgewertet (kommerzielle Einzelplatzlizenz). Im ersten Schritt wurde durch Anzeigen der PI-Fluoreszenzstärke auf der X-Achse des Dotplots tote Zellen identifiziert und in einem sogenannten *gate* aus der weiteren Analyse ausgeschlossen. Dann wurden FSC und SSC gegeneinander aufgetragen und in einem weiteren *gate* Lymphozyten isoliert, anschließend wurden die H2K<sup>k</sup> negativen Zellen *gated* und separate *gates* für CD4<sup>+</sup> oder CD8<sup>+</sup> definiert (s. Abbildung 8). Die nun im letzten *gate* vorhandene Effektorzellpopulation wurde Anhand ihrer CFSE-Emission einer Proliferationsanalyse zugeführt (s. Abbildung 11).

Die Statistiken wurden mit GraphPad Prism Software durchgeführt. Die Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung vom Mittelwert an (SEM). Wenn T-Tests angewendet wurden um Mittelwerte zu vergleichen, war die Probenanzahl größer als 3 verschiedene Tiere.

### **2.2.6 Proliferationsanalyse**

Die Proliferationsanalyse wurde mit der PC-Software FlowJo V7.1.3 durchgeführt, in welcher zu diesem Zweck eine *proliferation platform* verankert ist. Hierfür wird in einem Histogramm die CFSE-Emission auf der X-Achse dargestellt und die Anzahl der in vorhandenen Proliferationspeaks definiert. Die Software errechnet daraus verschieden Größen (s. Abbildung 11 und Tabelle 6).

### **2.2.6.1 Division Index**

Der *Division Index* gibt die durchschnittliche Anzahl der Zellteilungen an, die eine Zelle aus der Effektorzellpopulation durchgemacht hat. Damit wird die Kinetik der Gesamtpopulation, also auch der nicht proliferierenden Zellen beschrieben. In den Division Index fließt somit nicht nur das Proliferationsverhalten der Zellen, sondern auch die T-Zell-Aktivierung ein.

### **2.2.6.2 Proliferation Index**

Der *Proliferation Index* gibt die durchschnittliche Anzahl der Zellteilungen an, die ausschließlich die Zellen, die sich geteilt haben durchgemacht haben. Er ermöglicht somit eine Aussage über die Kinetik ausschließlich der proliferierenden, also bereits aktivierten Zellen.

### **2.2.6.3 Percent divided (% divided)**

Die *percentage divided* gibt an, wie viele Prozent der Zellen aus der Effektorzellpopulation sich in Teilung begeben haben.

## **2.2.7 Applikation der Immunsuppressiva**

Die Applikation der medikamentösen Immunsuppressiva erfolgte gewichtsadaptiert und in entsprechender Lösung durch intraperitoneale Punktion mit einer 27G-Kanüle.

### **2.2.7.1 Mycophenolat Mofetil (MMF)**

Das Prodrug Mycophenolat-Mofetil bezeichnet den 2-Morpholinester der Mycophenolsäure, in welche er im Körper nach Verabreichung umgewandelt wird. Mycophenolsäure ist ein reversibler, selektiver, nicht-kompetitiver Hemmer der Inosinmonophosphat-Dehydrogenase (IMPDH). Sie greift somit in die Synthese Guanin-haltiger Nukleotide ein, deren De-novo-Synthese für die Proliferation von Lymphozyten essenziell ist.

MMF (CellCept®, Roche Pharma) wurde für Die Versuche mit einer Verdünnungsreihe gelöst in 5%iger Glukoseinjektionslösung in einer Konzentration von 320mg/ml. Es unterliegt einem enterohepatischen Kreislauf mit einem zweiten Plasmaspiegel-Peak, was die Messung der Halbwertszeit erschwert. Die Gesamttagesdosis wurde wie in der klinischen Praxis auf zwei Tagesdosen aufgeteilt<sup>(20,70,71)</sup>.

### 2.2.7.2 Ciclosporin A

Ciclosporin ist ein aus den Schlauchpilzen *Tolypocladium inflatum* und *Cylindrocarpon lucidum* isoliertes zyklisches Peptid. Es bindet intrazellulär und hemmt reversibel und selektiv die Phosphatase Calcineurin, was über die verminderte Dephosphorylierung von *nuclear factor activating T-Cell (NF-AT)* letztlich zur Blockierung der Transkription von Genen zahlreicher Zytokine und Zelloberflächenrezeptoren führt. Im Menschen beträgt die Halbwertszeit etwa 6 Stunden.

Ciclosporin A (Sandimmun®, Novartis Pharma) wurde für die Versuche in 0,9%igem Natriumchlorid verdünnt, die Gesamttagesdosis wurde wie in der klinischen Praxis auf zwei Tagesdosen aufgeteilt<sup>(72,73)</sup>.

### 2.2.7.3 Sirolimus

Sirolimus (Rapamune®, Pfizer) ist ein aus dem Bakterium *Streptomyces hygroscopicus* isoliertes seit 2001 europaweit zugelassenes Makrolid mit immunsupprimierender Wirkung. Der genaue Wirkmechanismus von Sirolimus ist nicht bekannt. Es wird vermutet, dass durch Komplexbildung und Inhibierung des intrazellulären Proteins *mammalian Target of Rapamycin (mTOR)* sowohl die Aktivierung, als auch der Übergang von T-Zellen von der G1- in die S-Phase des Zellzyklus unterbunden und dadurch die T-Zell-Proliferation gehemmt wird.

Die lipophile Lösung wurde zur Applikation in handelsüblichem Olivenöl verdünnt. Aufgrund der langen Halbwertszeit von 62 Stunden erfolgte eine einmal tägliche Gabe<sup>(74,75)</sup>.

### 2.2.8 Tiermodell

Für die Untersuchung eines synergistischen Effektes von MSC und verschiedenen medikamentösen Immunsuppressiva in-vivo wurde ein f1-Modell gewählt. In diesem Modell ist entscheidend, dass die injizierten BL6-Splenozyten mit dem MHC-Haplotyp H2K<sup>b</sup> die tatsächlichen Effektorzellen darstellen, die die Immunantwort ausführen, selbst jedoch in der f1 Maus mit dem MHC-Haplotyp H2K<sup>kb</sup> aufgrund ihres bekannten MHC-Haplotyps nicht immunogen sind. Somit läuft in der f1-Maus eine einseitige graft-versus-host Reaktion im Sinne einer akuten Abstoßungsreaktion gegen Zellen mit dem maternalen H2K<sup>k</sup>-Haplotyp ab. Die Effektorzellen können nach einer Inkubationszeit zu einem großen Teil aus dem f1-Tier

isoliert werden und können durch ihren H2K<sup>b</sup>-Haplotyp durchflusszytometrisch identifiziert und weiter analysiert werden.

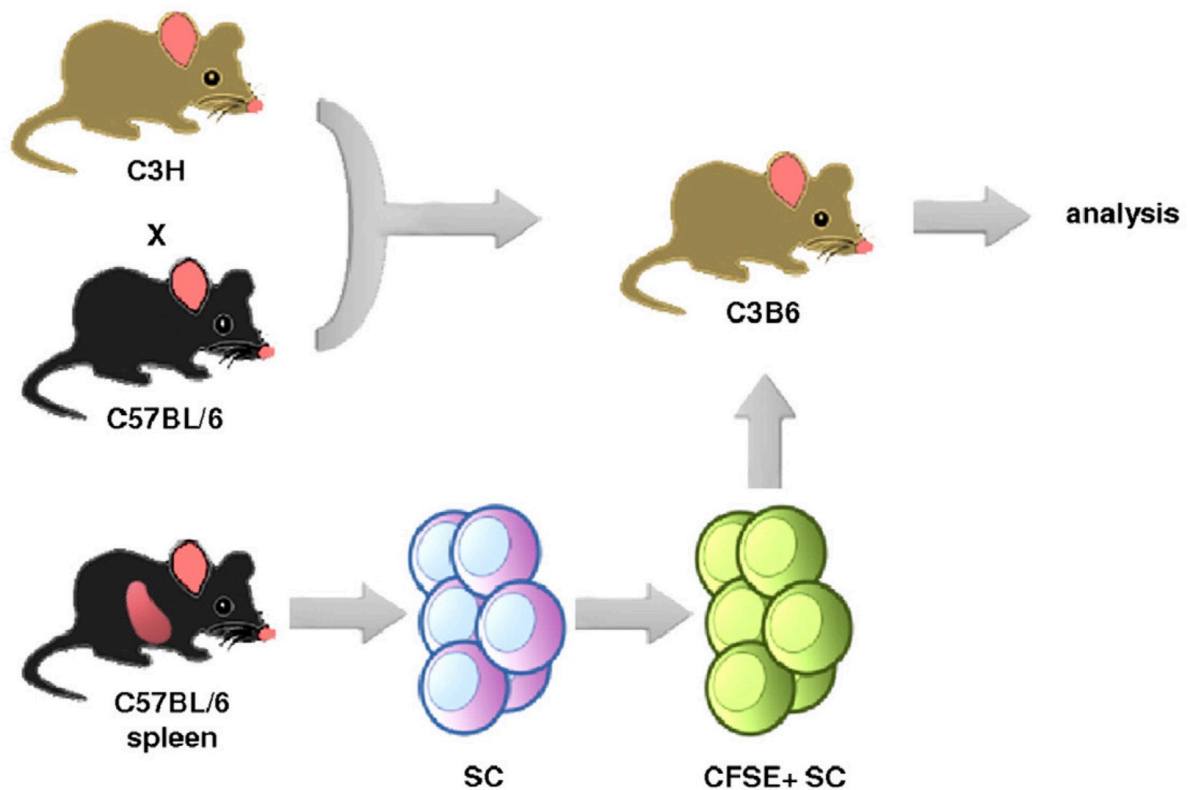


Abbildung 2 Schematische Darstellung des Versuchsaufbaus im F1-Modell (Eggenhofer et al.<sup>(76)</sup>)

## 2.2.9 Versuchs- & Gruppendesign

### 2.2.9.1 Etablierung des F1-Modells

Um die ideale Dauer der „Inkubation“ der Effektorzellen in der C3B6 Maus zu ermitteln, nach welcher eine aussagekräftige und vergleichbare Proliferationskurve der Effektorzellen vorliegt und anhand derer später ein Effekt festzustellen ist, wurden nach CFSE-Labeling  $10 \times 10^6$  Zellen in verschiedene Tiere injiziert. Die Auswertung erfolgte im 24-Stunden Abstand. Die durchflusszytometrische Analyse von Einzelzellsuspensionen der Milz mit fluoreszenten Antikörpern gegen CD4, CD8 und H2K<sup>k</sup> unter Zugabe von PI erfolgte nach 24; 48; 72 und 96 Stunden.

Anschließend wurde die Mindestmenge an zu injizierenden Effektorzellen ermittelt, die notwendig ist um in der Analyse eine für eine Proliferationsanalyse ausreichende Fraktion an Effektorzellen in der C3B6-Milz zu erhalten. Hierzu wurden nach CFSE-Labeling  $5 \times 10^6$ ,  $20 \times 10^6$  und  $50 \times 10^6$  Zellen in verschiedene Tiere injiziert. Nach 36 Stunden erfolgte die

Auswertung nach Färbung von Einzelzellsuspensionen der Milz mit fluoreszenten Antikörpern gegen CD4, CD8 und H2K<sup>k</sup> unter Zugabe von PI

### 2.2.9.2 Untersuchung des Effektes von MSC

An Tag -1 wurden MSC mittels 0,5%igem Trypsin-EDTA geerntet und mittels Trypanblaufärbung lichtmikroskopisch in einer Neubauer Zählkammer ausgezählt. Nach zweimaligem Waschen wurden die Zellen in einer Konzentration von  $1 \times 10^6$  Zellen/ml resuspendiert und bis zur Injektion auf Eis gelegt. Die Mäuse wurden zur Exposition der Injektionsstelle in einen Restraîner eingebracht, nach Desinfektion erfolgte die Injektion von 500.000 MSC in 0,5ml PBS über einen Zeitraum von 2 Minuten mit einer 27g-Kanüle in die Schwanzvene der C3B6-Mäuse. Um die Bildung eines Paravasats mit hohem MSC-Gehalt zu verhindern wurde die Kanüle nach erfolgter Injektion 10 Sekunden in der Punktionsstelle belassen. Negativkontrollen wurden 0,5ml PBS ohne die Zugabe von MSC verabreicht

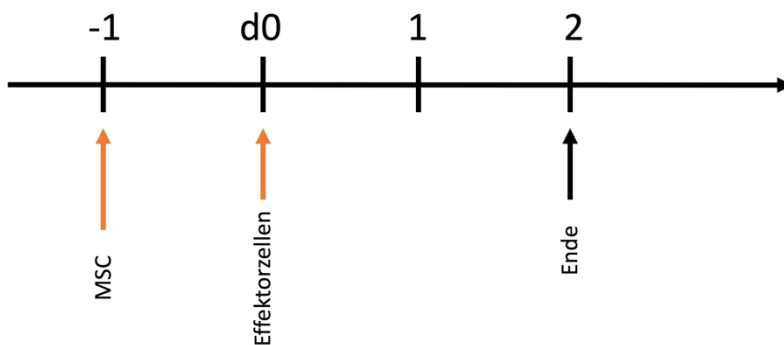


Abbildung 3 Verabreichungsschema MSC-Monotherapie

An Tag 0 wurden Effektorzellen wie unter 2.2.3 beschrieben CFSE-markiert und anschließend im Restraîner nach Desinfektion in 0,3ml PBS mit einer 27g-Kanüle in die Schwanzvene injiziert. Auch hier wurde anschließend die Kanüle 10 Sekunden in der Punktionsstelle belassen um Paravasatbildung zu verhindern. Das Versuchsende wurde auf 48 Stunden nach Injektion der Effektorzellen festgelegt.

Gruppe	Tieranzahl	Injektion
Kontrollgruppe	n=8	0,5ml PBS
B16-MSC	n=7	0,5 x 10 <sup>6</sup> C3H-MSC in 0,5ml PBS
F1-MSC	n=4	0,5 x 10 <sup>6</sup> F1-MSC in 0,5ml PBS

Tabelle 1: Gruppeneinteilung MSC-Monotherapie

Eine Zusammenstellung der Versuchsgruppen mit Tieranzahl und verwendeter Zellart ist in Tabelle 1 zu ersehen.

### 2.2.9.3 Dosisfindung und Wirkung von MMF

Zur Findung einer Dosis, in der Mycofenolat Mofetil proliferationshemmenden wirkt und gleichzeitig potentielle synergistische Effekte noch beurteilbar sind wurde eine Verdünnungsreihe der Stock-Solution durchgeführt, wodurch Aliquote mit 160/120/80/40mg/ml Glukoselösung entstanden. Diese konnten bei zweimal täglicher Verabreichung mit einer Tagesdosis von 320/240/160/80 mg/kg Körpergewicht unkompliziert gewichtsadaptiert intraperitoneal unmittelbar nach Injektion der Effektorzellen sowie nach weiteren 12, 24 und 36h verabreicht werden. Die Versuche wurden 48 Stunden nach Injektion der Effektorzellen beendet.

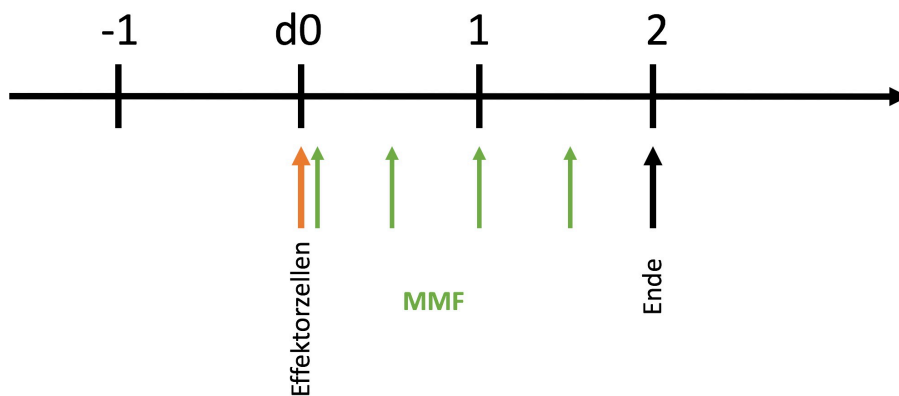


Abbildung 4 Verabreichungsschema MMF-Monotherapie

Eine Zusammenstellung der Versuchsgruppen mit Tieranzahl und verwendeter MMF-Dosierung ist in Tabelle 2 zu ersehen.

Tieranzahl	MMF-Einzeldosis
n=4	40mg/kg Körpergewicht 1-0-1
n=4	80mg/kg Körpergewicht 1-0-1
n=4	120mg/kg Körpergewicht 1-0-1
n=4	160mg/kg Körpergewicht 1-0-1

Tabelle 2 Gruppeneinteilung MMF-Titration

### 2.2.9.4 Dosisfindung und Wirkung von Ciclosporin A

Zur Dosisfindung von Ciclosporin A wurde dieses gelöst in 0,9%iger Kochsalzlösung mit einer Konzentration von 15/10/5mg/ml zweimal täglich mit einer Tagesdosis von 30/20/10 mg/kg Körpergewicht analog zum unter 2.2.9.3 genannten Schema intraperitoneal injiziert.

Eine Zusammenstellung der Versuchsgruppen mit Tieranzahl und verwendeter Ciclosporin-Dosierung ist in Tabelle 3 zu sehen.

Tieranzahl	Ciclosporin A-Einzeldosis
n=4	5mg/kg Körpergewicht 1-0-1
n=4	10mg/kg Körpergewicht 1-0-1
n=4	15mg/kg Körpergewicht 1-0-1

Tabelle 3 Gruppeneinteilung Ciclosporin A-Titration

### 2.2.9.5 Dosisfindung und Wirkung von Sirolimus

Zur Dosisfindung von Sirolimus wurde dies in einer Konzentration von 10mg/ml in handelsüblichem Olivenöl gelöst. Vor Verwendung wurde die Stock-Solution auf Konzentrationen von 0,5/0,1/0,01mg/ml in 0,9%iger Kochsalzlösung emulgiert und unmittelbar verwendet. Die Verabreichung von Sirolimus erfolgte einmal täglich in Gesamttagesdosen von 0,5/0,1/0,01mg/kg Körpergewicht intraperitoneal, wobei die Injektionslösung unmittelbar vor jeder Injektion erneut resuspendiert wurde. Die Versuche wurden 48 Stunden nach Injektion der Effektorzellen beendet.

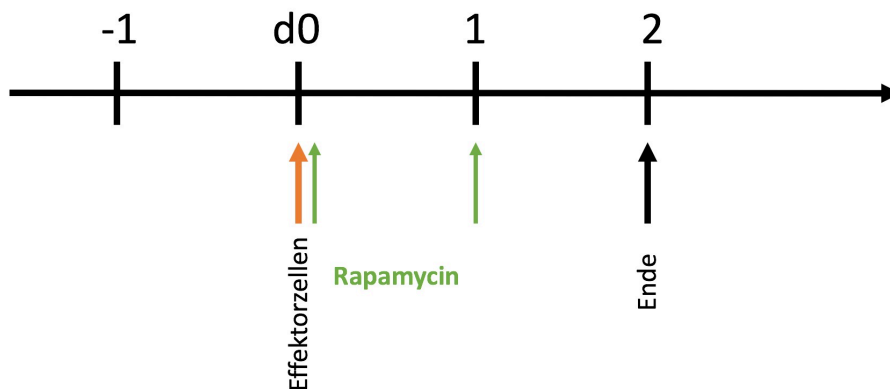


Abbildung 5 Verabreichungsschema Sirolimus-Monotherapie

Eine Zusammenstellung der Versuchsgruppen mit Tieranzahl und verwendeter Sirolimus-Dosierung ist in Tabelle 4 zu sehen.

Tieranzahl	Sirolimus-Einzeldosis
n=4	0,01mg/kg Körpergewicht 1-0-0
n=4	0,1mg/kg Körpergewicht 1-0-0
n=4	0,5mg/kg Körpergewicht 1-0-0

Tabelle 4 Gruppeneinteilung Sirolimus-Titration

### 2.2.9.6 Untersuchung eines synergistischen Effektes von MSC und MMF

Um einen möglichen synergistischen Effekt von mesenchymalen Stammzellen und Mycophenolat Mofetil auf die Proliferation der Effektorzellen zu sehen wurden zunächst an Tag -1 wie unter 2.2.9.2 beschrieben B16-MSC injiziert und ab Tag 0 nach Injektion der Effektorzellen wie unter 2.2.9.3 beschrieben MMF in einer Einzeldosis von 80mg alle 12 Stunden. Der Versuch wurde nach 48 Stunden beendet.

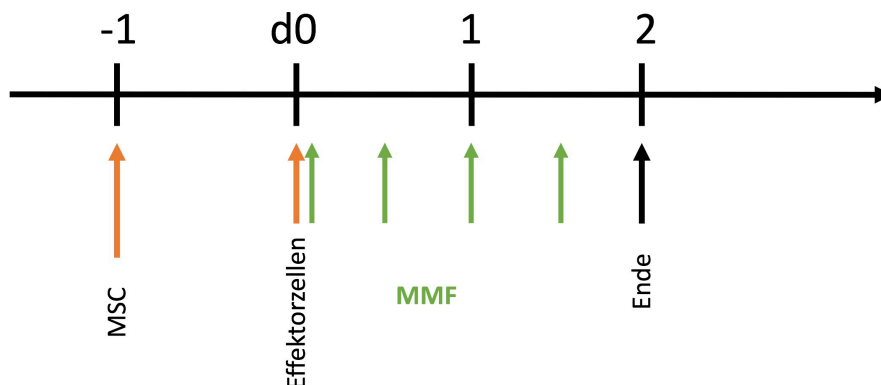


Abbildung 6 Verabreichungsschema MSC-/MMF-Kombinationstherapie

Eine Zusammenstellung der Versuchsgruppen mit Tieranzahl ist in Tabelle 5 zu sehen.

### 2.2.9.7 Untersuchung eines synergistischen Effektes von MSC und Ciclosporin A

Um einen möglichen synergistischen Effekt von mesenchymalen Stammzellen und Ciclosporin A auf die Proliferation der Effektorzellen zu sehen wurden zunächst an Tag -1 wie unter 2.2.9.2 beschrieben B16-MSC injiziert und ab Tag 0 nach Injektion der Effektorzellen wie unter 2.2.9.4 beschrieben Ciclosporin A in einer Einzeldosis von 5mg alle 12 Stunden. Der Versuch wurde nach 48 Stunden beendet.

Eine Zusammenstellung der Versuchsgruppen mit Tieranzahl ist in Tabelle 5 zu sehen.

### 2.2.9.8 Untersuchung eines synergistischen Effektes von MSC und Sirolimus

Um einen möglichen synergistischen Effekt von mesenchymalen Stammzellen und Sirolimus auf die Proliferation der Effektorzellen zu sehen wurden zunächst an Tag -1 wie unter 2.2.9.2 beschrieben B16-MSC injiziert und ab Tag 0 nach Injektion der Effektorzellen wie unter 2.2.9.5 beschrieben Sirolimus in einer Einzeldosis von 0,5mg alle 24 Stunden. Der Versuch wurde nach 48 Stunden beendet.

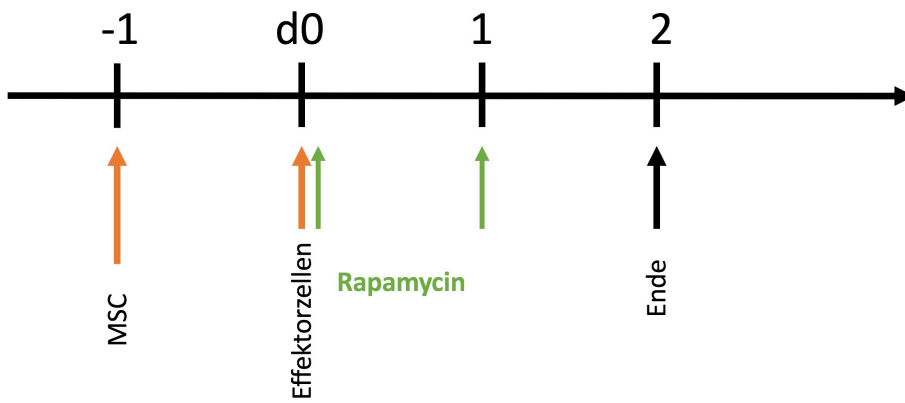


Abbildung 7 Verabreichungsschema MSC-/Sirolimus-Kombinationstherapie

Eine Zusammenstellung der Versuchsgruppen mit Tieranzahl ist in Tabelle 5 zu ersehen.

Tieranzahl	MSC	Wirkstoff
n=7	0,5 x 10 <sup>6</sup> B16-MSC in 0,5ml PBS	MMF
n=7	0,5 x 10 <sup>6</sup> B16-MSC in 0,5ml PBS	Ciclosporin A
n=7	0,5 x 10 <sup>6</sup> B16-MSC in 0,5ml PBS	Sirolimus

Tabelle 5 Gruppeneinteilung Kombination

### 3 Ergebnisse

#### 3.1 Etablierung des f1-Modells

Zu Beginn wird getestet ob die Effektorzellen in den f1-Mäusen durchflusszytometrisch wieder auffindbar sind und die am besten geeignete Versuchsdauer ermittelt, zu deren Ende die Effektorzellen einen gut detektierbaren Proliferationsfortschritt durchgemacht haben sollten. Die Proliferation sollte zu diesem Zweck nicht vollständig abgelaufen sein, um bei späterer Zugabe der Immunsuppressiva auch einzelne Proliferationsstufen miteinander vergleichen zu können. Hierzu werden 4 f1-Tieren  $1 \times 10^6$  CFSE-gelabelte Effektorzellen injiziert und Milz und inguinale sowie abdominelle Lymphknoten je eines Tieres alle 24 Stunden einer durchflusszytometrischen Auswertung unterzogen.

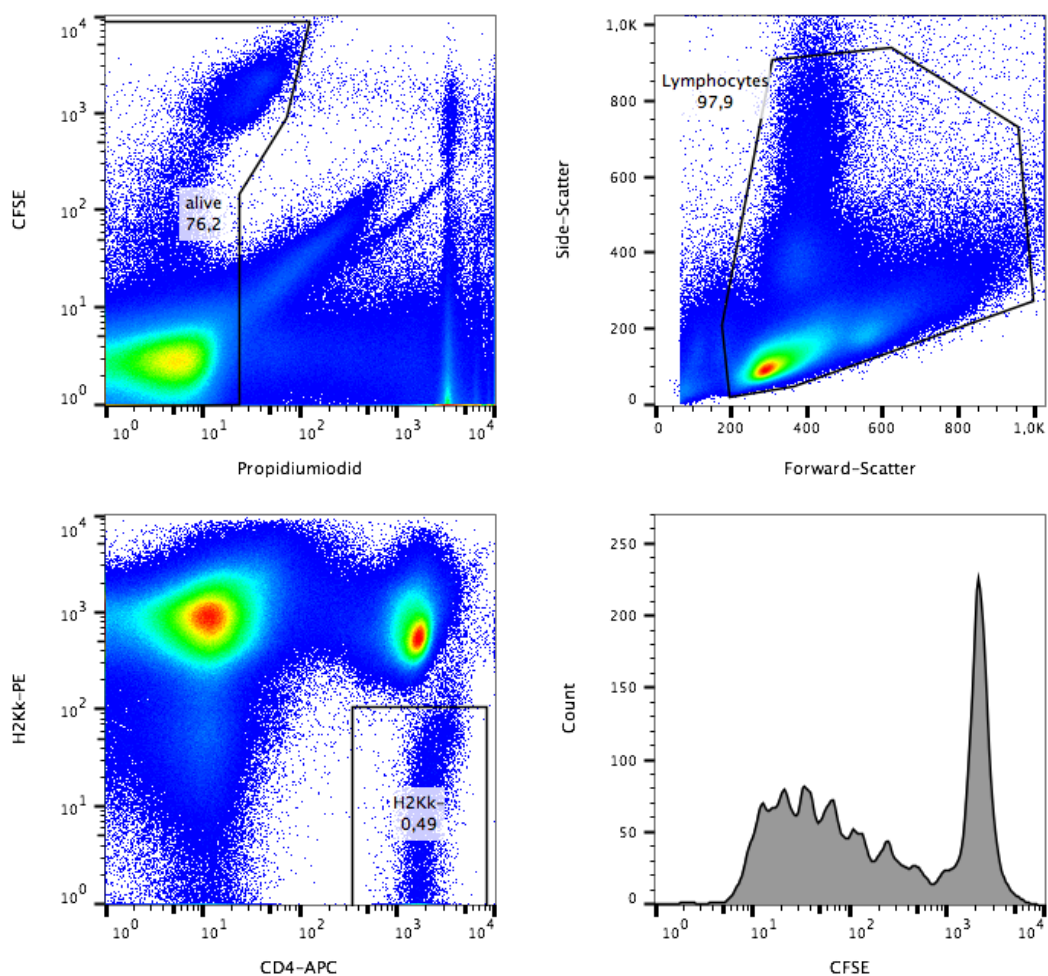


Abbildung 8 Gatingstrategie bei der Auswertung der durchflusszytometrischen Daten

Die Gatingstrategie wurde hierzu wie in Abbildung 8 ersichtlich festgelegt. Zunächst erfolgt das *gating* der Propidiumiodid-negativen Zellen. Anschließend werden im FSC-SSC-Plot Lymphozyten *gated* und im nächsten Schritt nach Auftragen von H2K<sup>k</sup>-PE und den CD4-APC in einem Plot die Effektorzellen in der H2K<sup>k</sup>-negativen/CD4-positiven-Fraktion isoliert. Die Proliferation der somit isolierten CFSE-gefärbten Effektorzellen kann dann in einem Histogramm veranschaulicht werden. Bei diesem Histogramm handelt es sich um ein CFSE-Verdünnungsprofil, in dem die am stärksten CFSE-positiven, nicht proliferierten Zellen im Peak ganz rechts befinden. Mit jeder abgelaufenen Zellteilung verlieren die proliferierenden Zellen an CFSE-Emission und bewegen sich in der logarithmisch aufgetragenen Skala nach links. Die einzelnen Peaks spiegeln dadurch die Anzahl der durchgemachten Zellteilungen der darin befindlichen Zellen wieder.

Mit dieser Gatingstrategie werden im Folgenden die durchflusszytometrischen Daten der Zeitpunkte 24, 48, 72 und 96 Stunden ausgewertet und verglichen.

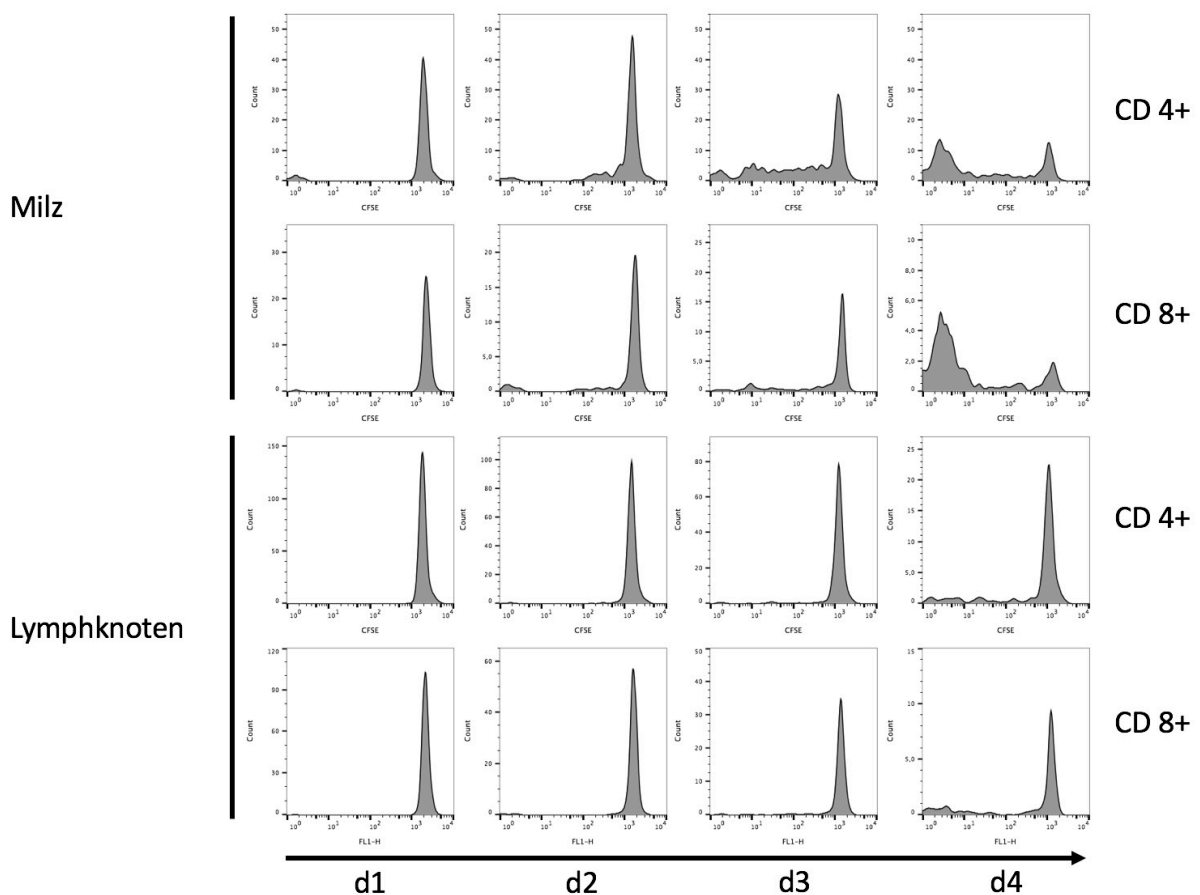


Abbildung 9 Proliferationsanalyse von Milz und Lymphknoten zu verschiedenen Zeitpunkten zur Etablierung des optimalen Versuchszeitraumes

Hier wird ersichtlich, dass nach 48 Stunden eine beginnende Proliferation sowohl von CD4- als auch CD8-positiven Lymphozyten in der Milz nachweisbar ist, welche nach 96 Stunden

bereits weitgehend abgelaufen ist. In den Lymphknoten setzt eine Proliferation in einem bei dieser Zellzahl detektierbarem Umfang erst nach 96 Stunden ein, welche dann jedoch keine ausreichenden Peaks ergibt, um eine Proliferationsanalyse durchführen zu können.

Im Folgenden werden zur Ermittlung der am besten geeigneten Zahl der zu injizierenden Effektorzellen 3 Mäusen jeweils  $5 \times 10^6$ ,  $20 \times 10^6$ , sowie  $50 \times 10^6$  CFSE-gelabelte Effektorzellen injiziert. Ziel dieses Versuches ist, eine Dosis zu ermitteln, bei der durch *gating* eine für die Proliferationsanalyse ausreichende Fraktion an H2K<sup>k</sup>-negativen/CFSE-positiven Effektorzellen isoliert werden kann. Der Versuch wird nach 72 Stunden beendet, aufgrund der zuvor erhobenen Daten wird ausschließlich die Milz untersucht.

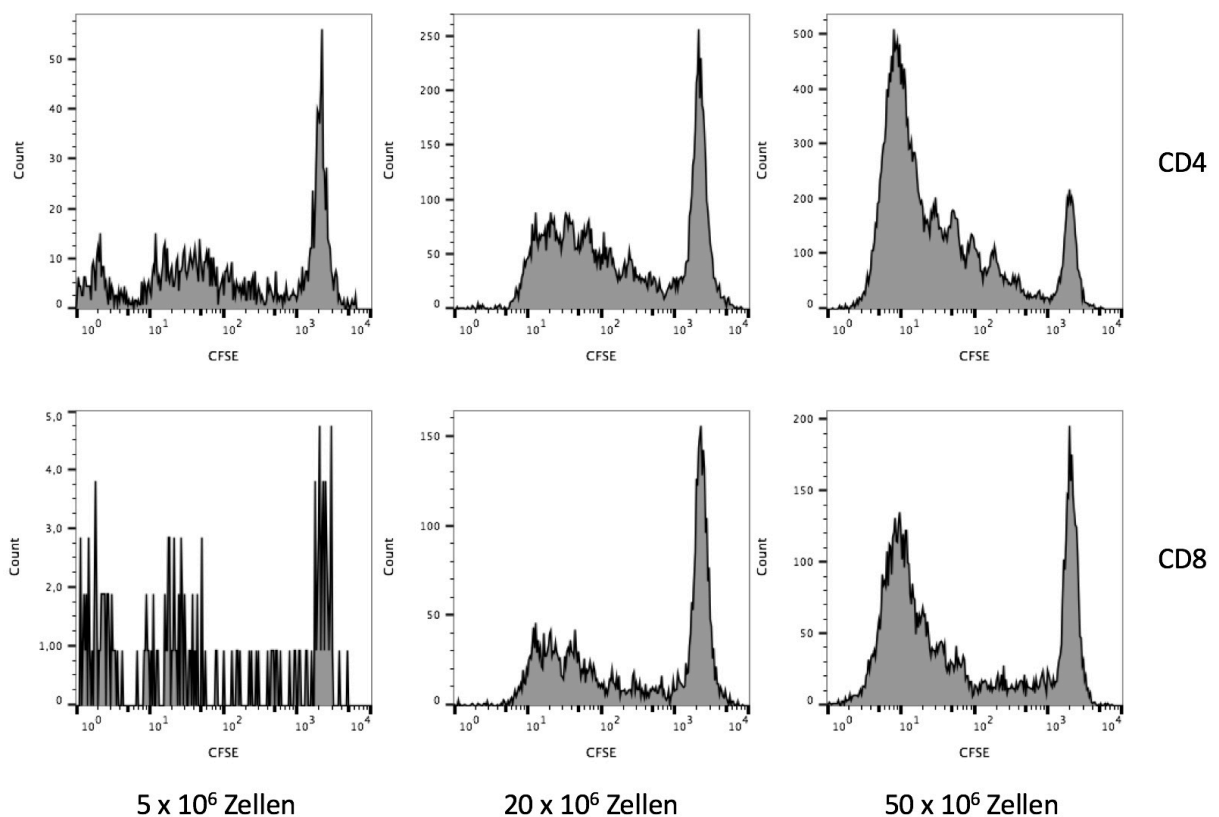


Abbildung 10 Proliferationsanalyse nach Injektion verschiedener Effektorzellmengen

Wie in Abbildung 10 ersichtlich ist die Auswertung der  $5 \times 10^6$  injizierten Zellen hinsichtlich der Proliferation der Effektorzellen aufgrund der zu geringen Zellzahl nicht verwertbar, bei der Analyse der  $20 \times 10^6$  injizierten Zellen zeigen nun im Gegensatz zu den in Abbildung 9 abgebildeten  $10 \times 10^6$  Zellen auch die CD8-positiven Zellen verwertbare Proliferationspeaks.

In der Proliferationsanalyse (Exemplarisch in Abb. 11 und Tabelle 6) werden die einzelnen Peaks einer Proliferationsgeneration zugeordnet, pro Generation wird eine relative Zellanzahl angegeben. Aus diesen Informationen werden Proliferations- und Divisions-Index errechnet.

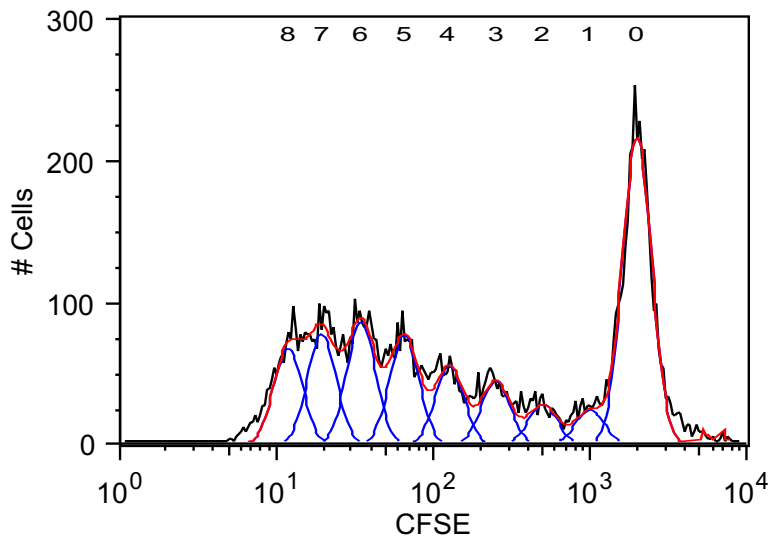


Abbildung 11 Beispielhafte Durchführung einer Proliferationsanalyse

Generation	n
0	3349
1	388
2	456
3	713
4	861
5	1201
6	1345
7	1213
8	1058

Tabelle 6 Beispielhafte Kalkulation einer Proliferationsanalyse

Der Divisionsindex wird aus dem Quotienten aus der Anzahl der abgelaufenen Zellteilungen und der Gesamtzahl der Zellen die zu Beginn der Reaktion vorlagen. In der Analyse der Daten aus Tabelle 6 stellt sich diese Rechnung wie folgt dar:

$$\frac{\left[ \left( \frac{388}{2} \right) + \left( \frac{456}{4} \right) \times 2 + \left( \frac{713}{8} \right) \times 3 + \left( \frac{861}{16} \right) \times 4 + \left( \frac{1201}{32} \right) \times 5 + \left( \frac{1345}{64} \right) \times 6 + \left( \frac{1213}{128} \right) \times 7 + \left( \frac{1058}{256} \right) \times 8 \right]}{\left[ 3349 + \left( \frac{388}{2} \right) + \left( \frac{456}{4} \right) + \left( \frac{713}{8} \right) + \left( \frac{861}{16} \right) + \left( \frac{1201}{32} \right) + \left( \frac{1345}{64} \right) + \left( \frac{1213}{128} \right) + \left( \frac{1058}{256} \right) \right]}$$

also 0,34.

Der Proliferationsindex stellt den Quotienten aus der Anzahl der abgelaufenen Zellteilungen und der Anzahl aller Zellen, die sich in Teilung gegeben haben dar. Im Beispiel:

$$\frac{\left[ \left( \frac{388}{2} \right) + \left( \frac{456}{4} \right) \times 2 + \left( \frac{713}{8} \right) \times 3 + \left( \frac{861}{16} \right) \times 4 + \left( \frac{1201}{32} \right) \times 5 + \left( \frac{1345}{64} \right) \times 6 + \left( \frac{1213}{128} \right) \times 7 + \left( \frac{1058}{256} \right) \times 8 \right]}{\left[ \left( \frac{388}{2} \right) + \left( \frac{456}{4} \right) + \left( \frac{713}{8} \right) + \left( \frac{861}{16} \right) + \left( \frac{1201}{32} \right) + \left( \frac{1345}{64} \right) + \left( \frac{1213}{128} \right) + \left( \frac{1058}{256} \right) \right]}$$

Im Ergebnis 2,52.

Der Proliferations-Index lässt somit Aussagen über die Kinetik des aktiven Teils der Zellen zu, der Divisions-Index bildet die Kinetik sämtlicher Zellen, also auch der nicht proliferierenden ab. Als weitere relevante Größe gibt die % *divided* den Anteil der Zellen die sich in Teilung gegeben haben an der Gesamtzellzahl an.

Um aussagekräftige quantitative Daten zu erhalten sind also ausreichend große Zellzahlen in der Analyse erforderlich, sowohl für die Analyse von CD4- als auch für CD8-positiven Effektorzellen ist die Injektion von  $20 \times 10^6$  Zellen notwendig.

### **3.2 Effekt von MSC auf die T-Zell-Proliferation**

Hier sollte untersucht werden ob MSC, wie aus in-vitro Versuchen bekannt, auch ohne die Zugabe eines immunsuppressiven Medikamentes eine Wirkung auf die Proliferation der Effektorzellen haben und welche MSC sich für die Kombinationsversuche am ehesten eignen. Zu diesem Zweck wurde den Tieren einen Tag vor Gabe der Effektorzellen je  $0,5 \times 10^6$  C3H-MSK injiziert. Die Versuche wurden 48 Stunden nach Injektion der Effektorzellen beendet, um die Proliferation der ersten Teilungsgenerationen abbilden zu können. Zur besseren Vergleichbarkeit und Objektivierbarkeit wurde die Proliferationsanalyse herangezogen.

In der Kontrollgruppe, die aus 8 Tieren besteht, welche 24h vor Injektion der Effektorzellen 0,5ml PBS injiziert bekamen ergibt sich für CD4-positive Zellen ein Proliferationsindex von  $2,311 (\pm 0,05755 \text{ SEM})$ , ein Divisionsindex von  $0,465 (\pm 0,0226 \text{ SEM})$  und eine *% divided* von  $20,24 (\pm 0,8144 \text{ SEM})$ , was einer ausgeprägten T-Zell-Proliferation entspricht. Diese Werte wurden für die weiteren Versuche als Basalwerte angenommen. Bei der Verwendung von C3H-MSK ergibt sich für die CD4-positiven Zellen ein Proliferationsindex von  $2,124 (\pm 0,0675 \text{ SEM})$ , ein Divisionsindex von  $0,3729 (\pm 0,02388 \text{ SEM})$  und eine *% divided* von  $18,18 (\pm 0,8885 \text{ SEM})$ . In einer statistischen Analyse, bei der der ungepaarte Student's t-test mit einem 95%igem Konfidenzintervall eingesetzt wurde zeigten sich sowohl der Proliferationsindex ( $p = 0,0268$ ), sowie auch der Divisionsindex ( $p = 0,0075$ ) signifikant reduziert. Die *% divided* änderte sich nicht signifikant. Diese Veränderungen spiegeln sich auch in den exemplarisch dargestellten Proliferationskurven im Sinne einer im Verlauf abgeschwächten Proliferation (s. Abbildung 12). Für CD8 positive-Zellen ergab sich kein signifikanter Unterschied in einem der Indices.

Um zu überprüfen, ob dieser Effekt auch mit f1-Zellen erreicht werden kann wurde der Versuch mit diesen wiederholt. Hierbei zeigten sich ebenfalls reduzierte Mittelwerte für Proliferationsindex ( $2,105 \pm 0,1198 \text{ SEM}$ ) und Divisionsindex ( $0,43 \pm 0,3391 \text{ SEM}$ ), welche jedoch kein Signifikanzniveau erreichten.

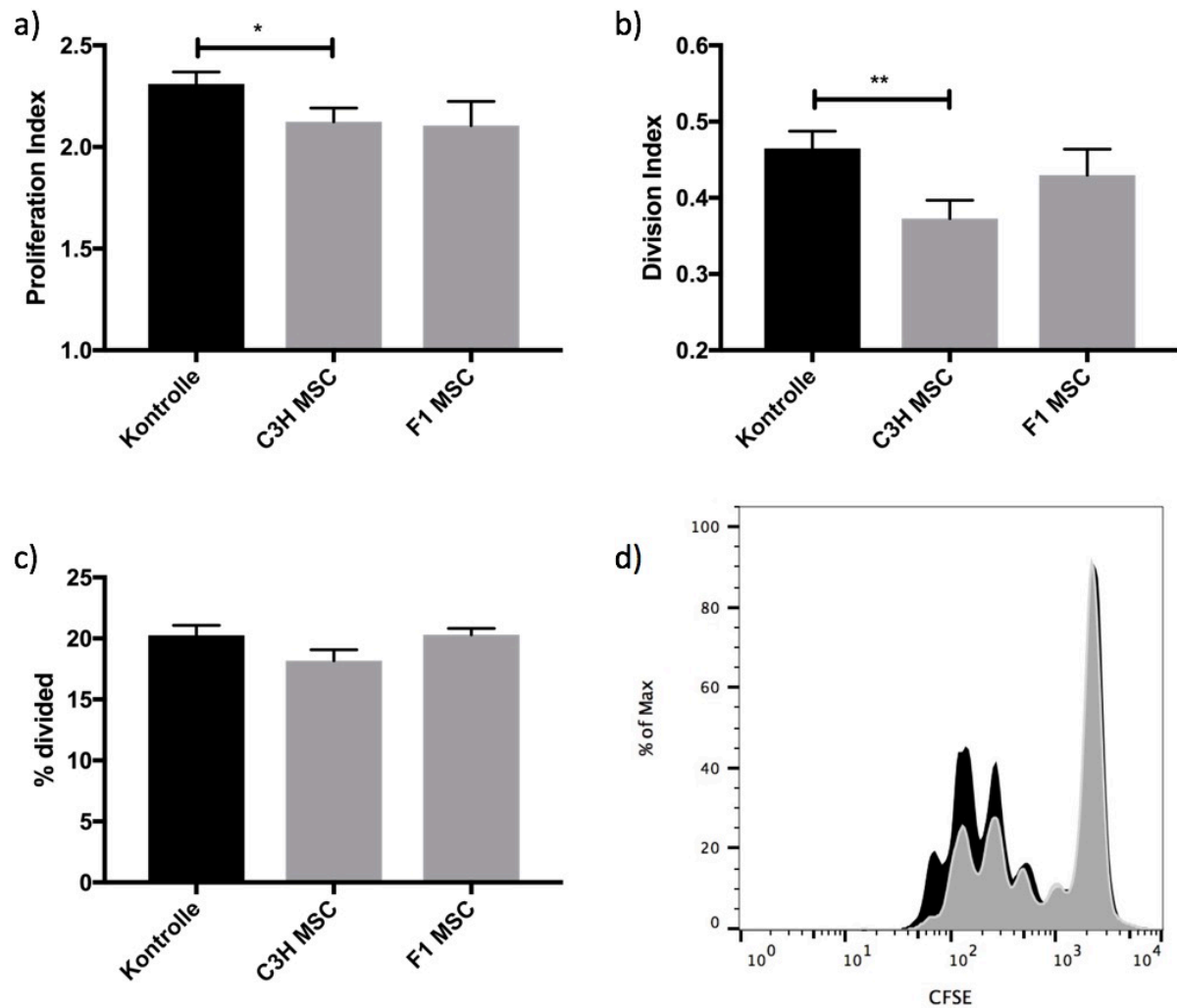


Abbildung 12 Proliferationsanalyse der CD4-positiven Effektorzellen: Signifikante Reduzierung des Proliferations- und Divisionsindex (a;b) bei unveränderter %divided (c). Beispielhafte Darstellung der Proliferationskurve (schwarz: Kontrolle; grau: C3H MSC) (d).

### 3.3 Effekt der medikamentösen Immunsuppression auf die T-Zell-Proliferation

Nachdem gezeigt wurde, dass MSC einen signifikanten Einfluss auf die T-Zell-Proliferation in der in-vivo-MLR des f1-Models haben, wird anschließend das Proliferationsverhalten der Effektorzellen einer kurzzeitigen medikamentösen immunsuppressiven Therapie unterworfen. Pharmakologisch relevante Dosierungen von Mycophenolat Mofetil, Ciclosporin A und Sirolimus resultieren in einer dosisabhängigen Unterdrückung der proliferativen CD4-T-Zell-Antwort.

### 3.3.1 Mycophenolat Mofetil

Zunächst sollen die Auswirkung von MMF auf die T-Zell-Proliferation getestet werden und eine adäquate Dosis für Kombinationsversuche ermittelt werden. Hierzu wird MMF in verschiedenen Konzentrationen unmittelbar nach Injektion der Effektorzellen sowie nach 12; 24 und 36 Stunden intraperitoneal injiziert. Die Versuche werden nach 48 Stunden beendet. In der Proliferationsanalyse zeigt sich eine dosisabhängige Wirkung von MMF auf den Proliferations- und Divisionsindex von CD4-Zellen bei unveränderter % divided.

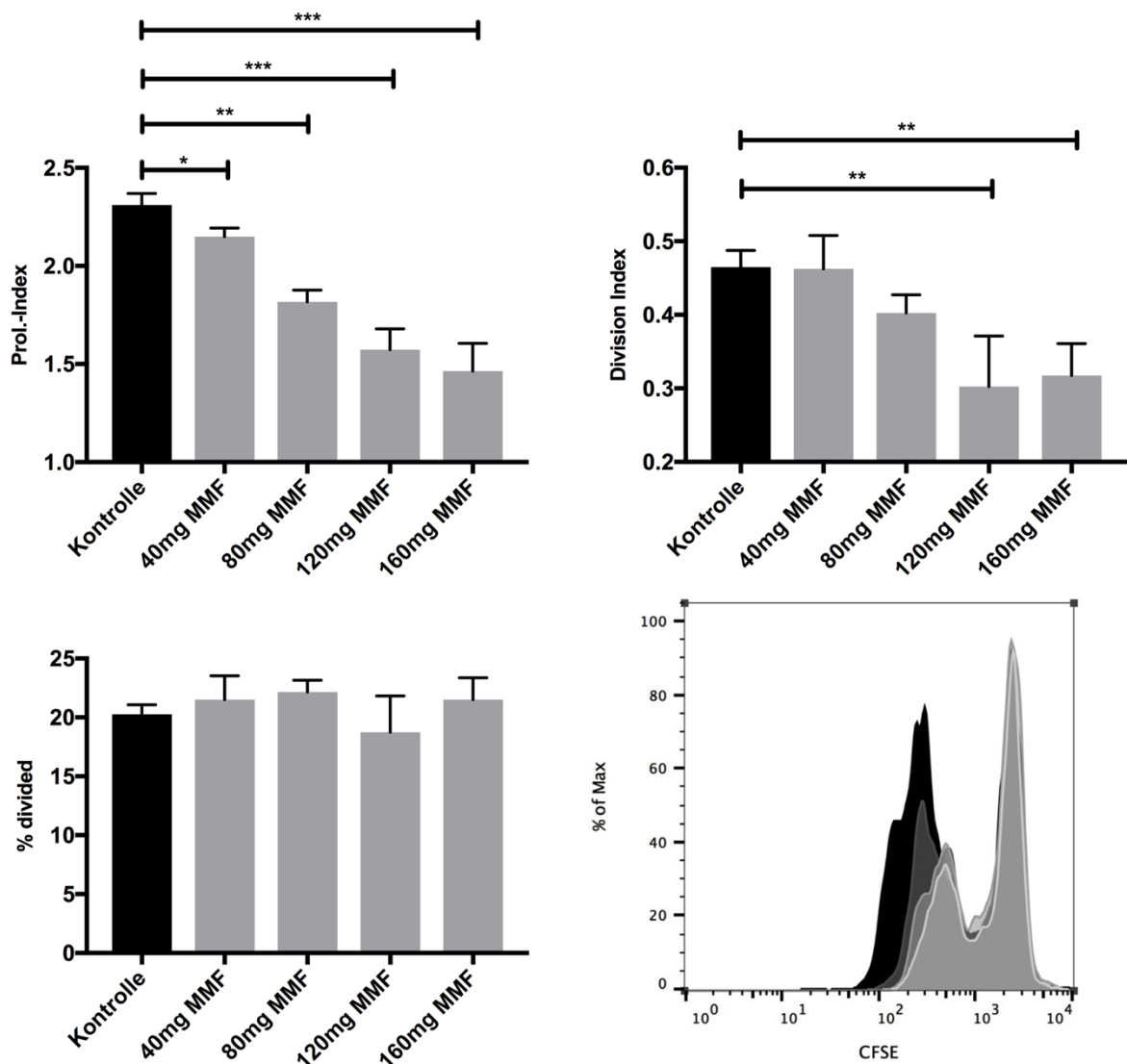


Abbildung 13 CD4+ Proliferationsanalyse der CD4-positiven Effektorzellen: Signifikante Reduzierung des Proliferations- und Divisionsindex (a;b) mit steigender MMF-Dosierung bei unveränderter %divided (c). Beispielhafte Darstellung der Proliferationskurve (schwarz: Kontrolle, steigende MMF-Dosierungen mit hellerem Grauton) (d).

Der Proliferationsindex für CD4-Zellen wird durch Gabe von MMF in der in-vivo-MLR reduziert. Im Vergleich zur Kontrolle (PI=2,311; DI=0,465; %divided=20,24) zeigt sich ein

signifikanter Abfall der Mittelwerte für alle Dosierungen nach Analyse mit dem Student's t-test. Bei Gabe von 40mg zeigt sich ein Proliferationsindex von 2,15 ( $\pm 0,04301$  SEM);  $p = 0,0488$ , bei 80mg 1,818 ( $\pm 0,05963$  SEM);  $p = 0,0002$ , für 120mg 1,573 ( $\pm 0,1098$  SEM);  $p < 0,0001$  und bei der Gabe von 160mg alle 12 Stunden 1,465 ( $\pm 0,1401$  SEM);  $p < 0,0001$ . Für den Divisionsindex zeigen sich bei höherer Dosierung ebenfalls signifikante Abfälle, bei 120mg liegt der Mittelwert bei 0,3025 ( $\pm 0,0686$  SEM);  $p = 0,0082$ , nach Applikation von 160mg bei vergleichbaren 0,3175 ( $\pm 0,04376$  SEM);  $p = 0,0036$ . Nach Gabe von 80mg MMF ergibt sich im Mittel ein DI von 0,4025 ( $\pm 0,02462$ ), welcher eine deutliche Reduzierung bedeutet, jedoch mit einem  $p$  von 0,0596 nicht signifikant ist. In der Analyse der % *divided* ergeben sich für die einzelnen Dosierungen keine Signifikanzen im Vergleich zur Kontrolle oder untereinander.

Zusammenfassend zeigt Mycofenolat Mofetil eine dosisabhängige proliferationshemmende Wirkung auf die CD4-Zellen, dabei erscheint die Dosis von 80mg alle 12 Stunden hinsichtlich ihres Effektes gut geeignet für Kombinationsversuche.

### 3.3.2 Ciclosporin A

Im Folgenden wird der Effekt von Ciclosporin auf die CD4-T-Zell-Proliferation untersucht, gleichzeitig soll ebenso eine geeignete Dosis für Kombinationsversuche ermittelt werden. Zu diesem Zweck werden, analog zu den Versuchen mit MMF, unmittelbar nach Injektion der Effektorzellen sowie nach weiteren 12, 24 und 36 Stunden wiederholte Dosen Ciclosporin intraperitoneal verabreicht.

In der Proliferationsanalyse der durchflusszytometrischen Daten zeigt sich hier eine deutliche Dosisabhängigkeit des proliferationshemmenden Effektes. Der Proliferationsindex ist bei der Gabe von 5mg Ciclosporin mit einem Mittelwert von 2,235 ( $\pm 0,08995$  SEM) vergleichbar zur Kontrolle, der Divisionsindex mit 0,465 ( $\pm 0,04873$ ) jedoch bereits signifikant verringert ( $p = 0,028$ ). Auch die % *divided* zeigt sich mit einem Mittelwert von 16,08 ( $\pm 1,54$  SEM) signifikant reduziert ( $p = 0,0243$ ). Bei höherer Dosierung setzt sich dieser Effekt fort, für den Proliferationsindex werden Mittelwerte von 1,758 ( $\pm 0,0326$  SEM) bei 10 mg ( $p < 0,0001$ ) und 1,525 ( $\pm 0,05723$  SEM) bei 15 mg ( $p < 0,0001$ ), für den Divisionsindex 0,185 ( $\pm 0,01258$  SEM) bei 10mg ( $p < 0,0001$ ) und 0,1125 ( $\pm 0,0075$  SEM) bei 15mg und für die % *divided* 10,49 ( $\pm 0,7682$ ) bei 10mg ( $p < 0,0001$ ) und 7,27 ( $\pm 0,4336$  SEM) bei 15mg ( $p < 0,0001$ ) errechnet, die alle ein deutliches Signifikanzniveau im Student's t-test erreichen.

Diese Ergebnisse lassen sich auch mit Blick auf die exemplarisch ausgewählten Proliferationskurven nachvollziehen, da Ciclosporin, im Gegensatz zur MMF-Therapie eine dosisabhängige Reduzierung der Höhe der einzelnen Proliferationspeaks ab der ersten Generation bewirkt, ohne die Anzahl der durchgemachten Proliferationschritte maßgeblich zu beeinflussen. Für die Kombinationsversuche wurde die Dosis von 10mg Ciclosporin A alle 12 Stunden gewählt.

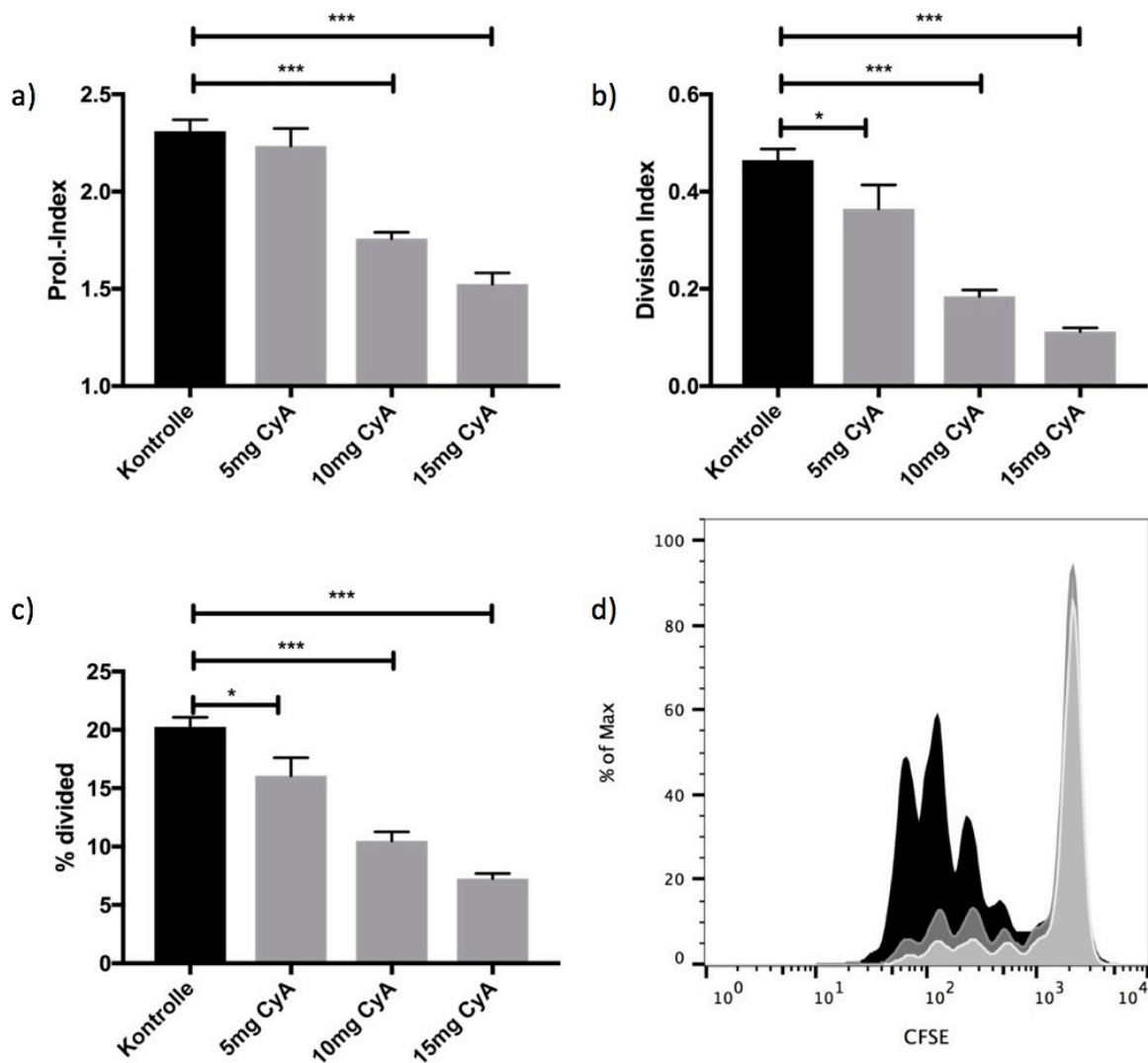


Abbildung 14 Proliferationsanalyse der CD4-positiven Effektorzellen: Signifikante Reduzierung des Proliferations- und Divisionsindex (a;b) sowie der %divided (c) mit steigender Ciclosporin-A-Dosierung. Beispielhafte Darstellung der Proliferationskurve (schwarz: Kontrolle, steigende Ciclosporin-A-Dosierungen mit hellerem Grauton) (d).

### 3.3.3 Sirolimus

Der Effekt von Sirolimus auf die T-Zell-Proliferation wird analog zu den oben genannten Versuchen untersucht. Dabei wird Sirolimus aufgrund seiner langen Halbwertszeit jedoch nur einmal täglich, also direkt nach der Injektion der Effektorzellen und 24 Stunden später

verabreicht. In der Betrachtung der Proliferationskurve fällt eine deutliche Reduzierung der Generationenanzahl mit steigender Dosis auf. Dies spiegelt sich, ähnlich der Analyse von MMF, im Proliferationsindex und im Divisionsindex wieder. Während die Dosierung von 0,01mg pro Kilogramm Körpergewicht in der Analyse keine signifikante Änderung der CD4-Zell-Proliferation bewirken kann, zeigt sich bei 0,1mg ein mit einem Mittelwert von 1,793 ( $\pm$  0,0725 SEM) signifikant reduzierter PI ( $p = 0,0003$ ), der Divisionsindex bietet mit einem Mittelwert von 0,41 ( $\pm$  0,02677 SEM) zwar einen angedeuteten Abfall, aber keine Signifikanz. Nach der Gabe von 0,5mg Sirolimus pro Kilogramm Körpergewicht sinkt der PI auf 1,425 ( $\pm$  0,06436 SEM;  $p < 0,0001$ ) und der Divisionsindex auf 0,2725 ( $\pm$  0,03301 SEM;  $p = 0,0007$ ). Der Divisionsindex bietet in keiner der Dosierungen einen signifikanten Unterschied.

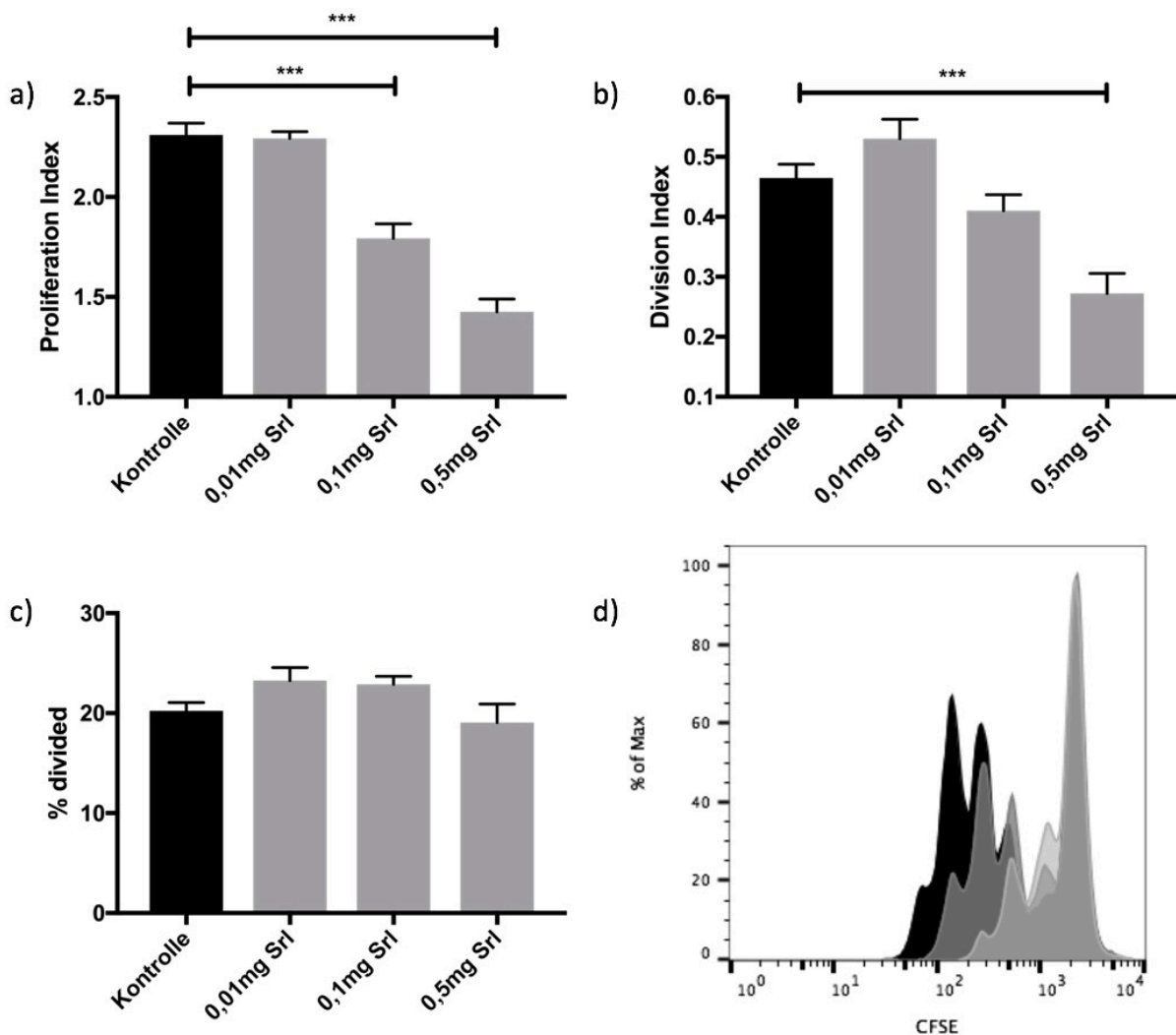


Abbildung 15 Proliferationsanalyse der CD4-positiven Effektorzellen: Signifikante Reduzierung des Proliferationsindex (a) und in höherer Dosis auch des Divisionsindex (b) bei unveränderter %divided (c) mit steigender Sirolimusdosis. Beispielhafte Darstellung der Proliferationskurve (schwarz: Kontrolle, steigende Sirolimus-Dosierungen mit hellerem Grauton) (d).

Für die Kombinationsversuche wird die Dosis 0,5mg Sirolimus pro Kilogramm Körpergewicht gewählt.

### 3.4 Effekt der Kombinationstherapie

Nach Etablierung des Modells und Testung von MSC und verschiedener medikamentöser Immunsuppressiva auf die CD4-T-Zell-Proliferation wird nun im Folgenden in Kombinationsversuchen ein möglicher synergistischer Effekt von MSC und einzelnen Immunsuppressiva untersucht. Hierzu werden den Versuchstieren zunächst MSC injiziert und mit 24 Stunden Abstand die Effektorzellen. Anschließend werden die Immunsuppressiva nach den unter 2.2.9.6ff festgelegten Schemata intraperitoneal verabreicht. Die Versuche werden 48 Stunden nach Injektion der Effektorzellen beendet.

In der Kombinationstherapie mit mesenchymalen Stammzellen erreicht in diesem Modell lediglich MMF einen signifikanten synergistischen Effekt, also eine Hemmung der CD4-T-Zell-Proliferation die über den Effekt der MMF-Mono-Therapie signifikant hinausgeht. Für Ciclosporin A und Sirolimus ergibt sich kein zusätzlicher proliferationshemmender Effekt der MSC.

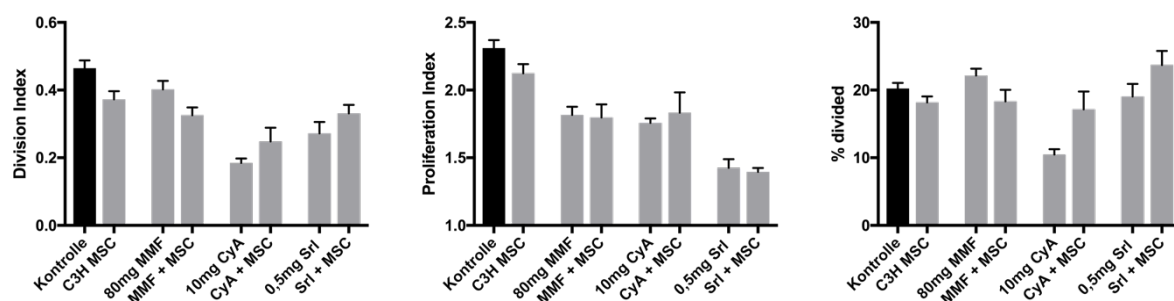


Abbildung 16 Übersicht Kombinationstherapie

#### 3.4.1 Mycophenolat Mofetil & MSC

Für die Kombination von MSC mit MMF liegt der Mittelwert des Divisionsindex bei 0,3257 ( $\pm 0,02298$  SEM) und damit signifikant niedriger als in der Kontrolle mit einem Mittelwert von 0,465 ( $\pm 0,0226$  SEM) mit  $p = 0,0009$  im T-Test. Eine signifikant geringere Proliferation zeigt die Kombinationstherapie auch im Vergleich zur MMF-Monotherapie mit einem Mittelwert von 0,4025 ( $\pm 0,02462$  SEM;  $p = 0,0304$ ), nicht jedoch zur alleinigen MSC-Gabe mit einem Mittelwert von 0,3729 ( $\pm 0,002388$  SEM;  $p = 0,0901$ ). Der Proliferationsindex

zeigt sich mit einem Mittelwert von  $1,799 (\pm 0,09635 \text{ SEM})$  ebenfalls signifikant niedriger für die Kombinationstherapie als in der Kontrolle ( $2,311 \pm 0,05755 \text{ SEM}$ ;  $p=0,0004$ ). Im Vergleich mit der MMF-Monotherapie ( $1,818 \pm 0,05963 \text{ SEM}$ ) zeigt sich hier zwar kein signifikanter Unterschied, die Kombinationstherapie zeigt jedoch einen signifikant niedrigeren Proliferationsindex als die MSC-Monotherapie mit  $2,124 (\pm 0,0675 \text{ SEM}$ ;  $p=0,0170$ ). In der % *divided* ergeben sich, ähnlich der MMF-Monotherapie und der MSC-Monotherapie keine signifikanten Änderungen.

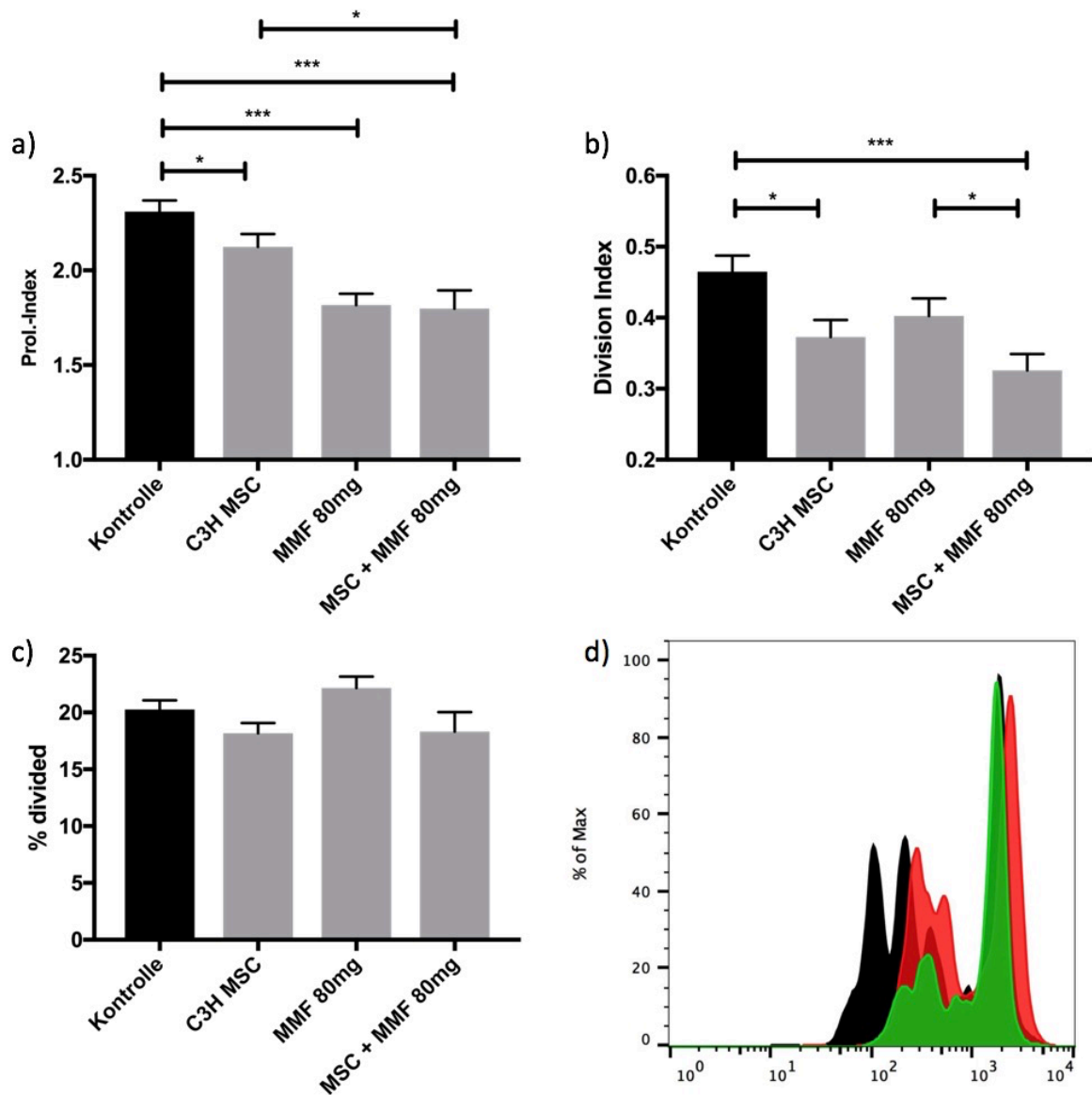


Abbildung 17 Proliferationsanalyse der CD4-positiven Effektorzellen nach Kombinationstherapie mit MMF und MSC: Signifikante Reduzierung des Divisionsindex (b) durch die Kombinationstherapie im Vergleich zur MMF-Monotherapie. Proliferationsindex (a) und %divided (c) bleiben ohne Signifikante Änderung. Beispielhafte Darstellung der Proliferationskurve (schwarz: Kontrolle, rot MMF-Monotherapie, grün MMF-MSC-Kombinationstherapie) (d).

### 3.4.2 Ciclosporin A & MSC

Für die Kombination von Ciclosporin A und mesenchymalen Stammzellen ergibt sich aus der Proliferationsanalyse der CD4-positiven Zellen für den Division Index ein Mittelwert von  $0,2481 (\pm 0,04075 \text{ SEM})$ , welcher eine leichte, jedoch nicht signifikante Zunahme im Vergleich zur Ciclosporin-Monotherapie ( $0,185 (\pm 0,01258 \text{ SEM})$ ) bedeutet. Auch der Proliferationsindex liegt mit  $1,833 (\pm 0,1497 \text{ SEM})$  wenig über der Monotherapie ( $1,758 \pm 0,03326 \text{ SEM}$ ), genau so die % *divided* mit  $17,17 (\pm 2,619 \text{ SEM})$  versus  $10,40 (\pm 0,7682 \text{ SEM})$ , was jedoch ebenfalls jeweils kein Signifikanzniveau erreicht.

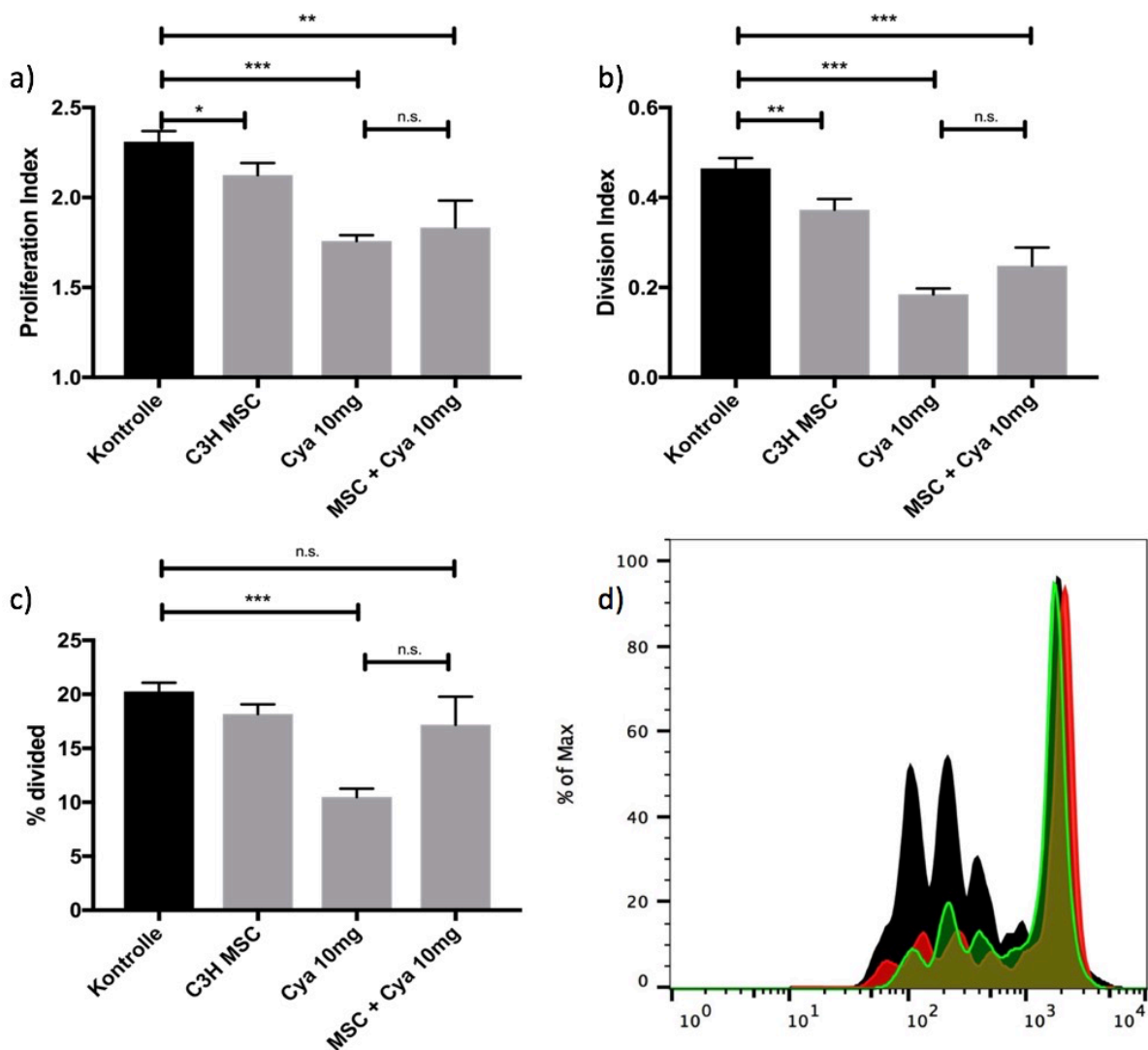


Abbildung 18 Proliferationsanalyse der CD4-positiven Effektorzellen nach Kombinationstherapie mit Ciclosporin A und MSC: Keine signifikante Differenz in der Proliferationsanalyse durch die Kombinationstherapie im Vergleich zur Ciclosporin-Monotherapie (a;b;c). Beispielhafte Darstellung der Proliferationskurve (schwarz: Kontrolle, rot Ciclosporin-Monotherapie, grün Ciclosporin-MMF-Kombinationstherapie) (d).

Die Proliferation der Kombinationstherapie liegt somit signifikant unter dem Niveau der Kontrollen, zeigt jedoch keine Hinweise für einen synergistischen Effekt der MSC mit Cyclosporin A und scheint der Monotherapie sogar tendenziell unterlegen.

### 3.4.3 Sirolimus + MSC

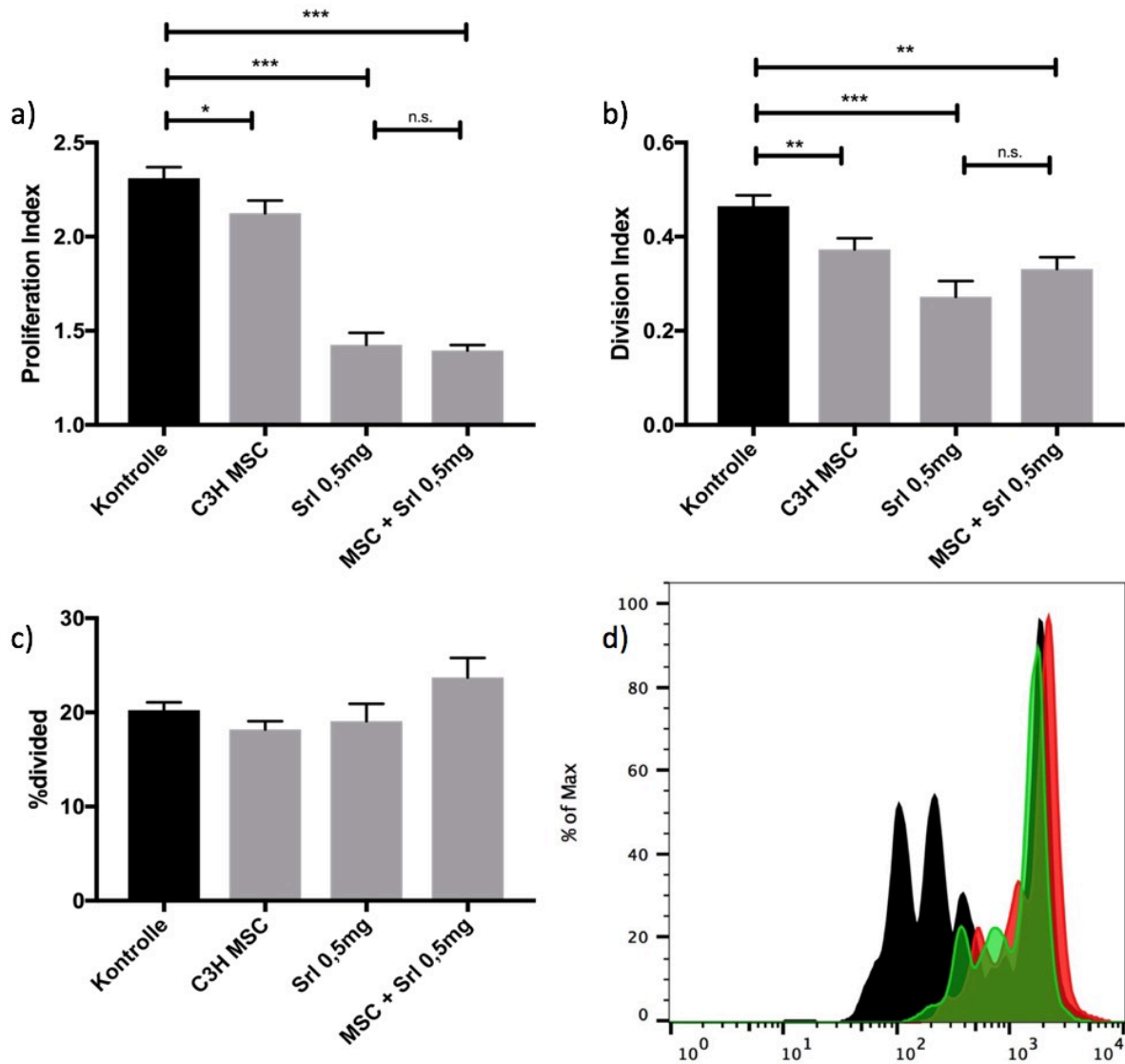


Abbildung 19 Proliferationsanalyse der CD4-positiven Effektorzellen nach Kombinationstherapie mit Sirolimus und MSC: Keine signifikante Differenz in der Proliferationsanalyse durch die Kombinationstherapie im Vergleich zur Sirolimus-Monotherapie (a;b;c). Beispielhafte Darstellung der Proliferationskurve (schwarz: Kontrolle, rot Sirolimus-Monotherapie, grün Sirolimus-MSC-Kombinationstherapie) (d).

Für die Kombination von mesenchymalen Stammzellen und Sirolimus zeigt sich der Proliferationsindex mit  $1,396 (\pm 0,02894 \text{ SEM})$  zwar signifikant niedriger als in der Kontrolle ( $2,311 \pm 0,05755 \text{ SEM}$ ;  $p < 0,0001$ ), jedoch allenfalls minimal reduziert im Vergleich zur alleinigen Sirolimusgabe ( $1,425 \pm 0,06436 \text{ SEM}$ ), ohne eine Signifikanz zu erreichen. Im

Divisionsindex zeigt sich mit  $0,3314 (\pm 0,02492 \text{ SEM})$  ebenfalls ein deutlicher Abfall im Vergleich zur Kontrolle ( $0,0465 \pm 0,0226$ ;  $p = 0,0016$ ), jedoch gar ein leichter, wenn auch nicht signifikanter Anstieg im Vergleich zur Sirolimus-Monotherapie ( $0,2725 \pm 0,03301 \text{ SEM}$ ). Die *% divided* erscheint mit  $23,71 (\pm 2,078 \text{ SEM})$  ebenfalls höher als in der Kontrolle ( $20,24 \pm 0,8144 \text{ SEM}$ ) und in der Gruppe, in der nur Sirolimus verabreicht wurde ( $19,08 \pm 1,843 \text{ SEM}$ ), allerdings auch hier ohne ein Signifikanzniveau zu erreichen.

Auch für Sirolimus zeigt sich somit in der Kombination mit MSC zusammenfassend kein synergistischer Effekt auf die CD4-T-Zell-Proliferation in diesem Model.

### 3.5 Proliferationsanalyse der CD8-T-Zellen

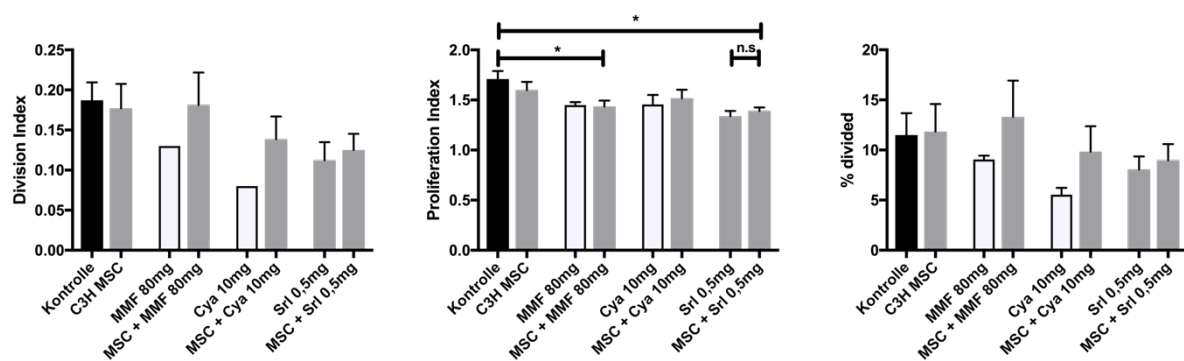


Abbildung 20 Kombinierte Darstellung der Proliferationsanalyse der CD8-positiven Zellen. Lediglich die MMF- und Sirolimus-Therapie zeigen eine im t-Test signifikante Reduzierung des Proliferationsindex. Keine der Kombinationstherapien zeigt Hinweise auf einen synergistischen Effekt hinsichtlich der CD8-T-Zellproliferation.

Zusätzlich zur CD4-Proliferation wurde die CD8-Proliferation untersucht. Für die Ciclosporin- und MMF-Monotherapie konnten lediglich jeweils zwei Tiere in die Auswertung eingehen, weshalb hier aufgrund der zu geringen Datenmenge keine statistischen Berechnungen angestellt wurden. Für die Negativkontrolle, welche lediglich PBS injiziert bekam, zeigt sich ein Proliferationsindex von  $1,709 (\pm 0,08016 \text{ SEM})$ , ein Divisionsindex von  $0,1871 (\pm 0,02244 \text{ SEM})$  sowie eine *% divided* von  $11,49 (\pm 2,187 \text{ SEM})$ . Die alleinige MSC-Gabe ohne medikamentöse Immunsuppression weist mit einem mittleren PI von  $1,6 (\pm 0,08101 \text{ SEM})$ , einem DI von  $0,1771 (\pm 0,03053 \text{ SEM})$  und einer *% divided* von  $11,84 (\pm 2,754 \text{ SEM})$  vergleichbare Werte auf, hat also keinen Proliferationshemmenden Effekt auf die CD8-T-Zellen im f1-Model.

Für die MMF-/MSC-Kombinationstherapie zeigt sich für den Proliferationsindex mit  $1,436 (\pm 0,05579 \text{ SEM})$ , was eine signifikante Reduktion der Proliferation im Vergleich zur

Kontrolle ( $P = 0,0180$ ), nicht jedoch zur MSC Monotherapie bedeutet. Ein Vergleich mit der MMF-Monotherapie entfällt bei nicht ausreichender Versuchstierzahl. Für den Divisionsindex ( $0,1814 \pm 0,04038$  SEM) und die % *divided* ( $13,31 \pm 3,612$  SEM) ergeben sich keine signifikanten Unterschiede zur Kontrolle oder der alleinigen MSC-Gabe.

Bei Betrachtung der CD8-Lymphozytenproliferation unter Ciclosporin-Kombinationstherapie zeigt sich für den Proliferationsindex ein Mittelwert von  $1,517 (\pm 0,08476$  SEM), ein mittlerer Divisionsindex von  $0,1386 (\pm 0,02849$  SEM) und eine % *divided* von  $9,836 (\pm 2,533$  SEM), wobei keiner dieser Werte eine signifikante Differenz im Vergleich zur Kontrolle oder der MSC-Monotherapie darstellt. Ein Vergleich mit der Ciclosporin-Monotherapie entfällt bei nicht ausreichender Versuchstierzahl.

Nach Gabe von Sirolimus zeigte sich der Proliferationsindex mit  $1,34 (\pm 0,05017$  SEM) signifikant reduziert im Vergleich zur Kontrolle ( $p = 0,0105$ ), der Divisionsindex erreicht mit  $0,1125 (\pm 0,0225$  SEM) ebenso wie die % *divided* mit  $8,068 (\pm 1,293$  SEM) kein Signifikanzniveau. In der Kombinationstherapie mit MSC ergibt sich für Sirolimus ebenfalls ein signifikant reduzierter PI mit  $1,392 (\pm 0,034$  SEM;  $p = 0,0057$ ), nicht jedoch für den Divisionsindex ( $0,125 \pm 0,02029$  SEM) oder die % *divided* ( $8,998 \pm 1,591$  SEM). Vergleicht man die Sirolimus Mono- mit der MSC-Kombinationstherapie im Hinblick auf einen synergistischen Effekt ergibt sich für keinen der Indizes eine signifikante Differenz.

## 4 Diskussion

In der vorliegenden Arbeit wurde der Effekt von Mesenchymalen Stammzellen und verschiedener medikamentöser Immunsuppressiva auf die T-Zell-Proliferation untersucht. Hierzu wurde ein f1-Maus-Model etabliert, in dem injizierte Effektor-Splenozyten aus der Parentalgeneration eine Immunantwort durchmachen. Diese Immunantwort wurde einzeln und in Kombination den untersuchten Agenzien unterworfen. Hierbei ließ sich zeigen, dass sowohl MSC als auch die medikamentösen Immunsuppressiva MMF, Ciclosporin A und Sirolimus eine messbare Proliferationshemmung bewirken. Ein synergistischer Effekt, der über die immunsuppressive Potenz der einzelnen Agenzien hinausging, ließ sich nur für die Kombination MSC und MMF aufzeigen.

### 4.1 Eignung des f1-Models zur Beurteilung der T-Zell-Proliferation in-vivo

Obgleich auch schon andere Studien Hinweise auf einen kombinierten Effekt von Mesenchymalen Stammzellen und immunsuppressiven Medikamenten in vitro durch MLRs oder in vivo durch Überlebensversuche liefern konnten<sup>(63,64,77)</sup>, lassen diese lediglich indirekte Rückschlüsse auf einen synergistischen proliferationshemmenden Effekt in-vivo zu. Das vorliegende f1-Model ermöglicht es, den antiproliferativen Effekt der einzelnen Immunsuppressiva sowohl in der Monotherapie als auch in Kombinationstherapie mit MSC unter Zuhilfenahme der Durchflusszytometrie visuell zu veranschaulichen und zudem durch eine Proliferationsanalyse zu objektivieren und dadurch zu konkretisieren.

In Murinen GvHD-Modellen erreicht die CD4-Proliferation ab dem 7. Tag ihren Höhepunkt<sup>(78,79)</sup>. Da in der Vergangenheit mehrfach beschrieben wurde, dass MSC durch verschiedene Mechanismen in die Aktivierung von T-Zellen eingreifen<sup>(55-57,61)</sup> wurde im Rahmen der Etablierungsversuche der ideale Zeitpunkt der Analyse bei 48 Stunden nach Injektion von  $20 \times 10^6$  Effektorzellen verortet. Die CD4-T-Zell-Proliferation zeigt in der vorliegenden Studie zwischen den einzelnen Versuchen, je nach Agens und Dosis, teils deutlich alternierende Proliferationsmuster, als Ausdruck einer veränderten Aktivierung und Proliferation. Gleichzeitig lagen jedoch noch frühe Proliferationsgenerationen vor, sodass davon ausgegangen werden kann, dass die Effektorzellen sich noch in der lag-Phase befanden, also noch kein Verbrauch durch Ausführung einer T-Zell-Antwort im Sinne einer abgelaufenen Graft-versus-host-Reaktion vorliegt<sup>(80)</sup>. Die Anzahl der

Proliferationsgenerationen lag in den Kontrollversuchen bei 6,125 ( $\pm 0,3307$  SD) und zeigte vergleichbare Proliferationskurven, die in-vivo-MLR ist somit in einem reproduzierbaren Rahmen durchführbar. Die erschwerte Auswertbarkeit der CD8-T-Zellen ist am ehesten auf den frühen Zeitpunkt der Analyse zurückzuführen, eine nennenswerte CD8-T-Zell-Antwort setzt in murinen GvHD-Modellen unter Mediation bereits aktivierter CD4-T-Zellen ab dem 10. Tag ein<sup>(81,82)</sup>. Dies könnte erklären, dass trotz der in diesem Model vorliegenden vollständigen MHC-Diversität nur wenig signifikante Aussagen über einen Effekt der Agenzien auf die CD8-T-Zellen getroffen werden kann, da zum Zeitpunkt des Versuchsendes noch keine vollständige Aktivierung von CD8-T-Zellen stattgefunden hat.

Aufgrund der in experimentellen Studien<sup>(22,63,64)</sup> meist singulären Verabreichung der MSC zu einem Zeitpunkt vor der Transplantation und der kurzzeitigen medikamentösen Therapie ab der Transplantation liegt der Schluss nahe, dass der für den synergistischen Effekt relevante Zeitpunkt innerhalb der ersten Stunden nach der Transplantation liegt. Das in dieser Studie etablierte f1-Modell bildet den hierfür relevanten Beobachtungszeitraum von 48 Stunden nach Versuchsbeginn ab.

#### **4.2 Dosisabhängige Wirkung der Immunsuppressiva in der Proliferationsanalyse**

Während MSC ohne zusätzliche pharmakologische immunsuppressive Therapie zwar einen proliferationshemmenden Effekt auf T-Zellen in-vitro zeigen<sup>(56-58)</sup>, ist dieser Effekt in-vivo in verschiedenen Transplantations-Versuchen zwar im Ansatz nachzuvollziehen, bedeutet jedoch konkret häufig lediglich eine Verlängerung des Transplantatüberlebens um wenige Tage<sup>(59,62)</sup>. Im f1-Model lässt sich ein signifikanter proliferationshemmender Effekt allogener MSC nachweisen. Ein reduzierter Divisionsindex bedeutet dabei eine hemmende Wirkung auf die Proliferationskinetik der Gesamtpopulation der Effektorzellen und schließt somit die Aktivierung durch antigenpräsentierende Zellen mit ein, während eine Verminderung des Proliferationsindex eine Proliferationshemmung ausschließlich der aktivierten Lymphozyten beschreibt. Beides wird durch Gabe von MSC im f1-Model in einem Zeitraum von 48 Stunden erreicht, was den kurzfristigen immunsuppressiven Effekt der MSC als Monotherapie unterstreicht. Gleichzeitig ist der Nachweis der Reduktion der T-Zell-Proliferation in-vivo ein wichtiger Baustein, der das Bild zwischen den bisher bekannten molekularbiologischen Mechanismen<sup>(56-58,61)</sup> und dem in Überlebensversuchen gezeigten verlängerten Transplantatüberleben<sup>(22,59,62,63)</sup> vervollständigt. Die Gründe für das Ausbleiben

eines klinisch relevanten Langzeiteffektes in Überlebensversuchen sind dabei möglicherweise in der singulären Verabreichung der MSC zu suchen, die alleine in den bisher angewendeten Modellen nicht zur Toleranzinduktion geeignet scheint. Andererseits bleibt wegen des letztlich unklaren molekularen Wirkmechanismus der Zellen eine Verstärkung der immunsuppressiven Wirkung durch wiederholte Gabe strittig, aufgrund der nicht auszuschließenden Immunogenität der MSC ist im Gegenteil in vollständig allogenen Modellen gar eine T-Zell-Antwort gegen diese bei wiederholter Anwendung nicht auszuschließen<sup>(55)</sup>.

Durch die Applikation von pharmakologischen Immunsuppressiva im Sinne einer Induktionstherapie konnten Popp et al in einem Herztransplantationsmodell in Ratten zeigen, dass ein Überlebensvorteil für das Transplantat besteht, welcher mit der alleinigen MSC-Therapie vergleichbar ist<sup>(63)</sup>. Nach Beendigung der Immunsuppression jedoch ebenfalls innerhalb von Tagen zur Transplantatabstoßung führte. In der Monotherapie zeigen im fl-Modell alle 3 immunsuppressiven Wirkstoffe eine dosisabhängige Proliferationshemmung mit jeweils spezifischen Proliferationskurven.

Der Inosinmonophosphat-Dehydrogenase-Hemmer MMF, welcher in die für die T-Zell-Proliferation geschwindigkeitsbestimmende De-novo-Synthese Guanin-haltiger Nukleotide eingreift<sup>(71,77,80)</sup> senkt dosisabhängig Proliferations- und Divisionsindex der CD4-T-Zellen als Ausdruck einer reduzierten Proliferation. Die Aktivierung der Proliferationskaskade durch Aktivierung des T-Zell-Rezeptors, Co-Stimulation durch membrangebundene Antikörper und Ausschüttung proinflammatorischer Zytokine bleibt durch MMF erhalten, der proliferationshemmende Effekt des Wirkstoffes kommt erst durch eine Unterbrechung des Zell-Zyklus durch fehlende Guanin-haltige Nukleotide zustande, was sich in der konstanten *% divided* ausdrückt.

Der Calcineurininhibitor Ciclosporin A inhibiert durch Dephosphorylierung von NF-AT die Transkription verschiedener T-Zell-stämmiger, aktivierender Zytokine, insbesondere der für die Aktivierung naiver T-Zellen essenziellen Interleukin-2 und Interferon  $\gamma$ <sup>(73,80)</sup>. Dadurch bewirkt Ciclosporin neben einer Reduktion von Proliferations- und Divisionsindex, auch ein Absenken der *% divided* am ehesten als Ausdruck einer Blockade der initialen Aktivierung der CD4-T-Zell-Proliferation.

Der Wirkstoff Sirolimus bewirkt durch Inhibierung des Immunophilin-Komplexes mTOR neben einer Blockade der Zytokinproduktion einen Arrest der proliferierenden Lymphozyten

in der G1-Phase des Zellzyklus<sup>(75,80)</sup>. Auch Sirolimus bewirkt im f1-Model eine dosisabhängige Verminderung von Proliferations- und Divisionsindex. Bei Betrachtung der Proliferationskurven der verschiedenen Dosierungen fällt hierbei eine scheinbare Verlangsamung der Proliferation mit steigender Dosis auf. Dies und die trotz partieller Zytokin-Inhibierung konstante *% divided* nach Anwendung von Sirolimus ist dabei am ehesten durch den Arrest in der G1-Phase nach abgeschlossener erster Mitose zu erklären<sup>(80)</sup>.

### **4.3 CD4-T-Zell-Proliferation unter kombinierter Therapie mit MSC und medikamentöser Immunsuppression**

In diesem Model konnte ein synergistischer Effekt, also eine hemmende Wirkung auf die Proliferation, die über die Wirkung der Monotherapie hinausgeht, für die Kombinationstherapie mittels MSC und MMF beobachtet werden. Dies wird durch eine Arbeit von Hoogduijn et al. gestützt<sup>(77)</sup>, in der in-vitro durch Co-Kultivierung mit MSC gar eine reduzierte proliferationshemmende Wirkung von Sirolimus und dem Calcineurininhibitor Tacrolimus beschrieben wird, während MMF auch hier einen synergistischen Effekt auf die T-Zell-Proliferation aufweist. Im f1-Model beschränkt sich dieser Effekt innerhalb des Beobachtungszeitraumes auf die Proliferation der CD4-positiven T-Zellen. Die CD8-positiven Zellen, die über den Versuchszeitraum von 48 Stunden eine deutlich schwächere Proliferation aufwiesen, zeigen zwar durch die pharmakologischen Immunsuppressiva eine unterschiedlich starke Beeinflussung, eine Verstärkung dieser proliferationshemmenden Wirkung auf zytotoxische T-Zellen durch MSC konnte jedoch nicht gezeigt werden, wobei die volle Entfaltung der CD8-T-Zell-Antwort in murinen GvHD-Modellen außerhalb des Beobachtungszeitraumes liegt<sup>(81,82)</sup>.

MSC und MMF reduzieren in der Monotherapie sowohl den Divisions- als auch den Proliferationsindex. In Kombination zeigt sich ein signifikanter additiver Effekt im Hinblick auf den Divisionsindex der CD4-positiven T-Zellen, nicht jedoch auf den Proliferationsindex im Vergleich zur alleinigen MMF-Therapie. Während die MSC in der Kombinationstherapie somit Einfluss auf die Proliferationskinetik der Gesamtpopulation der Effektorzellen nehmen, scheint eine signifikante andauernde Hemmung der unter Immunsuppression aktivierten Zellen nicht stattzufinden, was die Wichtigkeit einer frühzeitigen Gabe der MSC in einem Transplantationssetup unterstreicht. Dieses Ergebnis korreliert mit dem einer Arbeit von Eggenhofer et al, in der gezeigt werden konnte, dass die Kombination aus, den MSC sehr ähnlichen, multipotenten adulten Progenitor-Zellen (MAPC) und MMF Toleranz nach

Herztransplantation im Rattenmodell induzieren kann<sup>(22)</sup>. Beide Ergebnisse werfen somit die Frage auf, ob die Induktion von Toleranz weniger durch MSC alleine oder gar deren repetitive Anwendung erreichbar ist, sondern vielmehr durch die Kombination von MSC mit einem geeigneten Co-Immunsuppressivum.

Ciclosporin und Sirolimus bewirken am ehesten durch reduzierte Ausschüttung von IL-2 oder durch Blockade des IL-2-Rezeptors und damit durch Inhibierung der folgenden Zytokin-Kaskade mit den Bestandteilen IL-6 und IFN $\gamma$  eine verminderte T-Zell-Aktivierung<sup>(73,75,80)</sup>. Die Kombination beider Wirkstoffe mit MSC zeigt jeweils einen Anstieg im Divisionsindex sowie in der *% divided* im Vergleich zur jeweiligen pharmakologischen Monotherapie, welcher jedoch für keinen der Indices statistisch signifikant ist. Ob dieser Anstieg ein Ausdruck für eine Verkehrung des synergistischen Effektes in eine gesteigerte Immunantwort durch immunogene Bestandteile der Zellinfusion darstellt, wie in der Literatur diskutiert<sup>(83,84)</sup>, bleibt unklar. In weiteren Studien von Eggenhofer et al und Obermajer et al konnten in-vitro bereits die Notwendigkeit der T-Zellaktivierung für den immunsuppressiven Effekt der MSC gezeigt werden<sup>(64,85)</sup>. Dies unterstreicht erneut, dass für den synergistischen Effekt von MSC und MMF die Wirkweise des Pharmakons, das eine T-Zell-Aktivierung zulässt, von zentraler Bedeutung ist. Wirkstoffe wie Ciclosporin und Sirolimus, die eine Veränderung des lokalen Zytokinmilieus bedingen, scheinen für eine Kombination mit MSC im Gegensatz nicht geeignet zu sein<sup>(66)</sup>.

## 4.4 Fazit

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass MSC im angewendeten fl-Maus-Model nach einmaliger Verabreichung einen über den Versuchszeitraum andauernden supprimierenden Effekt auf die Proliferation von CD4-T-Zellen in-vivo haben. Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass die medikamentösen Immunsuppressiva Mycophenolat Mofetil, Ciclosporin und Sirolimus in diesem Model einzeln angewendet eine dosisabhängige Proliferationshemmung bewirken.

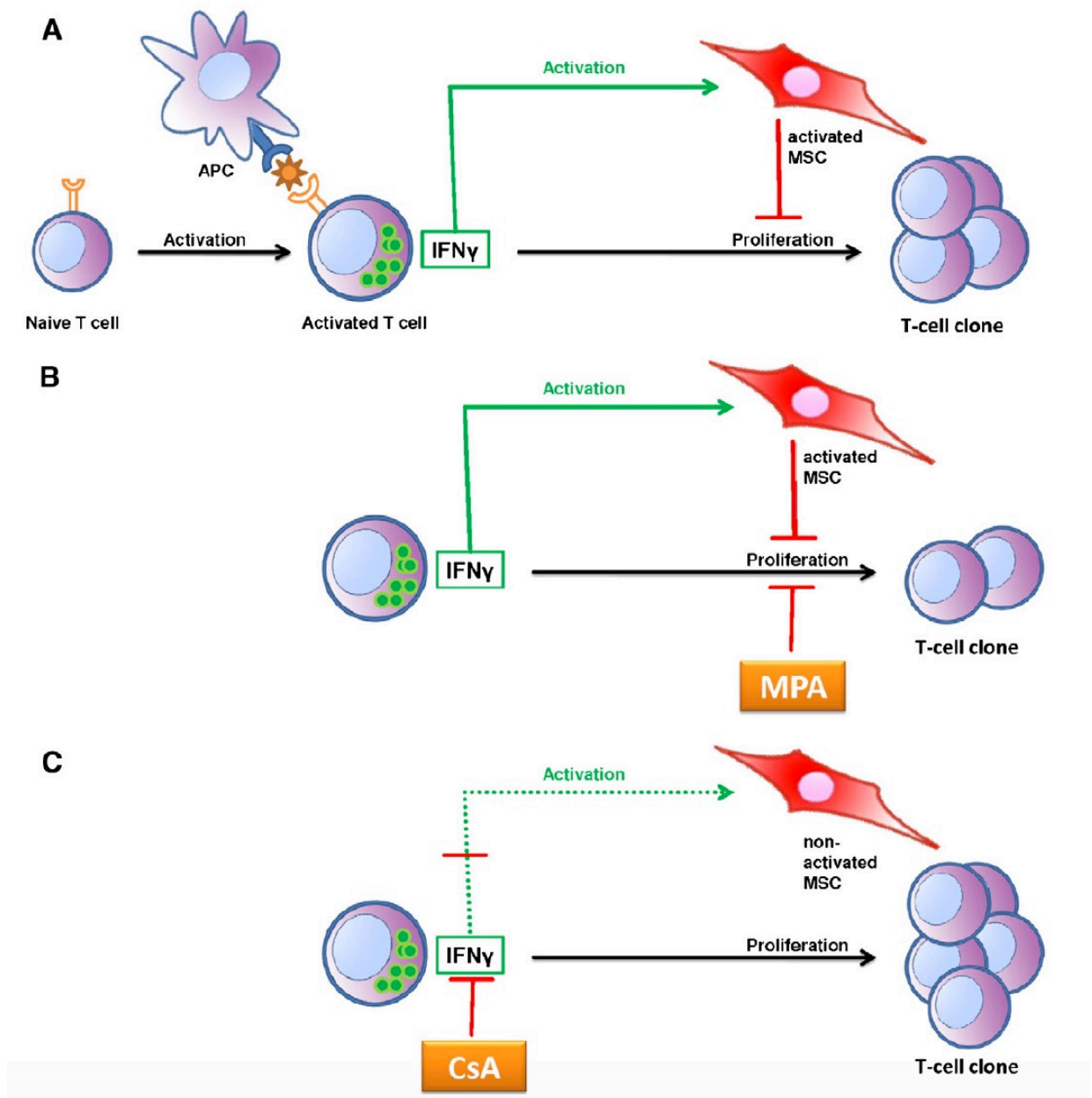


Abbildung 21 Zusammenfassende Darstellung aus Eggenhofer et al.<sup>(76)</sup> A) MSC Monotherapie; B) Kombination aus MSC und MMF; C) Kombination aus Ciclosporin und MSC

In Kombination mit MSC ließ sich für den Inosinmonophosphat-Dehydrogenase-Hemmer MMF ein synergistischer Effekt im Sinne einer Proliferationshemmung, die über die der Einzelsubstanzen hinausgeht, aufzeigen. In Kombination mit Ciclosporin A oder Sirolimus hingegen zeigte sich keine verstärkte Wirkung durch MSC im Vergleich zur Monotherapie.

Diese Ergebnisse untermauern die Ergebnisse mehrerer Studien, in deren Rahmen in Überlebensversuchen bereits Hinweise auf eine synergistische Wirkung von MSC und MMF gefunden wurden<sup>(22,62,63)</sup>. Für die Entfaltung der immunsuppressiven Eigenschaften von MSC scheint die T-Zell-Aktivierung und dadurch eine weitreichende Veränderung des Zytokinmilieus von entscheidender Bedeutung zu sein<sup>(64,84)</sup>. MMF ist von den in dieser Arbeit verwendeten medikamentösen Immunsuppressiva das einzige, das eine T-Zell-Aktivierung zulässt, was diese Beobachtungen unterstreicht. Dies sollte bei weiteren experimentellen und insbesondere klinischen Untersuchungen berücksichtigt werden und Einfluss auf die Planung möglicher translationaler Studien haben.

## 4.5 Ausblick

Die vorliegende Arbeit konnte Hinweise auf eine Hemmung der CD4-T-Zell-Proliferation *in vivo* erhärten und darüber hinaus auch einen in Überlebensversuchen angedeuteten Synergismus zwischen mesenchymalen Stammzellen und Mycophenolat Mofetil untermauern. Während diese Erkenntnis einen weiteren Baustein in der Erforschung und Etablierung einer therapeutischen Anwendung mesenchymaler Stammzellen in der Organtransplantation darstellt, konnte weiteren drängenden Fragen in dieser Arbeit nicht nachgegangen werden:

So bleibt offen, ob auch die Proliferation weiterer Leukozytensubpopulationen wie CD8-Zellen, T<sub>reg</sub> oder NK-Zellen von einem synergistischen Effekt betroffen ist. Insbesondere die Proliferation der CD8-Zellen entzieht sich hierbei wohl dem, auf die Beobachtung der CD4-Zellproliferation optimierten Versuchszeitraum.

Weitere Anstrengungen sind außerdem notwendig um fundierte Aussagen über eine eventuelle Immunogenität der MSC treffen zu können. Sollte diese nicht oder nur unter vermeidbaren Umständen bestehen wäre zudem von Interesse, ob sich der immunsuppressive Effekt von MSC durch wiederholte Anwendung verstärken oder länger aufrechterhalten lässt, oder ob für eine mögliche Toleranzinduktion<sup>(22)</sup> die Kombination mit einem geeigneten medikamentösen Immunsuppressivum eher zielführend ist.

Während sich diese Arbeit nicht mit dem zugrundeliegenden molekularen Mechanismus dieses MSC-Effektes beschäftigt hat, bleibt dieser trotz vieler vorhandener Mosaiksteinchen<sup>(55,56,57,66,67)</sup> letztlich weiterhin ungeklärt.

Wie oft in der experimentellen Immunologie stellt sich die Frage, in wie weit diese und weitere Fragestellungen in immer komplexeren und anfälligeren Mausmodellen, deren vollständige Übertragbarkeit auf den menschlichen Organismus fraglich sind, intensiviert erforscht werden sollten. Aufgrund der zunehmenden klinischen Erfahrung mit MSC in Studien und alternativen Heilversuchen mit guter Verträglichkeit insbesondere im Rahmen der GvHD sollten zusätzlich Überlegungen zur Planung und Durchführung translationaler Phase-I- und II-Studien angestellt werden.

## 5 Zusammenfassung

Organtransplantationen stellen für viele Erkrankungen, die mit dem endgültigen Funktionsverlust eines Organs verbunden sind, die einzige kurative Behandlungsoption dar. Um Abstoßungen und damit den Organverlust zu vermeiden ist eine medikamentöse immunsuppressive Therapie nach Transplantation unumgänglich. Trotz enormer Fortschritte im Bereich der medikamentösen Immunsuppression in den letzten Jahrzehnten haben diese Medikamente weiterhin starke Nebenwirkungen, die von akuten gastrointestinalen Nebenwirkungen bis zur chronischen Niereninsuffizienz reichen. In der Ära der Stammzelltherapie versprechen Mesenchymale Stammzellen, die neben den hämatopoetischen Stammzellen eine Nische im Knochenmark besetzen, einen vielversprechenden Behandlungsansatz. Neben ihren proliferativen Eigenschaften besitzen MSC auch immunmodulatorische Fähigkeiten. Während der vollständige Mechanismus dieser Immunmodulation noch unklar ist, konnte in murinen Überlebensversuchen bereits gezeigt werden, dass MSC das Transplantatüberleben verlängern können.

Für diese Arbeit wurde ein fl-Maus-Model gewählt um den Nachweis eines antiproliferativen Effektes von MSC alleine zu erbringen und einen synergistischen Effekt mit verschiedenen medikamentösen Immunsuppressiva zu untersuchen. Hierzu wurden den Versuchstieren der fl-Generation Splenozyten der Parentalgeneration injiziert, welche in den Versuchstieren eine T-Zell-Antwort im Sinne einer Graft-versus-Host-Disease orchestrierten. Durch Fluoreszenzmarkierung wurden diese Effektorzellen nach 48 Stunden identifiziert und einer durchflusszytometrischen Aufarbeitung mit anschließender Proliferationsanalyse zugeführt.

Nach Etablierung des Modells wurde in verschiedenen Versuchsgruppen zunächst der Effekt einer MSC Gabe 24 Stunden vor Effektorzellinjektion auf die T-Zell-Proliferation untersucht. Anschließend wurde die T-Zell-Antwort einer medikamentösen immunsuppressiven Therapie mit Mycophenolat Mofetil, Ciclosporin und Sirolimus durch wiederholte Applikation der Medikamente in unterschiedlicher Dosierung nach Injektion der Effektorzellen unterworfen. Abschließend folgte die Untersuchung eines synergistischen Effektes einer kombinierten Therapie mit MSC und medikamentöser Immunsuppression. Hierzu wurden den Versuchstieren zunächst 24 Stunden vor Injektion der Effektorzellen MSC injiziert und anschließend im gleichen Schema wie in der zuvor austitrierten Monotherapie eine medikamentöse Immunsuppression verabreicht.

Die MSC-Monotherapie zeigte hierbei eine reduzierte Proliferation der Effektorzellen, wobei die Proliferationsanalyse darauf hindeutet, dass sowohl die Aktivierung der T-Zellen, als auch die Proliferationsgeschwindigkeit nach dem Einsatz allogener MSC signifikant verringert werden. In der Monotherapie mit MMF, Ciclosporin und Sirolimus konnte für jedes der Immunsuppressiva eine dosisabhängige Proliferationshemmung nachgewiesen werden, wobei jedes Immunsuppressivum unterschiedliche, charakteristische Veränderungen der Proliferationskurven bewirkte. Abschließend konnte für die Kombinationstherapie mit MSC und MMF ein signifikanter synergistischer Effekt auf die Proliferationshemmung der CD4-T-Zellen gezeigt werden, der über das Ausmaß der jeweiligen Monotherapie hinausging, während dies weder für die Kombinationstherapie mit Ciclosporin noch mit Sirolimus gelang.

Diese Ergebnisse stützen die These, dass MSC nicht nur *in vitro*, sondern auch *in vivo* einen immunsuppressiven Effekt haben und korrelieren mit den Erkenntnissen der zuvor erwähnten Überlebensversuche. Darüber hinaus bestätigen sie einen synergistischen Effekt zwischen MSC und MMF, der sich in den ersten Stunden nach Initiierung einer T-Zell-Antwort Bahn bricht und zeigen die Notwendigkeit der richtigen Wahl der Co-Immunsuppressiva bei klinischer Anwendung von MSC auf.

## 6 Literatur

1. Bundesärztekammer. Richtlinien für die Wartelistenführung und die Organvermittlung gem. §16 Abs. 1 S. 1 Nrn 2 u. 5 TPG.
2. Eurotransplant. Jahresstatistik 2016.
3. Deutsche Stiftung Organtransplantation. Jahresbericht Organspende und Transplantation in Deutschland 2016.
4. Pabón MA, Navarro CE, Martín R, Rodríguez M, Martín I, Gaitán L, u. a. Minor Histocompatibility Antigens as Risk Factor for Poor Prognosis in Kidney Transplantation. *Transplant Proc.* November 2011;43(9):3319–23.
5. Goulmy E. Minor Histocompatibility Antigens: from Transplantation Problems to Therapy of Cancer. *Hum Immunol.* Juni 2006;67(6):433–8.
6. Simpson E, Scott D, James E, Lombardi G, Cwynarski K, Dazzi F, u. a. Minor H antigens: genes and peptides. *Transpl Immunol.* August 2002;10(2–3):115–23.
7. Chong AS, Alegre M-L. The impact of infection and tissue damage in solid-organ transplantation. *Nat Rev Immunol.* 25. Mai 2012;12(6):459–71.
8. Fishman JA. Infection in Solid-Organ Transplant Recipients. *N Engl J Med.* 20. Dezember 2007;357(25):2601–14.
9. London NJ, Farmery SM, Will EJ, Davison AM, Lodge JP. Risk of neoplasia in renal transplant patients. *Lancet Lond Engl.* 12. August 1995;346(8972):403–6.
10. Euvrard S, Kanitakis J, Claudy A. Skin Cancers after Organ Transplantation. *N Engl J Med.* 24. April 2003;348(17):1681–91.
11. Stallone G, Schena A, Infante B, Di Paolo S, Loverre A, Maggio G, u. a. Sirolimus for Kaposi's Sarcoma in Renal-Transplant Recipients. *N Engl J Med.* 31. März 2005;352(13):1317–23.
12. Dantal J, Hourmant M, Cantarovich D, Giral M, Blancho G, Dreno B, u. a. Effect of long-term immunosuppression in kidney-graft recipients on cancer incidence: randomised comparison of two cyclosporin regimens. *The Lancet.* Februar 1998;351(9103):623–8.
13. Opelz G, Döhler B. Lymphomas after solid organ transplantation: a collaborative transplant study report. *Am J Transplant Off J Am Soc Transplant Am Soc Transpl Surg.* Februar 2004;4(2):222–30.
14. Swinnen LJ, Costanzo-Nordin MR, Fisher SG, O'Sullivan EJ, Johnson MR, Heroux AL, u. a. Increased Incidence of Lymphoproliferative Disorder after Immunosuppression with the Monoclonal Antibody OKT3 in Cardiac-Transplant Recipients. *N Engl J Med.* 20. Dezember 1990;323(25):1723–8.
15. Golshayan D, Pascual M. Minimization of calcineurin inhibitors to improve long-term outcomes in kidney transplantation. *Transpl Immunol.* November 2008;20(1-2):21–8.
16. Taylor AL, Watson CJE, Bradley JA. Immunosuppressive agents in solid organ

- transplantation: Mechanisms of action and therapeutic efficacy. *Crit Rev Oncol Hematol*. Oktober 2005;56(1):23–46.
17. Wijdicks E. Neurotoxicity of immunosuppressive drugs. *Liver Transpl*. November 2001;7(11):937–42.
  18. Alberú J, Pascoe MD, Campistol JM, Schena FP, Rial M del C, Polinsky M, u. a. Lower Malignancy Rates in Renal Allograft Recipients Converted to Sirolimus-Based, Calcineurin Inhibitor-Free Immunotherapy: 24-Month Results From the CONVERT Trial: Transplantation. August 2011;92(3):303–10.
  19. Schena FP, Pascoe MD, Alberu J, del Carmen Rial M, Oberbauer R, Brennan DC, u. a. Conversion From Calcineurin Inhibitors to Sirolimus Maintenance Therapy in Renal Allograft Recipients: 24-Month Efficacy and Safety Results From the CONVERT Trial: Transplantation. Januar 2009;87(2):233–42.
  20. Sollinger HW. Mycophenolates in transplantation. *Clin Transplant*. Oktober 2004;18(5):485–92.
  21. Caillard S, Moulin B, Buron F, Mariat C, Audard V, Grimbert P, u. a. Advagraf<sup>®</sup>, a once-daily prolonged release tacrolimus formulation, in kidney transplantation: literature review and guidelines from a panel of experts. *Transpl Int*. August 2016;29(8):860–9.
  22. Eggenhofer E, Popp FC, Mendicino M, Silber P, van't Hof W, Renner P, u. a. Heart Grafts Tolerized Through Third-Party Multipotent Adult Progenitor Cells Can Be Retransplanted to Secondary Hosts With No Immunosuppression. *Stem Cells Transl Med*. 1. August 2013;2(8):595–606.
  23. Casiraghi F, Perico N, Cortinovis M, Remuzzi G. Mesenchymal stromal cells in renal transplantation: opportunities and challenges. *Nat Rev Nephrol*. 8. Februar 2016;12(4):241–53.
  24. Massart A, Ghisdal L, Abramowicz M, Abramowicz D. Operational Tolerance in Kidney Transplantation and Associated Biomarkers: Serendipitous tolerance in kidney recipients. *Clin Exp Immunol* [Internet]. April 2017 [zitiert 7. Mai 2017]; Verfügbar unter: <http://doi.wiley.com/10.1111/cei.12981>
  25. Smith A. A glossary for stem-cell biology. *Nature*. 28. Juni 2006;441(7097):1060–1060.
  26. Morrison SJ, Kimble J. Asymmetric and symmetric stem-cell divisions in development and cancer. *Nature*. 28. Juni 2006;441(7097):1068–74.
  27. Weissman IL, Anderson DJ, Gage F. Stem and Progenitor Cells: Origins, Phenotypes, Lineage Commitments, and Transdifferentiations. *Annu Rev Cell Dev Biol*. November 2001;17(1):387–403.
  28. Qi SD, Smith PD, Choong PF. Nuclear reprogramming and induced pluripotent stem cells: a review for surgeons: iPSC for surgeons. *ANZ J Surg*. Juni 2014;84(6):E1–11.
  29. Hochedlinger K, Jaenisch R. Nuclear reprogramming and pluripotency. *Nature*. 28. Juni 2006;441(7097):1061–7.
  30. Costa Pereira W, Alsuhaibani O, Elyamany G, Al Abdulaaly A. A Novel Approach for the Enumeration of Peripheral Blood Stem Cells Suitable for Transplantation. *J Transplant*. 2014;2014:1–

7.

31. Bonnet D. Haematopoietic stem cells. *J Pathol.* Juli 2002;197(4):430–40.
32. Kawai T, Cosimi AB, Spitzer TR, Tolloff-Rubin N, Suthanthiran M, Saidman SL, u. a. HLA-Mismatched Renal Transplantation without Maintenance Immunosuppression. *N Engl J Med.* 24. Januar 2008;358(4):353–61.
33. Sachs DH, Kawai T, Sykes M. Induction of Tolerance through Mixed Chimerism. *Cold Spring Harb Perspect Med.* 1. Januar 2014;4(1):a015529.
34. Friedenstein AJ, Chailakhjan RK, Lalykina KS. The development of fibroblast colonies in monolayer cultures of guinea-pig bone marrow and spleen cells. *Cell Tissue Kinet.* Oktober 1970;3(4):393–403.
35. Beane OS, Fonseca VC, Cooper LL, Koren G, Darling EM. Impact of Aging on the Regenerative Properties of Bone Marrow-, Muscle-, and Adipose-Derived Mesenchymal Stem/Stromal Cells. Shi X-M, Herausgeber. *PLoS ONE.* 26. Dezember 2014;9(12):e115963.
36. Gronthos S, Brahim J, Li W, Fisher LW, Cherman N, Boyde A, u. a. Stem Cell Properties of Human Dental Pulp Stem Cells. *J Dent Res.* August 2002;81(8):531–5.
37. da Silva Meirelles L. Mesenchymal stem cells reside in virtually all post-natal organs and tissues. *J Cell Sci.* 9. Mai 2006;119(11):2204–13.
38. Hung C-N, Mar K, Chang H-C, Chiang Y-L, Hu H-Y, Lai C-C, u. a. A comparison between adipose tissue and dental pulp as sources of MSCs for tooth regeneration. *Biomaterials.* Oktober 2011;32(29):6995–7005.
39. Li C, Wu X, Tong J, Yang X, Zhao J, Zheng Q, u. a. Comparative analysis of human mesenchymal stem cells from bone marrow and adipose tissue under xeno-free conditions for cell therapy. *Stem Cell Res Ther [Internet].* Dezember 2015 [zitiert 14. Mai 2017];6(1). Verfügbar unter: <http://stemcellres.com/content/6/1/55>
40. Conget PA, Minguell JJ. Phenotypical and functional properties of human bone marrow mesenchymal progenitor cells. *J Cell Physiol.* Oktober 1999;181(1):67–73.
41. Calloni R, Cordero EAA, Henriques JAP, Bonatto D. Reviewing and Updating the Major Molecular Markers for Stem Cells. *Stem Cells Dev.* Mai 2013;22(9):1455–76.
42. Gronthos S. Molecular and cellular characterisation of highly purified stromal stem cells derived from human bone marrow. *J Cell Sci.* 1. Mai 2003;116(9):1827–35.
43. Majumdar MK, Thiede MA, Haynesworth SE, Bruder SP, Gerson SL. Human Marrow-Derived Mesenchymal Stem Cells (MSCs) Express Hematopoietic Cytokines and Support Long-Term Hematopoiesis When Differentiated Toward Stromal and Osteogenic Lineages. *J Hematother Stem Cell Res.* Dezember 2000;9(6):841–8.
44. Pittenger MF. Multilineage Potential of Adult Human Mesenchymal Stem Cells. *Science.* 2. April 1999;284(5411):143–7.
45. Muraglia A, Cancedda R, Quarto R. Clonal mesenchymal progenitors from human bone marrow differentiate in vitro according to a hierarchical model. *J Cell Sci.* April 2000;113 ( Pt

7):1161–6.

46. Dominici M, Le Blanc K, Mueller I, Slaper-Cortenbach I, Marini F., Krause DS, u. a. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy*. 2006;8(4):315–7.
47. Horwitz EM, Le Blanc K, Dominici M, Mueller I, Slaper-Cortenbach I, Marini FC, u. a. Clarification of the nomenclature for MSC: The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy*. 2005;7(5):393–5.
48. Kim YS, Kwon OR, Choi YJ, Suh DS, Heo DB, Koh YG. Comparative Matched-Pair Analysis of the Injection Versus Implantation of Mesenchymal Stem Cells for Knee Osteoarthritis. *Am J Sports Med*. 1. November 2015;43(11):2738–46.
49. Stamm C, Westphal B, Kleine H-D, Petzsch M, Kittner C, Klinge H, u. a. Autologous bone-marrow stem-cell transplantation for myocardial regeneration. *The Lancet*. Januar 2003;361(9351):45–6.
50. Yang Z, Zhang F, Ma W, Chen B, Zhou F, Xu Z, u. a. A Novel Approach to Transplanting Bone Marrow Stem Cells to Repair Human Myocardial Infarction: Delivery via a Noninfarct-relative Artery: A Novel Approach to Transplanting Bone Marrow Stem Cells to Repair Human Myocardial Infarction. *Cardiovasc Ther*. Dezember 2010;28(6):380–5.
51. Kim S, Moon G, Chang W, Kim Y-H, Bang O, For the STARTING-2 (STem cell Application Researches and Trials In NeuroloGy-2) collaborators. Intravenous transplantation of mesenchymal stem cells preconditioned with early phase stroke serum: current evidence and study protocol for a randomized trial. *Trials*. 2013;14(1):317.
52. Le Blanc K, Rasmusson I, Sundberg B, Götherström C, Hassan M, Uzunel M, u. a. Treatment of severe acute graft-versus-host disease with third party haploidentical mesenchymal stem cells. *The Lancet*. Mai 2004;363(9419):1439–41.
53. Amorin B, Alegretti AP, Valim V, Pezzi A, Laureano AM, da Silva MAL, u. a. Mesenchymal stem cell therapy and acute graft-versus-host disease: a review. *Hum Cell*. Oktober 2014;27(4):137–50.
54. Majumdar MK, Keane-Moore M, Buyaner D, Hardy WB, Moorman MA, McIntosh KR, u. a. Characterization and functionality of cell surface molecules on human mesenchymal stem cells. *J Biomed Sci*. April 2003;10(2):228–41.
55. Popp FC, Renner P, Eggenhofer E, Slowik P, Geissler EK, Piso P, u. a. Mesenchymal stem cells as immunomodulators after liver transplantation. *Liver Transpl*. 1. Oktober 2009;15(10):1192–8.
56. Aggarwal S. Human mesenchymal stem cells modulate allogeneic immune cell responses. *Blood*. 15. Februar 2005;105(4):1815–22.
57. Meisel R. Human bone marrow stromal cells inhibit allogeneic T-cell responses by indoleamine 2,3-dioxygenase-mediated tryptophan degradation. *Blood*. 12. Februar 2004;103(12):4619–21.
58. Castro-Manrreza ME, Montesinos JJ. Immunoregulation by Mesenchymal Stem Cells: Biological Aspects and Clinical Applications. *J Immunol Res*. 2015;2015:1–20.

59. Xu G, Zhang L, Ren G, Yuan Z, Zhang Y, Zhao RC, u. a. Immunosuppressive properties of cloned bone marrow mesenchymal stem cells. *Cell Res* [Internet]. 27. Februar 2007 [zitiert 22. November 2016]; Verfügbar unter: <http://www.nature.com/doi/10.1038/cr.2007.4>
60. Sudres M, Norol F, Trenado A, Gregoire S, Charlotte F, Levacher B, u. a. Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells Suppress Lymphocyte Proliferation In Vitro but Fail to Prevent Graft-versus-Host Disease in Mice. *J Immunol*. 15. Juni 2006;176(12):7761–7.
61. Augello A, Tasso R, Negrini S, Amateis A, Indiveri F, Cancedda R, u. a. Bone marrow mesenchymal progenitor cells inhibit lymphocyte proliferation by activation of the programmed death 1 pathway. *Eur J Immunol*. Mai 2005;35(5):1482–90.
62. Bartholomew A, Sturgeon C, Siatskas M, Ferrer K, McIntosh K, Patil S, u. a. Mesenchymal stem cells suppress lymphocyte proliferation in vitro and prolong skin graft survival in vivo. *Exp Hematol*. Januar 2002;30(1):42–8.
63. Popp FC, Eggenhofer E, Renner P, Slowik P, Lang SA, Kaspar H, u. a. Mesenchymal stem cells can induce long-term acceptance of solid organ allografts in synergy with low-dose mycophenolate. *Transpl Immunol*. November 2008;20(1–2):55–60.
64. Eggenhofer E, Steinmann JF, Renner P, Slowik P, Piso P, Geissler EK, u. a. Mesenchymal stem cells together with mycophenolate mofetil inhibit antigen presenting cell and T cell infiltration into allogeneic heart grafts. *Transpl Immunol*. April 2011;24(3):157–63.
65. Buron F, Perrin H, Malcus C, Héquet O, Thauinat O, Kholopp-Sarda M-N, u. a. Human Mesenchymal Stem Cells and Immunosuppressive Drug Interactions in Allogeneic Responses: An In Vitro Study Using Human Cells. *Transplant Proc*. Oktober 2009;41(8):3347–52.
66. Inoue S, Popp FC, Koehl GE, Piso P, Schlitt HJ, Geissler EK, u. a. Immunomodulatory Effects of Mesenchymal Stem Cells in a Rat Organ Transplant Model: Transplantation. Juni 2006;81(11):1589–95.
67. Ren G, Zhang L, Zhao X, Xu G, Zhang Y, Roberts AI, u. a. Mesenchymal Stem Cell-Mediated Immunosuppression Occurs via Concerted Action of Chemokines and Nitric Oxide. *Cell Stem Cell*. Februar 2008;2(2):141–50.
68. Parish CR. Fluorescent dyes for lymphocyte migration and proliferation studies. *Immunol Cell Biol*. Dezember 1999;77(6):499–508.
69. Tropel P, Noël D, Platet N, Legrand P, Benabid A-L, Berger F. Isolation and characterisation of mesenchymal stem cells from adult mouse bone marrow. *Exp Cell Res*. Mai 2004;295(2):395–406.
70. Fachinformation Roche Registration Limited CellCept® 500mg, Lyophilisat zur Herstellung einer Infusionslösung.
71. Staatz CE, Tett SE. Clinical Pharmacokinetics and Pharmacodynamics of Mycophenolate in Solid Organ Transplant Recipients: *Clin Pharmacokinet*. 2007;46(1):13–58.
72. Fachinformation Novartis Pharma Sandimmun 50mg/ml Konzentrat zur Herstellung einer Infusionslösung.
73. Ptachcinski RJ, Venkataramanan R, Burckart GJ. Clinical Pharmacokinetics of Cyclosporin: *Clin Pharmacokinet*. 1986;11(2):107–32.

74. Fachinformation Pfizer Ag Rapamune, Orale Lösung 1mg/ml.
75. Sehgal S. Sirolimus: its discovery, biological properties, and mechanism of action. *Transplant Proc.* Mai 2003;35(3):S7–14.
76. Eggenhofer E, Renner P, Soeder Y, Popp FC, Hoogduijn MJ, Geissler EK, u. a. Features of synergism between mesenchymal stem cells and immunosuppressive drugs in a murine heart transplantation model. *Transpl Immunol.* September 2011;25(2-3):141–7.
77. Hoogduijn MJ, Crop MJ, Korevaar SS, Peeters AMA, Eijken M, Maat LPWM, u. a. Susceptibility of Human Mesenchymal Stem Cells to Tacrolimus, Mycophenolic Acid, and Rapamycin: Transplantation. November 2008;86(9):1283–91.
78. Rus V, Svetic A, Nguyen P, Gause WC, Via CS. Kinetics of Th1 and Th2 cytokine production during the early course of acute and chronic murine graft-versus-host disease. Regulatory role of donor CD8+ T cells. *J Immunol Baltim Md 1950.* 1. September 1995;155(5):2396–406.
79. Pulaiev R, Puliaeva I, Ryan A, Via C. The Parent-into-F1 Model of Graft-vs-Host Disease as a Model of In Vivo T Cell Function and Immunomodulation. *Curr Med Chem-Immunol Endocr Metab Agents.* 1. Dezember 2005;5(6):575–83.
80. Murphy K, Travers P, Walport M, Janeway C. *Janeway's immunobiology.* 7th ed. New York: Garland Science; 2008. 887 S.
81. Shearer GM, Levy RB. Graft-vs.-host-associated immune suppression is activated by recognition of allogeneic murine I-A antigens. *J Exp Med.* 1. März 1983;157(3):936–46.
82. Schoenberger SP, Toes RE, van der Voort EI, Offringa R, Melief CJ. T-cell help for cytotoxic T lymphocytes is mediated by CD40-CD40L interactions. *Nature.* 4. Juni 1998;393(6684):480–3.
83. Eliopoulos N. Allogeneic marrow stromal cells are immune rejected by MHC class I- and class II-mismatched recipient mice. *Blood.* 15. Dezember 2005;106(13):4057–65.
84. Nauta AJ. Donor-derived mesenchymal stem cells are immunogenic in an allogeneic host and stimulate donor graft rejection in a nonmyeloablative setting. *Blood.* 15. September 2006;108(6):2114–20.
85. Obermajer N, Popp FC, Soeder Y, Haarer J, Geissler EK, Schlitt HJ, u. a. Conversion of Th17 into IL-17A<sup>neg</sup> Regulatory T Cells: A Novel Mechanism in Prolonged Allograft Survival Promoted by Mesenchymal Stem Cell-Supported Minimized Immunosuppressive Therapy. *J Immunol.* 15. November 2014;193(10):4988–99.

## 7 Lebenslauf

Nachname: Soeder  
Vornamen: Yorick Sven Magnus  
Eltern: Sylvia Soeder, geb. Bachmann  
Götz Soeder  
Geburtsdatum: 24.08.1983  
Geburtsort: Gießen  
Familienstand: ledig



### Ausbildung & beruflicher Werdegang:

1994 – 2003 Georg-Büchner-Gymnasium Rheinfelden, Abschluss: Abitur  
2005 – 2012 Studium der Humanmedizin, Universität Regensburg  
seit 2008 Doktorarbeit Klinik für Chirurgie, Universitätsklinikum Regensburg  
seit 2012 Arzt in Weiterbildung, Klinik und Poliklinik für Chirurgie,  
Universitätsklinikum Regensburg

## **8 Eidesstattliche Erklärung**

Ich erkläre hiermit, dass ich die vorliegende Arbeit ohne unzulässige Hilfe Dritter und ohne Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe. Die aus anderen Quellen direkt oder indirekt übernommenen Daten und Konzepte sind unter Angabe der Quelle gekennzeichnet. Insbesondere habe ich nicht die entgeltliche Hilfe von Vermittlungs- bzw. Beratungsdiensten (Promotionsberater oder andere Personen) in Anspruch genommen.

Niemand hat von mir unmittelbar oder mittelbar geldwerte Leistungen für Arbeit erhalten, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen.

Die Arbeit wurde bisher weder im In- noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde vorgelegt.

Regensburg, Juli 2017

## 9 Danksagung

Mein Dank gilt in erster Linie Herrn Prof. Dr. med Marc-H. Dahlke, PhD, stellvertretender Direktor der Klinik für Chirurgie der Universitätsklinik Regensburg, Frau PD Dr. rer. nat. Elke Eggenhofer-Kraus wissenschaftliche Mitarbeiterin der Klinik für Chirurgie und Herrn Dr. med Philipp Renner, Funktionsoberarzt der Klinik für Chirurgie für die ausgezeichnete wissenschaftliche Betreuung und ihr stetes Engagement während der Durchführung dieser Doktorarbeit. Die besondere Atmosphäre und der freundschaftliche Umgang in dieser Arbeitsgruppe waren eine ständige Quelle der Motivation und Inspiration.

Ich danke an dieser Stelle auch Herrn Prof. Dr. med. Hans-Jürgen Schlitt, Ordinarius der Klinik und Poliklinik für Chirurgie der Universitätsklinik Regensburg und Prof. Edward K. Geissler, Leiter der experimentellen Chirurgie für die Bereitstellung aller labortechnischen Möglichkeiten und die Schaffung einer Arbeitsatmosphäre, die diese Forschungsarbeit ermöglicht hat.

Frau Irina Kucuk, MTA in der experimentellen Chirurgie möchte ich ferner für die Hilfe bei der Einarbeitung, Ihren immerwährenden technischen Beistand und jede Menge Arbeit im Hintergrund danken.

Dank gebührt außerdem meinen Eltern Sylvia und Götz Soeder, meinen Geschwistern Til, Laura, Joshua und Doreen für ihren andauernden moralischen Beistand, sowie meiner Lebensgefährtin Dr. med Franziska Huckauf, die ebenfalls eine Motivationsquelle, insbesondere in den Tagen der Ausarbeitung dieser Schrift war.