

AUS DER FAKULTÄT FÜR MEDIZIN
DER UNIVERSITÄT REGENSBURG
PROF. DR. MARC-H. DAHLKE
CHIRURGIE

**Der immunmodulatorische Effekt von hitzeinaktivierten
mesenchymalen Stammzellen im murinen
Herztransplantationsmodell**

Inaugural – Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin

der
Fakultät für Medizin
der Universität Regensburg

vorgelegt von
Elisabeth Geißler

2021

AUS DER FAKULTÄT FÜR MEDIZIN
DER UNIVERSITÄT REGENSBURG
PROF. DR. MARC-H. DAHLKE
CHIRURGIE

**Der immunmodulatorische Effekt von hitzeinaktivierten
mesenchymalen Stammzellen im murinen
Herztransplantationsmodell**

Inaugural – Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin

der
Fakultät für Medizin
der Universität Regensburg

vorgelegt von
Elisabeth Geißler

2021

Dekan: Prof. Dr. Dirk Hellwig

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

2. Berichterstatter: Prof. Dr. Bernhard Unsöld

Tag der mündlichen Prüfung: 29.10.2021

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	5
1.1	Mesenchymale Stammzellen	7
1.2	Therapeutischer Einsatz von MSC.....	7
1.3	MSC in der Organtransplantation.....	10
1.4	Immunmodulatorische Wirkung von MSC	11
1.5	Fragestellung	13
2	Material und Methoden	14
2.1	Gewinnung von MSC aus Fettgewebe.....	14
2.2	Kryokonservierung	14
2.3	Kultivierung und Differenzierung von MSC	15
2.4	MTT-Assay.....	17
2.5	Mixed Lymphocyte Reaction	17
2.6	Durchflusszytometrie	18
2.7	Isolation von Knochenmarkszellen.....	19
2.8	Kultivierung von Monozyten aus dem Knochenmark	19
2.9	Monozyten Co-Kultur	20
2.10	TNF α -ELISA.....	20
2.11	Tiere und Tierhaltung.....	21
2.12	Tiermodell und Gruppendesign.....	21
2.13	MSC-Injektion	22
2.14	Herztransplantation.....	22
2.15	T-Zell Färbung abgestoßener Herztransplantate	24
2.16	Statistische Auswertung.....	24
3	Ergebnisse	25
3.1	Metabolische Aktivität und Vitalität von HI-MSC	25
3.2	Oberflächenmarkerprofil von HI-MSC	27
3.3	Keine Inhibition der T-Zell-Proliferation durch HI-MSC in der MLR.....	28
3.4	HI-MSC hemmen TNF α -Produktion durch LPS-stimulierte Monozyten	29
3.5	Kein verlängertes Überleben durch HI-MSC im HTx-Modell.....	29
4	Diskussion.....	32
4.1	Ausblick.....	40
5	Zusammenfassung.....	43

6	Anhang.....	44
6.1	Abkürzungsverzeichnis	44
6.2	Verbrauchsmaterialien	46
6.3	Chemikalien und Reagenzien	47
6.4	Antikörper.....	49
6.5	Instrumente und sonstige Materialien	49
6.6	Geräte.....	50
6.7	Programme	50
6.8	Abbildungen.....	51
	Erklärung.....	53
	Literaturverzeichnis.....	54
	Abbildungsverzeichnis.....	68
	Danksagung	
	Lebenslauf	

1 Einleitung

Die Möglichkeit zur Transplantation von Organen stellt einen der bedeutendsten Fortschritte der Medizin des vergangenen Jahrhunderts dar. 1954 fand die erste erfolgreiche Lebendorganspende, eine Nierentransplantation zwischen eineiigen Zwillingenbrüdern, statt. 1962 folgte die erste erfolgreiche postmortale Spende einer Niere, 1963 die erste Lebertransplantation und 1967 die erste erfolgreiche Herztransplantation.[1] Zu den am häufigsten transplantierten soliden Organen zählen heutzutage Herz, Leber, Niere und Lunge [2].

Der operative Eingriff selbst steht erst am Beginn eines aufwändigen und langwierigen Therapieregimes. Eine erfolgreiche allogene Organtransplantation erfordert eine lebenslange medikamentöse immunsuppressive Therapie, da es eine potenziell lebensbedrohliche Transplantatabstoßung zu verhindern gilt. Die dabei verwendeten Wirkstoffe bergen jedoch eine Reihe gravierender Nebenwirkungen, wie etwa die Entstehung von opportunistischen Infektionen, Diabetes mellitus, Dyslipidämie, Niereninsuffizienz und kardiovaskulären Komplikationen [3]. Häufig verwendete Substanzen sind Calcineurin-Inhibitoren wie Ciclosporin A oder Tacrolimus, die vor allem durch ihre nephrotoxische Wirkung zu Problemen führen können [4]. Glucocorticoide (z.B. Methylprednisolon) verursachen Elektrolytstörungen, Knochenatrophien und -nekrosen, Myopathien und Muskelatrophien und haben darüber hinaus eine diabetogene Wirkung. Zytostatika können im Falle des Purin-Analogons Azathioprin myelosuppressiv wirken, als auch Pankreatitiden und Hepatitiden verursachen. Der Folsäure-Antagonist Methotrexat kann zu Myelosuppression und Mukositis führen und ist darüber hinaus hepatotoxisch und nephrotoxisch. Das Alkylans Cyclophosphamid kann hämorrhagische Zystitiden und Urothelkarzinome verursachen.[5]

Medikamentös immunsupprimierte Transplantationspatienten haben des Weiteren ein nachweislich erhöhtes Risiko *de novo* eine Tumorerkrankung zu entwickeln [6][3]. Nach Nierentransplantation etwa zeigte sich bei immunsupprimierten Patienten ein 4,3-fach erhöhtes Krebsrisiko. Diese Tumore manifestierten sich vorrangig als Karzinome der Haut, Niere, Pharynx, Larynx und Mundhöhle.[7] Nach Lebertransplantation ist die Gefahr für die Entstehung von lymphoproliferativen Erkrankungen, Hautmalignomen, sowie Krebserkrankungen der oberen Atemwege und des Darmes erhöht [8].

Diese Vielzahl an unerwünschten Arzneimittelwirkungen und damit einhergehenden Komplikationen ist zurzeit jedoch ein unumgängliches Risiko, das von Seiten der

Behandler und Patienten in Kauf genommen werden muss, um einen langfristigen Operationserfolg zu erzielen und bestmögliche Organfunktionen zu gewährleisten. Umso wünschenswerter wäre es daher, wenn schonendere Alternativen angeboten werden könnten, um nicht zuletzt die Patientencompliance zu verbessern und somit das Transplantatüberleben zu verlängern. Eine schonendere Immunsuppression ermöglicht es zudem, den transplantierten Patienten eine höhere Lebensqualität bieten zu können.

Einen potenziellen Ansatzpunkt für eine schonendere Immunsuppression stellen hierbei die in dieser Arbeit thematisierten immunmodulatorischen Effekte von mesenchymalen Stammzellen (MSC) dar. Diesen Zellen konnten Effekte im Sinne einer Inhibition von B- und T-Zellen nachgewiesen werden [9].

Des Weiteren besitzen MSC eine regenerative Wirkung auf den Organismus und sind zur Differenzierung in verschiedene Gewebe fähig. Dies umfasst die Fähigkeit zur Differenzierung in mesodermale Gewebe wie Fett, Knorpel, Knochen, glatte und quergestreifte Muskulatur, sowie die supportive Wirkung von MSC auf die Hämatopoese [10–14]. Des Weiteren konnte ein Differenzierungspotenzial zu Geweben ektodermalen Ursprungs, darunter Epithelzellen und neuronale Zellen [15, 16], festgestellt werden. Da auch die Fähigkeit zur Differenzierung in Hepatozyten und Inselzellen, also Gewebe endodermalen Ursprungs, nachgewiesen werden konnte [17, 18], sind MSC demnach zur Differenzierung in Zelllinien aller drei Keimblätter fähig.

Darüber hinaus weisen MSC antiinflammatorische Eigenschaften auf. Dies konnte durch den Nachweis der Fähigkeit von MSC zur Regulation von Makrophagen gezeigt werden. Es erfolgt eine Veränderung des Expressionsmusters der Makrophagen zugunsten immunsuppressiver Zytokine mit verminderter Freisetzung von pro-inflammatorischen Mediatoren, wodurch eine Antiinflammation hervorgerufen werden kann. [19–21]

Aufgrund dieser immunmodulatorischen Eigenschaften stellen MSC eine vielversprechende Alternative bzw. Ergänzung zu herkömmlich genutzten Immunsuppressiva in der Organtransplantation dar. Es besteht die Hoffnung, mithilfe von MSC die Dosen an herkömmlichen Immunsuppressiva reduzieren zu können, um so die durch Organtoxizität verursachten Langzeitschäden zu reduzieren.

1.1 Mesenchymale Stammzellen

In den 1960ern gelang Friedenstein et al. die Erstbeschreibung von MSC durch Isolation und Charakterisierung von Osteoprogenitorzellen aus dem Knochenmark von Ratten [22, 23]. Das heutige Verständnis von MSC wurde 1991 durch die Beobachtungen von Caplan, dass MSC nach heterotoper Transplantation *de novo* zur Bildung von ektopem Knochenmark und Knochen fähig sind, geprägt [24]. Im Jahr 2002 wurde das immunmodulatorische Potenzial von MSC anhand deren antiproliferativer Wirkung auf Lymphozyten erstmals beschrieben [25]. Batten et al. gelang es schließlich 2006 die immunmodulatorischen Effekte von MSC näher zu charakterisieren [21].

MSC sind aufgrund ihrer relativ einfachen Gewinnung und Kultivierung eine attraktive Therapieoption [26]. Sie sind sehr proliferativ und stellen in der Embryonalentwicklung als pluripotente Progenitorzellen die Vorläufer der späteren Bindegewebszellen wie Adipo-, Chondro- und Osteoblasten/-zyten dar. Beim Erwachsenen sind sie verantwortlich für Gewebsumbau und -reparatur. Determinierend für die Ausbildung des endgültigen Phänotyps ist das Zusammenwirken extrinsischer (parakrine Regulation durch Gewebshormone und Zytokine) und intrinsischer (genetische Prädisposition, autokrine Regulation) Faktoren, die auf die Zellen einwirken und so deren Differenzierung kontrollieren.[27] Hoogduijn et al. konnten nachweisen, dass sich MSC unabhängig von ihrem Ursprungsgewebe hinsichtlich ihrer immunologischen Eigenschaften, der immunsuppressiven Wirkung *in vitro* sowie ihrem Differenzierungspotenzial zum Großteil entsprechen [28].

MSC konnten jedoch auch tumorigene Eigenschaften nachgewiesen werden. Im Tiermodell förderten MSC die Entstehung und das Wachstum von Tumoren und führten zu einer gesteigerten Metastasierungsrate [29–32].

1.2 Therapeutischer Einsatz von MSC

Caplan beschrieb bereits 1991 den potenziellen zukünftigen therapeutischen Einsatz von MSC zu Zwecken der Gewebsregeneration [27]. Bislang konnte das gewebsregenerative Potenzial von MSC vor allem durch ihre Fähigkeit zur Regeneration von Knorpel- und Knochengewebe nachgewiesen werden [33–36]. Im Jahr 2000 erfolgten erste erfolgreiche Versuche mit autologen MSC zu therapeutischen Zwecken. Nach

Knochenmarkstransplantation in Folge myeloablativer Verfahren konnte dabei ein positiver Effekt von MSC auf die Hämatopoese beobachtet werden.[37, 38]

Darüber hinaus bewirkten MSC einen geringeren Ischämieschaden des Herzmuskels nach Infarkt und verbesserten dessen Leistung [39, 40]. MSC konnten des Weiteren in Mausversuchen die Überlebensrate und Organfunktionen bei Sepsis nach Caecumligatur und -punktion (CLP) signifikant erhöhen [41]. Bei M. Crohn bewirkten MSC eine Re-Epithelialisierung der betroffenen Darmabschnitte nach Entzündung und Ulzeration [42]. Systemisch infundierte MSC führten bei Versuchen an Mäusen zur FAS-Ligand vermittelten Apoptose von T-Zellen und im Zuge dessen zu einem günstigeren Verlauf bei systemischer Sklerose und experimenteller Colitis [43]. MSC stellen zudem aufgrund ihres antiinflammatorischen und antifibrotischen Effektes eine Therapieoption bei chronischer Nierenerkrankung dar [44].

Es ist jedoch schwer zu beurteilen, welche molekularen bzw. biochemischen Mechanismen durch MSC *in vivo* kommuniziert werden, da diese stark vom Ort an dem sie akkumulieren, abhängig zu sein scheinen [45]. Dabei muss zwischen endogenen und exogenen MSC unterschieden werden. Da MSC in nahezu allen Geweben und Organen vorkommen [46], scheint eine Wanderung von endogenen MSC durch das Gewebe hin zum Ort des Geschehens der Entzündung bzw. Schädigung als naheliegend [47]. Auch exogene MSC zeigten sich nach direkter Transplantation ins Gewebe über bis zu vier Monate hinweg als überlebensfähig [48]. Im Blut zirkulierende endogene MSC konnten weder bei Patienten mit Nieren- bzw. Leberversagen noch bei Patienten mit akuter Abstoßungsreaktion nach Herztransplantation gefunden werden [49]. Es konnte gezeigt werden, dass exogene MSC nach i.v.-Gabe in der Lunge akkumulieren, da sie dort das Kapillarnetz nicht passieren können [50] und später hauptsächlich in Leber und Milz detektierbar sind [51]. In der Migration der MSC zu gesunden im Vergleich zu pathologisch veränderten Geweben konnte kein Unterschied nachgewiesen werden [52, 53]. Daher erscheint es plausibel, dass MSC ihre immunmodulatorische Wirkung hauptsächlich durch systemische Effekte entfalten.

Tabelle 1: Effekte von MSC in präklinischen Krankheitsmodellen nach Uccelli et al; modifiziert aus [54]

Krankheit	Spezies	Zielorgan	MSC-Effekt	Verabreichungsweg
Co-Transplantation mit humanen HSCs	Schaf	Hämatopoetische Organe	Unterstützung der Akzeptanz, gesteigerte Hämatopoese	systemisch
Myokardinfarkt	Maus	Herz	Produktion neuer Myozyten und Gefäße	lokal

Hauttransplantatabstoßung	Affe	Haut	Inhibition von T-Zellen	systemisch
Schlaganfall	Ratte	ZNS	Freisetzung trophischer Faktoren, Induktion der Neurogenese	systemisch
Melanom	Maus	Haut	Inhibition von Tumor-spezifischen T-Zellen durch CD8 ⁺ -Zellen	lokal
Akutes Nierenversagen	Ratte	Niere	Inhibition von proinflammatorischen Zytokinen und Induktion von anti-apoptotischen und trophischen Faktoren	systemisch
Diabetes mellitus	Maus	Pankreas und Glomeruli	Induktion von lokalen Progenitorzellen und Inhibition der Makrophageninfiltration	systemisch
Rheumatoide Arthritis	Maus	Gelenke	Inhibition von T-Zellen und der Produktion von proinflammatorischen Zytokinen; Induktion von T _{reg}	systemisch
Retinadegeneration	Ratte	Auge	Verminderte Retinadegeneration durch anti-apoptotische und trophische Moleküle	lokal
Akutes Lungenversagen	Maus	Lunge	Inhibition von proinflammatorischen Zytokinen	systemisch
Akutes Lungenversagen	Maus	Lunge	Inhibition von proinflammatorischen Zytokinen und gesteigerte Produktion von IL-10	lokal
Akutes Nierenversagen	Maus	Niere	Tubuluszellregeneration durch IGF1-Sekretion	systemisch
Myokardinfarkt	Ratte	Herz	Anti-apoptotischer und mitogener Effekt durch WNT-abhängiges Molekül SFRP2	lokal
Leberversagen	Ratte	Leber	Inhibition der Leukozyteninvasion durch Freisetzung von Zytokinen und Chemokinen	MSC-haltiges Medium
Diabetes mellitus	Maus	Pankreas	Induktion von lokalen Progenitorzellen und Inhibition von β -Zell-spezifischen T-Zellen	systemisch
Experimentelle Autoimmunenzephalomyelitis	Maus	ZNS	Inhibition Myelin-spezifischer T-Zellen und Induktion peripherer Toleranz	systemisch
Experimentelle Autoimmunenzephalomyelitis	Maus	ZNS	Inhibition der Produktion Myelin-spezifischer Antikörper und enzephalitogener T-Zellen; verminderter Axonverlust	systemisch

Tabelle 2: Effekte von MSC in klinischen Studien laut Squillaro et al. [55]

Krankheit	Zielorgan	MSC-Effekt	Verabreichungsweg
Akute Myeloische Leukämie	Knochenmark	Verhinderung von GvHD, Remission, Regeneration von Erythro-, Thrombo- und Leukopoese	systemisch
Akute GvHD	Knochenmark	Gesteigerte Hämatopoese, schnellere Erholung des Knochenmarks nach Chemo- und Radiotherapie	systemisch
Diabetes mellitus	Pankreas	Förderung der Inselzellrevaskularisation nach Transplantation	Co-Transplantation mit Inselzellen
Leberfibrose /-zirrhose, akut-auf-chronisches Leberversagen	Leber	Verbesserung der Organfunktion, reduzierter MELD-Score	systemisch
Akutes Nierenversagen	Niere	Verhindert postoperatives Nierenversagen nach Herzoperationen; verkürzte Hospitalisierungszeiten	systemisch
Acute respiratory distress syndrome; idiopathische Lungenfibrose	Lunge	Erhalt und Wiederherstellung von pulmonalem Endothel; Entzündungshemmung	systemisch
Myokardinfarktnarbe	Herz	Regeneration von geschädigten Kardiomyozyten	systemisch
Akuter Myokardinfarkt	Herz	Signifikanter Rückgang an hypo-, a- und dyskinetischen	intrakoronar

		Myokardsegmenten; verbesserte linksventrikuläre Ejektion	
Osteogenesis Imperfecta	Knochen	Osteoblastenproliferation, Verbesserung der Knochenstruktur	Knochenmark- und MSC-Transplantation
Arthrose	Gelenke	Knorpelregeneration, Degenerationsstopp	intraartikulär
Multiple Sklerose	ZNS	Inflammationshemmung, Unterdrückung von Demyelinisierung und axonalen Schäden	systemisch
Amyotrophe Lateralsklerose	ZNS	Stabilisierung des Zustandes	intrathekal, systemisch
Rückenmarksverletzungen	ZNS	Sensibilitätsverbesserung	systemisch
Morbus Crohn	Verdauungstrakt	Verbesserter Aktivitätsindex, Fistelausheilung	systemisch, intramural bzw. intraluminal bei Fisteln

1.3 MSC in der Organtransplantation

Autologe MSC führen nach Allotransplantation zu einer systemischen Immunsuppression [56]. Im Rahmen der Therapie einer schweren Graft-versus-Host-Disease (GvHD) zeigten sich MSC unabhängig von ihrer Herkunft als effektive Behandlung [57]. Die Quelle der MSC ist jedoch abhängig vom Transplantatgewebe zu wählen, da hier Unterschiede im Effekt der MSC ausgemacht werden konnten. So konnten beispielsweise MSC von Third-party-Spendern eine Abstoßung nach Korneatransplantation verhindern und förderten die Akzeptanz nach Nabelschnurbluttransfusion [58, 59]. Im Ratten-Herztransplantationsmodell hatten MSC von Third-party-Spendern keinen Effekt auf das Transplantatüberleben, jedoch konnten sowohl vom Spender als auch vom Empfänger stammende MSC die Transplantatabstoßung abschwächen [60, 61].

Bartholomew et al. konnten 2002 erstmals die abstoßungsverzögernde Wirkung von MSC anhand des längeren Überlebens eines Hauttransplantates bei Pavianen nachweisen. Dazu erfolgte die einmalige i.v.-Applikation von Spender-MSK, wodurch eine signifikante Verzögerung der Transplantatabstoßung erzielt werden konnte.[25]

Zhou et al. konnten 2006 ein deutlich längeres Überleben bei herztransplantierten Ratten nach der Gabe von Spender-MSK im Vergleich zur Kontrollgruppe beobachten. Verantwortlich gemacht wurde dafür die MSC-vermittelte Unterdrückung der allogenen T-Zell Antwort und eine Veränderung der Th₁/Th₂-Balance.[61]

Des Weiteren gibt es Anhaltspunkte MSC würden auch bei Nierentransplantationen die Toleranzentwicklung durch ihre immunmodulatorische Aktivität positiv beeinflussen [62]. Autologe MSC nach allogener Nierentransplantation zeigten erhebliche Vorteile gegenüber einer Induktionstherapie mit anti-IL-2 Rezeptor-Antikörpern, wie zum

Beispiel eine Verminderung von Abstoßungsreaktionen und opportunistischen Infektionen, sowie eine verbesserte eGFR nach einem Jahr [63]. Auch Ge et al. beobachteten einen immunsuppressiven Effekt von MSC im Nierentransplantationsmodell und berichteten sowohl von einer relativen Zunahme von Th₂-Zellen und dem daraus resultierenden Anstieg von antiinflammatorischem IL-4 und IL-10, als auch eine T_{reg}- und damit Indolamin-2,3-Dioxygenase (IDO)-abhängige Toleranzentwicklung [64]. Die Verabreichung der MSC in diesen Versuchen erfolgte jeweils nach der Transplantation. Die Vorbehandlung von Mäusen mit Spender-MSK vor Nierentransplantationen hingegen führte zu Organschäden und erhöhten Kreatininwerten zum Zeitpunkt der Abstoßung im Vergleich zur Kontrollgruppe mit PBS [65]. Perico et al. konnten ein temporäres Nierenversagen bei MSC-Infusion nach Transplantation beobachten [66].

1.4 Immunmodulatorische Wirkung von MSC

MSC sind in der Lage mit diversen Zellen des Immunsystems zu interagieren und auf diese Weise ihr immunmodulatorisches Potenzial hinsichtlich antiinflammatorischer, antiproliferativer und immunsuppressiver Wirkung zu entfalten.

Aggarwal et al. gelang es nachzuweisen, dass MSC durch die Inhibition von Tumornekrosefaktor α (TNF α) und Interferon γ (IFN γ) zur Hemmung von zwei der wichtigsten proinflammatorischen Zytokine fähig sind [19]. Maßgeblich dafür scheint u.a. die PGE₂-Expression der MSC zu sein, die zudem für die MSC-vermittelte Hochregulation von IL-10 und IL-4 verantwortlich ist [19, 41, 67]. Die von MSC sezernierten Zytokine bewirken weiters eine Verschiebung der Makrophagendifferenzierung von einem proinflammatorischen M1-Phänotyp zu einem antiinflammatorischen M2-Phänotyp [68]. Die antiinflammatorische Wirkung der MSC beruht zudem auf einer Induktion der Zytokinverschiebung von einer proinflammatorischen Th₁/Th₁₇-Zellantwort zu einer antiinflammatorischen Th₂-Zellantwort [69, 70].

MSC weisen abhängig von Mitogenen, Antikörpern und Alloantigenen einen antiproliferativen Effekt auf Lymphozyten auf, wofür lösliche und zelluläre Faktoren verantwortlich gemacht werden [45]. MSC unterdrücken *in vitro* die Lymphozytenproliferation [25], wodurch eine Immunantwort bereits in ihrer Entstehung abgeschwächt wird [45]. Es konnte beobachtet werden, dass MSC in Kombination mit Antigen-

präsentierenden Zellen die T-Zell-Antwort inhibieren [71]. Verantwortlich für die Inhibition der T-Zell-Antwort wird die u.a. von MSC exprimierteIDO bzw. induzierbare Nitrit Oxid Synthase (iNOS) gemacht [72–74]. Humane und murine MSC weisen hier ein unterschiedliches Verhaltensmuster auf, da dieIDO hauptsächlich in humanen MSC aktiv ist, die iNOS jedoch das entscheidende Enzym im Organismus der Maus zu sein scheint [75]. Die Aktivierung der MSC durch IFN γ stellt den maßgeblichen Faktor für die Expressierung derIDO dar [72]. Abgesehen vonIDO und iNOS werden auch andere Enzyme wie PGE $_2$, MCP-2, TGF β , TSG-6, IL-1RA, KGF, HLA-G5 und HGF als verantwortliche Faktoren für den immunmodulatorischen Effekt von MSC in der Literatur beschrieben [19, 43, 76–81].

Die Effekte, die durch von MSC sezernierten Zytokinen ausgelöst werden, verursachen demnach eine Veränderung des sekretorischen Profils von Monozyten, Makrophagen, dendritischen Zellen, natürlichen Killerzellen, sowie von Th $_1$ - und Th $_2$ -Zellen.

MSC hemmen darüber hinaus die Funktion und Differenzierung von dendritischen Zellen, ebenso die von NK-Zellen, sowie B- und T-Lymphozyten, wohingegen regulatorische T-Zellen (T $_{reg}$) aktiviert werden [67, 68, 82–88].

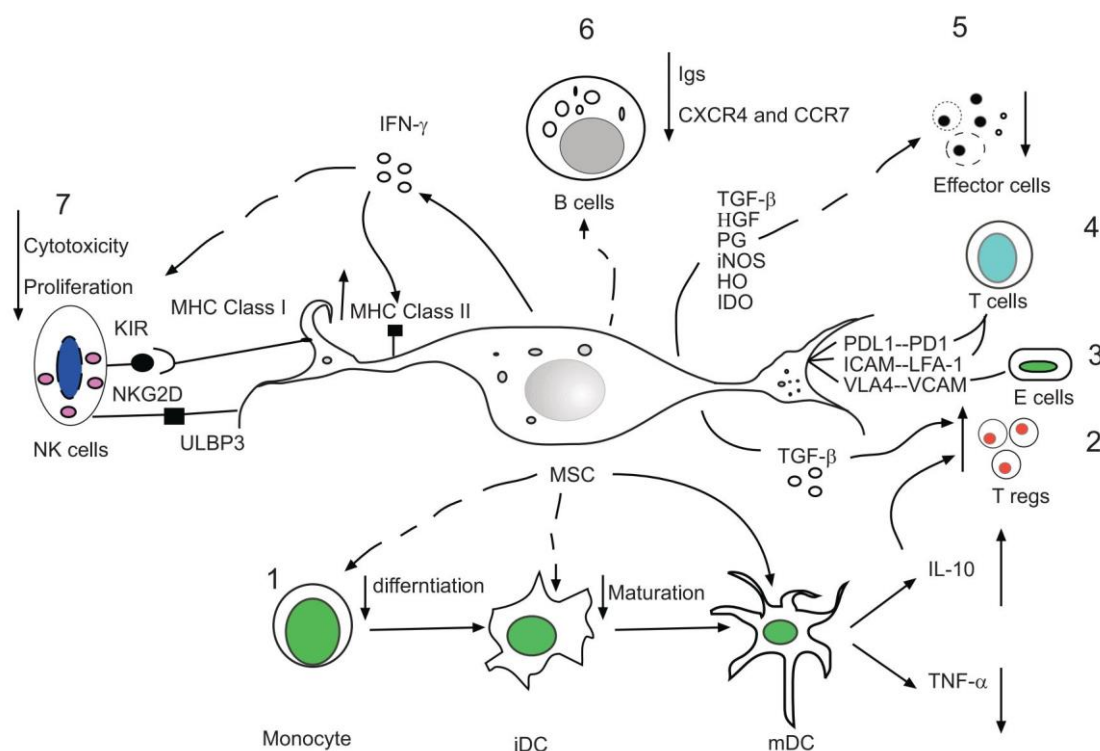


Abbildung 1: Übersicht über die Stoffwechselinteraktionen von MSC mit den Zellen der Immunabwehr;
Abdi, Fiorina et al [89]

Bisherige Studien konzentrierten sich demnach vor allem auf die Erforschung des Sekretoms von MSC als Schlüssel zur Aufklärung ihrer immunmodulatorischen Fähigkeiten und ihres Interaktionspotenzials mit anderen Zellen. Jüngste Ergebnisse demonstrieren allerdings, dass auch Sekretom-unabhängige Effekte existieren. So konnten Luk et al. nachweisen, dass hitzeinaktivierte MSC (HI-MSC) zur Suppression der TNF α -Produktion durch LPS-stimulierte Monozyten fähig sind, obwohl HI-MSC aufgrund des Fehlens eines aktiven Zellmetabolismus kein Sekretom mehr besitzen [90]. De Witte et al. zeigten, dass durch die Phagozytose von MSC bzw. HI-MSC eine Makrophagenpolarisierung bewirkt wird mit konsekutiv erniedrigten Spiegeln an TNF α und vermehrter Expression von IL-10 und programmed death-ligand 1 (PD-L1) [91]. Galleu et al. wiesen nach, dass die Perforin-abhängige Apoptose von MSC nach Infusion unabdinglich für die Initiierung der MSC-vermittelten Immunsuppression ist [92].

1.5 Fragestellung

In der vorliegenden Studie wurden stoffwechsellinaktive, hitzeinaktivierte MSC (HI-MSC) im allogenen Transplantationssetting bei Mäusen eingesetzt, um die Rolle des MSC-Sekretoms für die Herbeiführung einer MSC-induzierten Transplantatakzeptanz näher zu erforschen.

Im Herztransplantationsmodell an Maus und Ratte konnte durch den kombinierten Einsatz von MSC und niedrig-dosiertem Mycophenolat-Mofetil (MMF) das Transplantatüberleben signifikant verlängert werden [45, 93].

Ziel dieser Studie ist zu zeigen, inwiefern die Stoffwechselaktivität bzw. das Sekretom von MSC für deren immunmodulatorische Wirkung nach allogener Herztransplantation verantwortlich ist. Hierfür wurden den Mäusen die als Transplantatempfänger dienten MSC bzw. HI-MSC an Tag -4 in die V. caudalis mediana injiziert. Begleitend erhielten die Versuchstiere in beiden Gruppen niedrig dosiertes MMF von Tag 0 (Transplantation) bis postop. Tag 7. So sollte festgestellt werden, inwiefern stoffwechsellinaktive HI-MSC das Transplantatüberleben ähnlich positiv beeinflussen wie vitale MSC.

2 Material und Methoden

2.1 Gewinnung von MSC aus Fettgewebe

MSC können aus verschiedensten Geweben gewonnen werden, darunter Fettgewebe, Knochenmark, Nabelschnurblut und Tunica adventitia [22, 27, 94, 95]. Die im Versuch verwendeten MSC stammten aus dem Fettgewebe von männlichen Wildtyp-Mäusen des Stammes C57BL/6. Für die Präparation der MSC aus dem Fettgewebe wurden die Tiere mittels CO₂-Narkose und anschließender zervikaler Dislokation getötet. Anschließend erfolgte die Entnahme von Fett aus Subkutangewebe, Abdomen, Nierenbecken und Nacken. Unter sterilen Bedingungen wurde nach der Entnahme das gewonnene Fettgewebe in PBS gewaschen. Danach wurde das Fett mittels einer Schere zerkleinert bis zum Entstehen einer homogenen Masse, die für 45min bei +37°C in einer sterilfiltrierten (Millipore-Falcon 22µm) Collagenase IV-Lösung (0,5mg/ml Collagenase IV in MEM α -Medium, 2mM Glutamin, 1% Pen/Strep) inkubiert wurde. Anschließend erfolgte eine erneute Durchmischung der Zellsuspension durch mehrmaliges Auf- und Abpipettieren, Filtration (Millipore-Falcon 100µm) und zweimaliges Waschen mit PBS vor und nach Zugabe und Zentrifugation mit Erylysepuffer. Dann wurde das entstandene Zellpellet mit Nährmedium (MEM α -Medium + 20%FCS + 1%L-Glutamin + 1%Pen/Strep) in eine T25-Zellflasche überführt. Die spindelförmigen Zellen weisen eine Plastikadhärenz auf (siehe Abbildung 9). Folglich wurden die nicht adhärennten Zellen nach 24 Std. durch einen Mediumwechsel entfernt.

2.2 Kryokonservierung

Zur besseren Verfügbarkeit wurden die MSC zum Teil kryokonserviert und bei -80°C bis zum Gebrauch verwahrt. Dazu wurden die Zellen gepoolt, in der Zählkammer mit Trypanblau zum Ausschluss toter Zellen gezählt und anschließend mit einer Gefrierlösung bestehend aus 40% FCS und 60% Nährmedium auf eine Zellzahl von 10 Mio. Zellen/ml eingestellt. Die Zellsuspension wurde für 20min auf Eis gelagert und dann tropfenweise mit einer zweiten Gefrierlösung (20% DMSO, 80% FCS) versetzt.

Die MSC wurden zu Zellzahlen von 5 Mio. pro Kryovial aufgeteilt und in der Nalgene Freezing Box mit Isopropanol (99,9%) für 12 Std. um 1°C/min auf -80°C heruntergekühlt und anschließend bei dieser Temperatur weiterverwahrt.

2.3 Kultivierung und Differenzierung von MSC

Die MSC wurden *in vitro* kultiviert. Die Fähigkeit zur Differenzierung in Adipozyten und Osteoblasten wurde routinemäßig in einer der Passagen 2-4 kontrolliert.

2.3.1 Kulturbedingungen

Die Zellen wurden nach der Isolation aus dem Fettgewebe bzw. nach dem Auftauen bei +37°C und 5% CO₂ in 175cm² Zellkulturflaschen mit 25ml Nährmedium im Brutschrank gelagert. Das Medium wurde zweimal pro Woche gewechselt. Beim Erreichen einer Zellkonfluenz von etwa 80% wurden die Zellen mittels zweiminütiger Inkubation mit 0,5%igem Trypsin-EDTA bei +37°C vom Flaschenboden abgelöst. Es erfolgte eine lichtmikroskopische Kontrolle des Ablösevorganges, der dann durch Zugabe von serumhaltigem Medium beendet wurde. Die Zellen wurden dann im Verhältnis 1:2 oder 1:3 auf neue Zellkulturflaschen aufgeteilt, das Nährmedium entsprechend auf 25ml aufgefüllt und wieder bei +37°C inkubiert. Für die Versuche wurden Zellen der Passagen 4-7 verwendet.

2.3.2 Adipozyten

Zur Differenzierung in Adipozyten wurden die MSC aus einer der Passagen 2-4 vor Versuchsbeginn zu Zahlen von je 25.000 Zellen pro Well in 12-Well Platten mit je 2ml Kulturmedium (MEM- α , 15% FCS, 1% Pen/Strep, 1% Glutamin) ausplattiert. Am nächsten Tag erfolgte ein Mediumwechsel und die Wells wurden mit je 2ml Adipozyten-Differenzierungsmedium (MEM- α , 2mM Glutamin, 1% Pen/Step, 15% FCS, 60 μ M Indomethacin, 500 μ M IBMX, 50 μ g/ml-Ascorbinsäure, 10nM Dexamethason, 2 μ M Insulin) befüllt und für 7 Tage bei +37°C im Inkubator mit regelmäßigem Mediumwechsel

nach 2-3 Tagen bebrütet. Zur Kontrolle wurden MSC in normalem Kulturmedium analog zu den zu differenzierenden MSC ausgesät.

Zur Überprüfung des Differenzierungserfolges wurde am Ende ein Red-Oil-O Adipozytennachweis durchgeführt. Dazu wurden die Zellen mit PBS unter sterilen Bedingungen gewaschen, mit 10%iger Formaldehydlösung fixiert, anschließend mit 60%igem Isopropanol gewaschen und nach dem Trocknen mit Red-Oil-O-Arbeitslösung (3,5mg Red-Oil-O/ml Isopropanol; sterilfiltriert) gefärbt. Nach 20-60min Inkubationszeit wurden die Wells 4x mit Aqua dest. gewaschen und mikroskopiert (Abbildung 10).

2.3.3 Osteoblasten

Die MSC für die Osteoblastendifferenzierung wurden aus einer der Passagen 2-4 in 6-Well-Platten zu 50.000 Zellen pro Well mit je 3ml Kulturmedium ausgesät; analog dazu die gleiche Anzahl an Wells mit MSC zur Kontrolle. Am Tag 1 wurde das Medium gewechselt und in die zu differenzierenden Wells wurde Differenzierungsmedium (MEM- α , 2mM Glutamin, 1% Pen/Strep, 15% FCS, 10nM Dexamethason, 5nM β -Glycerophosphat, 50 μ g/ml L-Ascorbinsäure) gegeben; die Kontrollwells erhielten weiter normales Kulturmedium. Es erfolgte ein regelmäßiger Mediumwechsel nach jeweils 3-4 Tagen während des Differenzierungszeitraums von 14 Tagen.

Die gelungene Osteoblastendifferenzierung wurde durch einen Osteoblastennachweis nach Kossa wie folgt bestätigt: Die Wells wurden gründlich mit Aqua dest. gewaschen und mit 5%iger Silbernitratlösung für 40min bei hellem Licht und Raumtemperatur inkubiert. Danach wurden sie 1-2min unter UV-Licht gehalten und wieder mit Aqua dest. gewaschen. Dann erfolgte eine 5-minütige Inkubation mit 1%iger Pyrogallolsäure und daraufhin erneut ein Waschschrift mit Aqua dest. Zuletzt wurde zum Entfernen letzter Silbernitratreste 5%ige Natriumthiosulfatlösung zugegeben und wieder für 5min inkubiert. Nach dem Waschen mit Aqua dest. wurden die Wells mikroskopiert (Abbildung 11).

2.3.4 Inaktivierung von MSC

Es wurden Zellen aus den Passagen 4-6 verwendet. Wie bei Luk et al. [90] beschrieben, wurden die MSC werden mittels Trypsin-EDTA von der Zellkulturflasche abgelöst, zweimal mit PBS gewaschen und dann in MEM- α resuspendiert.

Anschließend erfolgte die 30-minütige Hitzeinaktivierung in einem mit Parafilm versiegelten 50ml Falcon-Röhrchen im Wasserbad bei exakt +50°C. Danach wurde erneut zentrifugiert und mit PBS gewaschen bevor die Zellen weiterverwendet wurden.

2.4 MTT-Assay

Die MTT-Assays wurden auf flachen 96-Well-Platten durchgeführt mit je 5000 Zellen (Zählung unter dem Mikroskop mittels Zählkammer) in 100µl MEMα (+15% FCS) pro Well bei einer Inkubationszeit von 24 Std. im CO₂-Inkubator bei +37°C. Parallel zur Vitalitätsbestimmung der HI-MSC erfolgte immer eine Kontrolle mit der gleichen Anzahl an Wells befüllt mit vitalen MSC.

Eine Lösung aus 5mg MTT gelöst in 1ml PBS wurde hergestellt, sterilfiltriert (Millipore 22µm) und 5 Std. vor Ende der Inkubationszeit wurden je 20µl dieser Lösung in jedes Well gegeben. Die Platten wurden dann wieder für die restlichen 5Std. im CO₂-Inkubator aufbewahrt. Anschließend wurde das Medium abpipettiert und Kristalle wurden mittels 100µl DMSO pro Well und wiederholtem Auf- und Abpipettieren aufgelöst. Als Referenzwert wurden zusätzlich zuvor leere Wells mit je 100µl DMSO befüllt und die Platten erneut für 5min bei +37°C inkubiert. Darauffolgend wurden die Proben erneut durchmischt, die Absorption von MSC, HI-MSC und Kontrolle bei 540nm in jedem Well bestimmt und daraus jeweils der Mittelwert pro Testreihe bestimmt.

2.5 Mixed Lymphocyte Reaction

Responderzellen wurden aus Balb/C-Mäusen und Stimulatorzellen aus B6-Mäusen isoliert. Die Spendertiere wurden durch CO₂-Vergiftung und anschließende zervikale Dislokation getötet. Die Milzen wurden nach Entnahme in gekühltem PBS gelagert und anschließend schnellstmöglich mittels Gentle-MACS Shredderer zerkleinert, um eine homogene Suspension zu erhalten. Danach wurde die Suspension erneut durch ein 22µm-Sieb in einen Falcon gespült und 5min bei 1500rpm, +4°C zentrifugiert. Nach Abnahme des Überstandes erfolgte eine Resuspendierung in 5ml Erylyse-Puffer mit 5min Inkubationszeit. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 20ml PBS gestoppt und

danach erneut zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und die Zellpellets in 10ml PBS resuspendiert und die Zellzahlen bestimmt.

Die B6-Splenozyten lagerten bis zum Aussäen der MLR in MLR-Medium (RPMI 1640 Medium, 0,1% 50mM 2-mercaptoethanol, 1% MEM non-essential Aminoacids (100x), 2% 1M HEPES, 1% 100mM Na-pyruvat solution, 1% Pen/Strep, 1% MEM vitamin-solution, 1% 200mM M-Glutamin, 10% FCS) auf Eis und wurden auf 100.000/100µl eingestellt.

Labelling der Balb/C-Splenozyten mit Cell Proliferation dye eFlour670 nach Einstellung der Zellzahl auf 20Mio/ml mit einer Endkonzentration der APC-Lösung von 2,5µM. Im Anschluss an die Färbung wurden die Zellen erneut gezählt und auf 100.000/50µl in MLR-Medium eingestellt. Die gelabelten Balb/C (100.000 pro Well) wurden sowohl alloge durch die zuvor gewonnen B6-Splenozyten (je 100.000 pro Well), als auch durch CD3-Antikörper (2,4µl/ml) stimuliert. Zu Kompensationszwecken wurden des Weiteren ungefärbte B6-Splenozyten mit CD3-Antikörpern stimuliert. Die MSC bzw. HI-MSK wurden zu je 3 Wells in verschiedener Zellzahl (25.000, 10.000 und 5.000) mit je 100.000 Balb/C und 100.000 B6 in einer 96-Well Rundbodenplatte ausgesät.

Die Ernte erfolgte am Tag 4 mit anschließender FACS-Färbung. Färbung der Proben mit CD3-PE und 506-vital dye und PE-Kompensation durch CD4-PE. Anschließend Lagerung der Zellen in IC-Perm Puffer über Nacht bei +4°C. Am nächsten Tag erfolgte die durchflusszytometrische Messung der Proben.

2.6 Durchflusszytometrie

Bei der Durchflusszytometrie (Fluorescence-Activated Cell Sorting/FACS) werden Oberflächenmoleküle, intrazelluläre Proteine, Peptide und DNA quantitativ bestimmt. Die Messung beruht auf einer Antigen-Antikörper-Reaktion, die mittels spezifischen mit Fluoreszenzfarbstoff markierten Antikörpern durchgeführt wird [96]. Im vorliegenden Versuchsaufbau wurden die Oberflächenmarker sowohl der nativen als auch der hitzebehandelten MSC mittels Durchflusszytometrie bestimmt. Zu diesem Zweck wurden die Zellen zuerst mit PBS und anschließend mit MACS-Puffer gewaschen. Nach Resuspendierung in PBS wurden die Zellen aliquotiert, erneut abzentrifugiert und abgeschüttet. Die Färbung erfolgte mit den Farbstoffen Fluorescein-

Isothiocyanat (FITC) für CD106 und Sca1, CD105 und MHC Class I H-2Kb (Klon AF6-88.5.5.3), Phycoerythrin-Cyanin 7 (PeCy7) für CD11b und mit Allophycocyanin (APC) für CD44, CD29 und MHC Class II I-Ab (Klon AF6-120.1). Isotypen-Kontrolle durch Referenz-Antikörper CD44 für PE, PeCy7, APC und Sca1 für FITC. CD11b stellte die Negativkontrolle dar, da MSC dieses Molekül nicht auf ihrer Oberfläche aufweisen [97]. Nach der Färbung wurden die Proben gevortext, für 15min bei +4°C inkubiert und anschließend wieder mit MACS-Puffer gewaschen. Nach Resuspendierung in Paraformaldehyd erfolgten Messung und Auswertung.

2.7 Isolation von Knochenmarkszellen

Zum Zwecke der Knochenmarkgewinnung wurden männliche B6-Mäuse mittels CO₂-Narkose und anschließender zervikaler Dislokation getötet. Den Tieren wurden Femur und Tibia beidseits entnommen, von Sehnen und Muskeln befreit und zur Gewährleistung von Sterilität für 1min in 75%igem Ethanol inkubiert. Danach wurden die Knochen 2x in sterilem PBS gewaschen und bis zur Weiterverarbeitung stets in sterilem PBS auf Eis gelagert. Mittels einer sterilen Schere wurden die Epiphysen entfernt und die Knochen mit einer PBS-gefüllten 5ml Spritze durch eine 27G Kanüle durchgespült bis das Knochenmark zur Gänze herausgespült war und sie weißlich durchscheinend erschienen. Ggf. wurden die Knochen mehrfach nachgekürzt, um eine möglichst effektive Knochenmarkisolation zu ermöglichen. Das Knochenmark wurde in Petrischalen aufgefangen und mit einer Spritze resuspendiert bis eine homogene Lösung entstand. Diese wurde anschließend durch ein 100µm Zellsieb in ein 50ml Falconröhrchen überführt und für 5min bei 1500rpm, +4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und in Medium (DMEM, 10%FCS, 1% P/S, 100ng/ml M-CSF) resuspendiert.

2.8 Kultivierung von Monozyten aus dem Knochenmark

Die nach obiger Prozedur gewonnenen Knochenmarkszellen wurden anschließend wie folgt zu Monozyten (bone marrow derived monocytes/BMDM) differenziert:

Ausplattierung auf 10cm Platten in Monozyten-Medium und Inkubation im Brutschrank bei +37°C, 5% CO₂ mit Mediumwechsel an Tag 3 und 6. An Tag 7 wurden die Zellen durch Ablösung von der Plastikoberfläche mittels Trypsin/EDTA geerntet. Die Abstopfung der Reaktion erfolgte mit FCS-haltigem Medium. Anschließend wurden die Zellen in ein 50ml Falconröhrchen überführt und zentrifugiert (1500rpm, 5min, RT). Der Überstand wurde abgenommen und die Zellen in Medium resuspendiert.

2.9 Monozyten Co-Kultur

Knochenmarkszellen wurden wie zuvor beschrieben gewonnen und zu Monozyten differenziert. Die so generierten Monozyten wurden in einem Nährmedium (RPMI 1640 Medium, 0,1% 50mM 2-Mercaptoethanol, 1% MEM non-essential Aminoacids (100x), 2% 1M HEPES, 1% 100mM Na-Pyruvat Lösung, 1% Pen/Strep, 1% MEM Vitamin Lösung, 1% 200mM Glutamin, 10% FCS) auf 200.000 Zellen/ml eingestellt und in 24-Well-Platten zu 100.000 Monozyten pro Well mit je 100.000 MSC bzw. 100.000 HI-MSK in einem Endvolumen von 1ml/Well ausgesät. Nach der Ausplattierung wurden die Zellen über Nacht im Brutschrank (+37°C, 5% CO₂) inkubiert und am nächsten Tag erfolgte die Zugabe von 100ng LPS zu jedem Well, um die Monozyten zur TNF α -Produktion anzuregen. Nach 7 Std. Inkubationszeit im Brutschrank wurde der Überstand in 1,5ml Eppendorf-Cups überführt, zentrifugiert und der zellfreie Überstand mittels TNF α -ELISA analysiert.

2.10 TNF α -ELISA

Zur Messung der TNF α -Produktion der LPS-stimulierten Monozyten in der Co-Kultur wurden aus den zellfreien Überständen TNF α -ELISAs durchgeführt. Dazu wurden flache 96-Well Platten am Vortag mit Capture-Antikörper, verdünnt 1:250 in Coating Buffer (0,1M Natriumcarbonat), befüllt und über Nacht bei +4°C inkubiert. Am nächsten Tag wurden die Platten 3x mit Waschpuffer (PBS, 0,05% Tween) gewaschen und anschließend mit Assay Diluent (10% FCS in PBS) für 1h bei Raumtemperatur geblockt. Nach erneutem dreimaligem Waschen wurden die Standards in einer Reihe von

1000pg/ml abwärts je um den Faktor 2 verdünnt und ebenso wie die Proben in Doppelbestimmung ausplattiert und für 2h bei Raumtemperatur inkubiert. Danach wurde wiederum 3x gewaschen und anschließend für 1h mit Detection-Antikörper (1:500 mit Assay Diluent verdünnt) und SA-HRP (1:250 mit Assay Diluent verdünnt) inkubiert. Die Platten wurden daraufhin wieder 3x gewaschen und dann für 30min bei Raumtemperatur mit einer 1:1 Mischung der Substratreagenzien A und B im Dunklen inkubiert. Zum Stoppen wurde 1M H₂SO₄-Lösung verwendet. Anschließend erfolgte die photometrische Auswertung des ELISAs bei 450-540nm.

2.11 Tiere und Tierhaltung

Die Tierversuche wurden gemäß den Tierschutzbestimmungen der regionalen Behörden der Oberpfalz durchgeführt und genehmigt von der Regierung von Oberbayern unter dem Aktenzeichen 54-2532.1-41/13.

Die ausschließlich männlichen Tiere hatten zum Zeitpunkt des Versuchseintritts ein Gewicht von 20-25g. Sämtliche Prozeduren wurden im Tierversuchslabor des Universitätsklinikums Regensburg durchgeführt und erfolgten unter adäquater Anästhesie. Bei den Spendertieren für Herzen und MSC handelte es sich um Mäuse vom Typ C57BL/6 („B6“), bei den Empfängertieren um Balb/C des Lieferanten Charles River Laboratories (Sulzfeld, Deutschland).

2.12 Tiermodell und Gruppendesign

Die Versuchstiere wurden in sechs Gruppen unterteilt. Vier Gruppen wurden mit MSC bzw. HI-MSC behandelt, zwei davon zusätzlich mit MMF, eine nur mit MMF und die Kontrollgruppe erhielt PBS:

1. *Kontrolle*: Injektion von PBS in die V. caudalis mediana vier Tage vor der Operation.
2. *MMF*: Intraperitoneale Injektion von MMF in einer Dosis von 160mg/kg Körpergewicht nach täglicher Gewichtserfassung von Tag 0 (OP-Tag) bis Tag 7.

3. *MSC*: Injektion von 0,5Mio. *MSC* in die *V. caudalis mediana* vier Tage vor der Operation.
4. *MSC + MMF*: Applikation von 0,5Mio. *MSC* in die *V. caudalis mediana* vier Tage vor der OP. Zusätzlich intraperitoneale Injektion von *MMF* in einer Dosis von 160mg/kg Körpergewicht nach täglicher Gewichtserfassung von Tag 0 (OP-Tag) bis Tag 7.
5. *HI-MS*C: Injektion von 0,5Mio. *HI-MS*C in die *V. caudalis mediana* vier Tage vor der Operation.
6. *HI-MS*C+*MMF*: Applikation von 0,5Mio. *HI-MS*C in die *V. caudalis mediana* vier Tage vor der OP. Zusätzlich intraperitoneale Injektion von *MMF* in einer Dosis von 160mg/kg Körpergewicht nach täglicher Gewichtserfassung von Tag 0 (OP-Tag) bis Tag 7.

2.13 *MSC*-Injektion

Die *MSC* wurden mit Trypsin aus der Kulturflasche abgelöst, mit PBS gewaschen und anschließend wieder in PBS resuspendiert. Je nach Versuchsgruppe wurden die Zellen anschließend hitzeinaktiviert oder direkt weiterverwendet. Die Zellzahlbestimmung erfolgte lichtmikroskopisch in einer Neubauer-Zählkammer durch Trypanblaufärbung. Die Zellen wurden auf eine Konzentration von 0,5Mio/ml eingestellt und dem im Maus-Restrainer fixierten Tier mit einer 27G Kanüle in die *V. caudalis mediana* injiziert.

2.14 Herztransplantation

Die Spendermäuse (Typ B6) wurden mit Ketamin (1%) -Xylazin (0,02%) betäubt, an den Extremitäten mit Pflasterstreifen auf der OP-Unterlage fixiert und anschließend unter adäquater Anästhesie unter dem Mikroskop median laparotomiert. Nach Eröffnung der Peritonealhöhle wurden die Rippen durchtrennt und die ventrale Thoraxwand nach kranial umgeklappt, um das Mediastinum darzustellen. Danach erfolgte die Injektion von 100µl Heparin in die *V. cava inf.*, um die Thrombusbildung zu verhindern.

5min später wurde die Aorta abdominalis abgesetzt und 5ml NaCl-Heparinlösung zur Spülung des Herzens in die V. cava inf. injiziert. Nach erneuter Spülung durch Injektion von 3ml NaCl in die Aorta ascendens wurden die zu- und abführenden Gefäße zuerst einzeln und zum Schluss zusammen ligiert, dann abgesetzt und das Herz explantiert. Das entnommene Organ lagerte bis zur Reimplantation in einem Falconröhrchen mit NaCl auf Eis.

Die analog zur Spendermaus betäubte Empfängermaus (Typ Balb/C) wurde ebenfalls am OP-Tisch mit Klebebändern fixiert und das Operationsgebiet mit Ethanol (80%) abgewaschen. Anschließend erfolgte unter adäquater Anästhesie eine mediane Laparotomie, die Bauchdecke wurde mittels Klemmen am Rand des Operationsgebietes fixiert, der Darm beiseite genommen und mit einer feuchten Kompresse abgedeckt, um ihn vor Exsikkose zu bewahren. Danach erfolgte die Anlage einer Blutsperre von V. cava inf. und Aorta abdominalis mittels Gefäßklemmen, die in größtmöglichem Abstand voneinander platziert wurden. Die abgeklemmten Gefäßabschnitte wurden schließlich der Länge nach für etwa 3mm, entsprechend des Durchmessers der Spendergefäße, eröffnet und anschließend umgehend mit Kochsalzlösung (0,9%) gespült. Dann erfolgte die End-zu-Seit-Anastomosierung von Aorta ascendens des Spenderorgans mit der Aorta abdominalis des Empfängers sowie von V. cava inferior und Truncus pulmonalis mit einer 11/0 Naht. Die Gefäßklemmen wurden schließlich entfernt und bei intakter Anastomose begann das Herz innerhalb weniger Sekunden zu schlagen. Anschließend wurde der Darm wieder im Abdomen platziert, der Peritonealraum mit warmer Kochsalzlösung gespült und die Bauchdecke mit fortlaufender Naht verschlossen.

Der Herzschlag wurde täglich durch abdominale Palpation kontrolliert und im Zweifel wurden die Tiere erneut betäubt und laparotomiert, um ggf. unter Sicht die Herzfunktion zu überprüfen. Als Tag der Abstoßung wurde jener definiert, an dem kein transabdomineller Herzschlag mehr palpabel war. Zur Verifizierung der Diagnose erfolgte eine mediane Laparotomie unter Narkose.

2.15 T-Zell Färbung abgestoßener Herztransplantate

Gefrierschnitte der Herzen wurden für 1 Std. bei Raumtemperatur getrocknet und anschließend für 10min bei +4°C in Aceton fixiert. Nach erneutem Trocknen für 60min wurden die Schnitte mittels einer ImmEdge™ pen eingekreist und anschließend für 2x10min mit PBS auf der Rüttelplatte gewaschen. Danach wurden die Schnitte in einen Block mit PBS+10% Pferdeserum getaucht und für 30min bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde der Block geleert und der primäre Antikörper (rabbit anti-CD3G monoclonal antibody EPR4517) zugegeben (1:200 in PBS, 2 µg/ml). Um eine unspezifische Bindung des zweiten Antikörpers ausschließen zu können, wurde PBS als Kontrolle eingesetzt. Nach einer Inkubationszeit von 2h in einer befeuchteten Kammer bei Raumtemperatur wurden die Schnitte 3x5min mit PBS auf der Rüttelplatte gewaschen. Danach wurden die Schnitte im Dunkeln für 30min mit dem zweiten Antikörper (Cy™3 AffiniPure F(ab')₂ Fragment Donkey Anti-Rabbit IgG (H+L)) 1:250 in PBS + 10% Pferdeserum + DAPI (4',6-Diamidin-2-phenylindol) 1:5000 inkubiert. Abschließend wurden die Schnitte 3x10min mit PBS auf der Rüttelplatte gewaschen, mit Dako fluorescence mounting medium eingedeckt und mikroskopiert.

2.16 Statistische Auswertung

Die statistische Auswertung erfolgte unter Verwendung von GraphPad Prism Version 7.03. Zum Kurvenvergleich wurde der Log-rank Test angewandt. Statistische Signifikanz wurde angenommen bei $p < 0.05$ (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$).

3 Ergebnisse

3.1 Metabolische Aktivität und Vitalität von HI-MSK

Um festzustellen, ob murine MSC nach Hitzeinaktivierung noch eine metabolische Aktivität aufweisen, wurden MTT-Assays durchgeführt. Zur Reduktion fähige Zellen bewirken die Reduktion des gelben MTT in das blaue Formazan. Der erfolgte Farbumschlag kann photometrisch bestimmt werden und so auf die metabolische Aktivität der untersuchten Zellen geschlossen werden. Wie bereits für humane MSC beschrieben [90], verursacht die Hitzeinaktivierung auch bei murinen MSC eine irreversible Inaktivierung der metabolischen Aktivität. MTT-Assays 0 Std. bzw. 24 Std. nach Hitzeinaktivierung zeigten eine fehlende Reduktionsfähigkeit der HI-MSK. Dies stellte sich im Ausbleiben des Farbumschlags von gelb nach blau und der geringeren Absorption in der photometrischen Messung bei 540nm dar. Diese Ergebnisse zeigen, dass die metabolische Inaktivierung der HI-MSK nicht nur irreversibel ist, sondern auch unmittelbar auf die Hitzebehandlung der Zellen folgt.

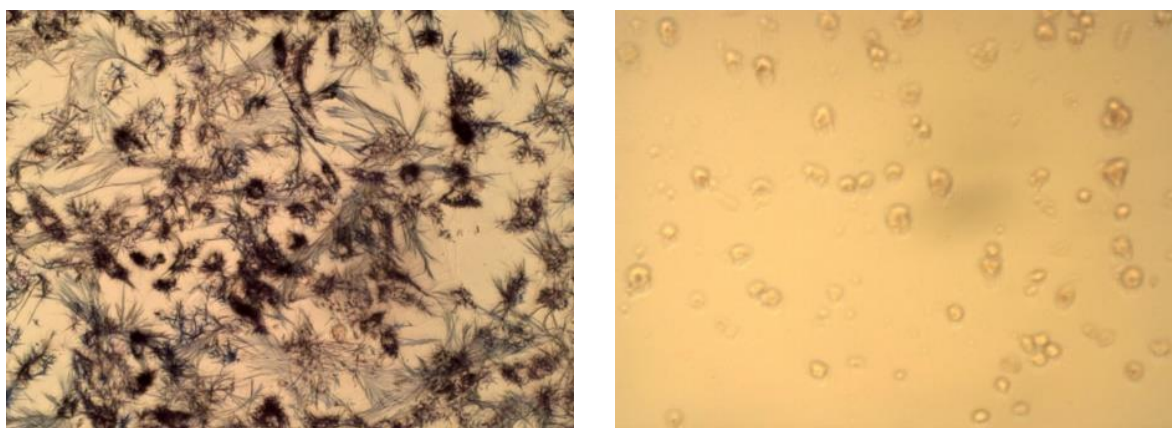


Abbildung 2: MTT-Assay mit Reaktionsbeginn 0h nach Inaktivierung.

Links: Die vitalen MSC sind zur Reduktion des gelben MTT in das blaue Formazan fähig.

Rechts: Aufgrund ihrer fehlenden Stoffwechselaktivität sind die HI-MSK nicht mehr zur Reduktion des gelben MTT ins blaue Formazan fähig, ein Farbumschlag bleibt aus. Die Zellen sind aufgrund der vorangegangenen Hitzeinaktivierung nicht mehr plastikadhärent. Maßstab 150:1.

Metabolische Aktivität

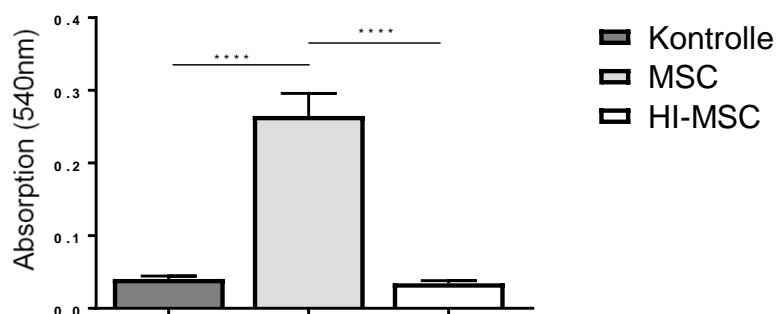


Abbildung 3: Messung der metabolischen Aktivität von MSC und HI-MSC 0h nach Hitzeinaktivierung im MTT-Assay mittels photometrischer Bestimmung der Absorption des Überstandes bei 540nm. HI-MSC sind im Gegensatz zu MSC nicht in der Lage das gelbe MTT zum blauen Formazan zu reduzieren, wodurch sich eine geringere Absorption ergibt. ** bezeichnet $p < 0.0001$**

Die Auswirkungen der Hitzeinaktivierung auf die Vitalität der MSC wurde durchflusszytometrisch bestimmt. Die Zellvitalität wurde mittels Färbung durch LIVE/DEAD Fixable Aqua Dead Cell Stain nachgewiesen, wobei gezeigt werden konnte, dass 67,7% der HI-MSC ihre Vitalität unmittelbar nach der Hitzeinaktivierung verloren hatten. Die Anzahl der vitalen Zellen sank nach Hitzeinaktivierung noch weiter und nach 24h ließen sich nurmehr 1,32% vitale Zellen detektieren.

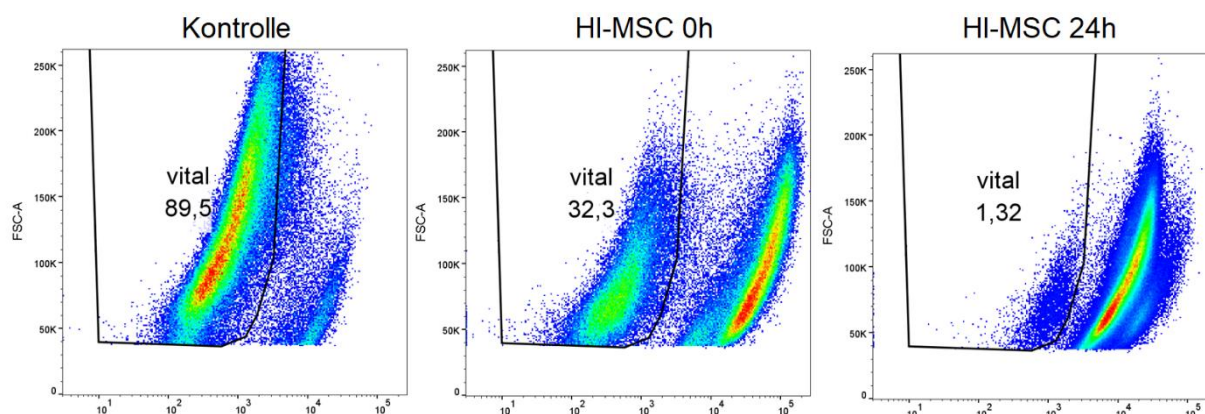


Abbildung 4: Durchflusszytometrie von MSC und HI-MSC. Direkt nach Hitzeinaktivierung haben 67,7% der Zellen ihre Vitalität verloren, nach 24h insgesamt 98,7%.

3.2 Oberflächenmarkerprofil von HI-MSC

Zur Evaluation der Auswirkungen der Hitzeinaktivierung auf das Oberflächenmarkerprofil muriner MSC erfolgte die durchflusszytometrische Bestimmung der Oberflächenmarker CD11b, CD29, CD44, CD105, CD106, Sca-1, MHC I und MHC II.

Die Kontroll-MSC waren positiv für die Oberflächenmarker Sca-1, CD29, CD44, CD105, CD106 und gering positiv für MHC I. MHC II war nicht detektierbar. Alle MSC waren negativ für CD11b.

Die Hitzeinaktivierung bewirkte eine reproduzierbare Veränderung des Oberflächenmarkerprofils der murinen MSC. Im Vergleich zu den MSC der Kontrollgruppe zeigten HI-MSC ein abgeschwächtes Signal für CD29 und CD44. Sca-1 und CD106 waren nur noch in geringem Ausmaß detektierbar. Das Signal für CD105 und MHC I war nicht mehr nachweisbar. Analog zu den MSC zeigten sich auch die HI-MSC negativ für MHC II und CD11b.

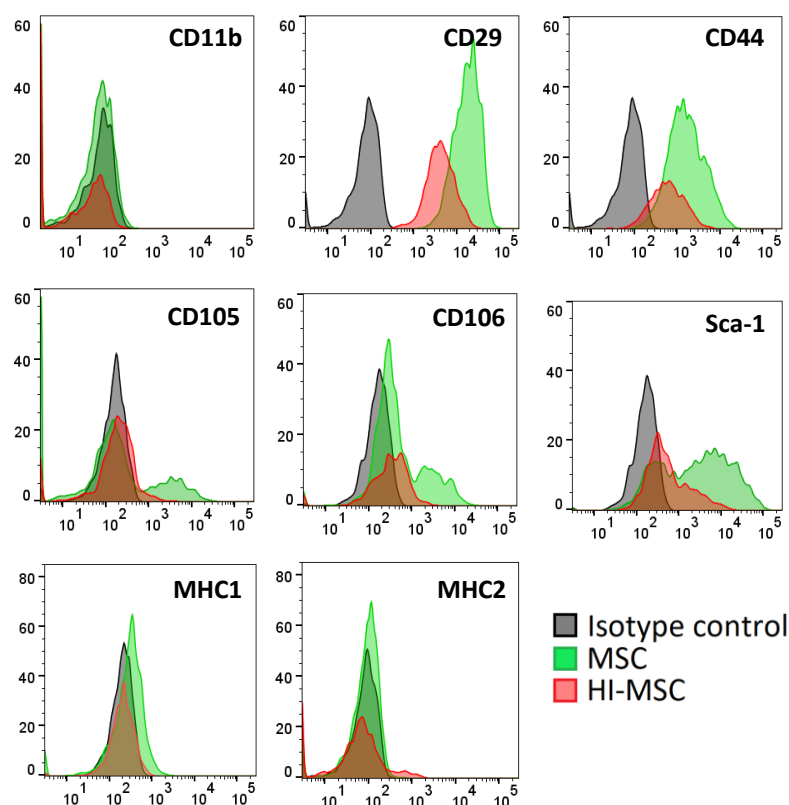


Abbildung 5: Oberflächenmarkerprofil von MSC und HI-MSC im Vergleich. HI-MSC zeigen im Vergleich zu MSC ein schwächeres Signal für CD29 und CD44, nur noch geringe Detektion von Sca-1 und CD106, sowie den Verlust der Nachweisbarkeit von CD105 und MHC I. Sowohl MSC als auch HI-MSC waren negativ für CD11b und MHC II.

3.3 Keine Inhibition der T-Zell-Proliferation durch HI-MSC in der MLR

Die Effekte muriner MSC und HI-MSC auf die T-Zell-Proliferation wurden in einer Mixed Lymphocyte Reaction (MLR) aufgezeigt. Die Kontrollgruppe ohne MSC zeigte eine deutliche T-Zell-Proliferation durch die Stimulation mit allogenen T-Zellen. Vitale MSC hatten einen eindeutig inhibitorischen Effekt auf die Lymphozytenproliferation im Vergleich zur Kontrollgruppe ohne MSC. In der HI-MSC-Gruppe konnte eine eindeutige Zunahme der T-Zell-Proliferation als Antwort auf die Stimulation mit allogenen T-Zellen im Vergleich mit der Kontrollgruppe beobachtet werden. Im Gegensatz zu den vitalen MSC hatten HI-MSC demnach einen stimulierenden Effekt auf die T-Zell-Proliferation.

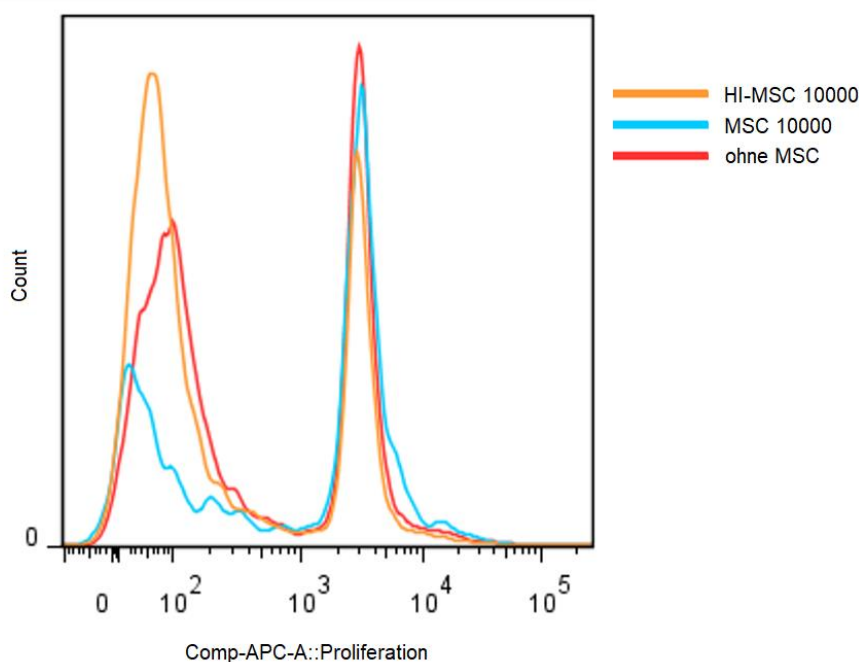


Abbildung 6: Die MLR wurde mit je 10000 MSC bzw. 10000 HI-MSC durchgeführt. Es zeigte sich ein deutlicher Rückgang in der T-Zell-Proliferation der MSC-Gruppe. Die HI-MSC hatten einen leicht positiven Effekt auf die T-Zell-Proliferation. „Ohne MSC“ als Kontrollgruppe zur Referenz.

3.4 HI-MSC hemmen TNF α -Produktion durch LPS-stimulierte Monozyten

Um den Effekt von HI-MSC auf die Funktion CD14⁺ Monozyten zu untersuchen wurden Co-Kulturen angelegt. Dazu wurden MSC bzw. HI-MSC in einem 1:1 Verhältnis mit BMDM ausplattiert, kultiviert und mit LPS stimuliert. In einem anschließenden ELISA wurde die Konzentration von TNF α im Überstand ermittelt.

In der Monozyten Co-Kultur waren sowohl MSC als auch HI-MSC in der Lage nach Stimulation mit LPS die Produktion von TNF α durch die CD14⁺ Monozyten im Vergleich zur Kontrolle zu supprimieren. Im Überstand der Wells mit HI-MSC waren jedoch tendenziell höhere Konzentrationen an TNF α messbar als in den Wells mit vitalen MSC.

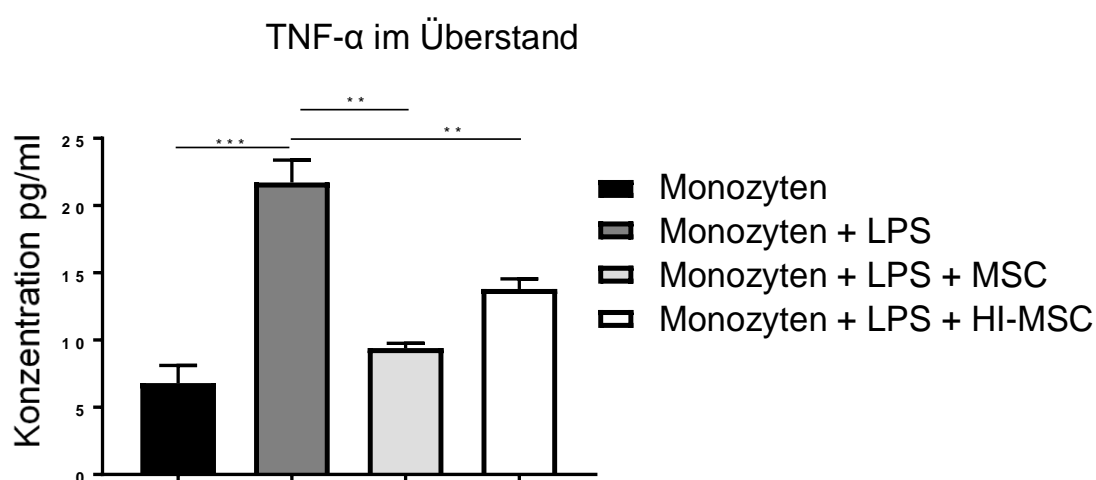


Abbildung 7: TNF α -Produktion der Monozyten unter dem Einfluss von MSC und HI-MSC nach Stimulation mit LPS. Sowohl MSC als auch HI-MSC sind zur Suppression der TNF α -Produktion durch die LPS-stimulierten Monozyten fähig. ** bezeichnet $p < 0.01$, *** bezeichnet $p < 0.001$.

3.5 Kein verlängertes Überleben durch HI-MSC im HTx-Modell

Zur Gegenüberstellung der immunmodulatorischen Effekte von MSC und HI-MSC *in vivo* erfolgte die i.v.-Applikation der Zellen in einem allogenen Herztransplantationsmodell.

Die alleinige Verabreichung von MSC (n=7) hatte keinen positiven Effekt auf das Transplantatüberleben nach allogener Herztransplantation im Vergleich zur PBS-

Kontrollgruppe (n=8) mit einem mittleren Überleben von 10 Tagen bzw. 10,5 Tagen ($p=0,2$). Die HI-MSC Gruppe (n=6) zeigte mit einer mittleren Überlebensdauer von 7 Tagen ein signifikant geringeres Transplantatüberleben im Vergleich zur PBS-Gruppe mit 10,5 Tagen auf ($p=0,0001$).

Bei alleiniger Behandlung mit MMF für 7 Tage (n=13) wurde ein signifikant erhöhtes Transplantatüberleben verglichen mit der PBS-Kontrolle von 10,5 auf 19 Tage im Mittel beobachtet ($p<0,0001$).

Die Verabreichung von MSC in Kombination mit MMF (n=17) bewirkte mit 36 Tagen ein signifikant längeres Überleben im Vergleich zur Kontrollgruppe mit MMF ($p=0,0002$).

Im Gegensatz zu den MSC hatten HI-MSC kombiniert mit MMF (n=15) keinen signifikant positiven Effekt auf die Überlebensdauer im Vergleich zur Monotherapie mit MMF (mittleres Überleben 14 Tage bzw. 19 Tage, $p=0,07$). Es wurde im Gegenteil sogar ein Trend in Richtung verringertes Transplantatüberleben beobachtet.

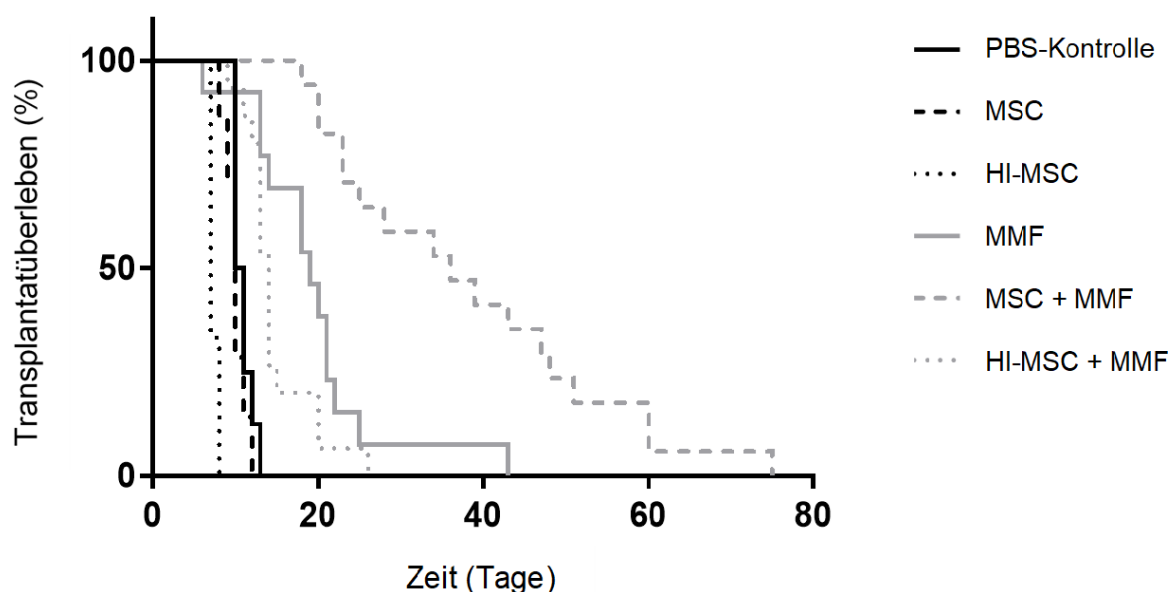


Abbildung 8: Transplantatüberleben nach allogener Herztransplantation. Die Grafik zeigt, dass HI-MSC + MMF mit 14 Tagen ein weitaus geringeres Überleben lieferten als die Gruppe mit vitalen MSC + MMF und einer mittleren Überlebensdauer von 36 Tagen.

Um nachweisen zu können, dass T-Zellen unmittelbar an der Transplantatabstoßung beteiligt sind, wurde eine Immunfluoreszenzfärbung von Gefrierschnitten abgestoßener Herztransplantate aller Versuchsgruppen durchgeführt. Der blaue

Fluoreszenzfarbstoff DAPI (4',6-Diamidin-2-phenylindol) wurde zur Markierung der DNA und damit der Zellkerne eingesetzt. Der Nachweis des auf T-Lymphozyten vorkommenden Transmembranproteins CD3 erfolgte durch Konjugation mit einem primären CD3-Antikörper und anschließender Färbung mit dem roten Cyaninfarbstoff Cy3. Durch diese Färbung der abgestoßenen Herzen konnte gezeigt werden, dass CD3⁺ T-Zellen zum Zeitpunkt der Abstoßung die Transplantate infiltrieren und verdeutlicht somit deren Rolle als Akteure der akuten Abstoßungsreaktion nach allogener Herztransplantation.

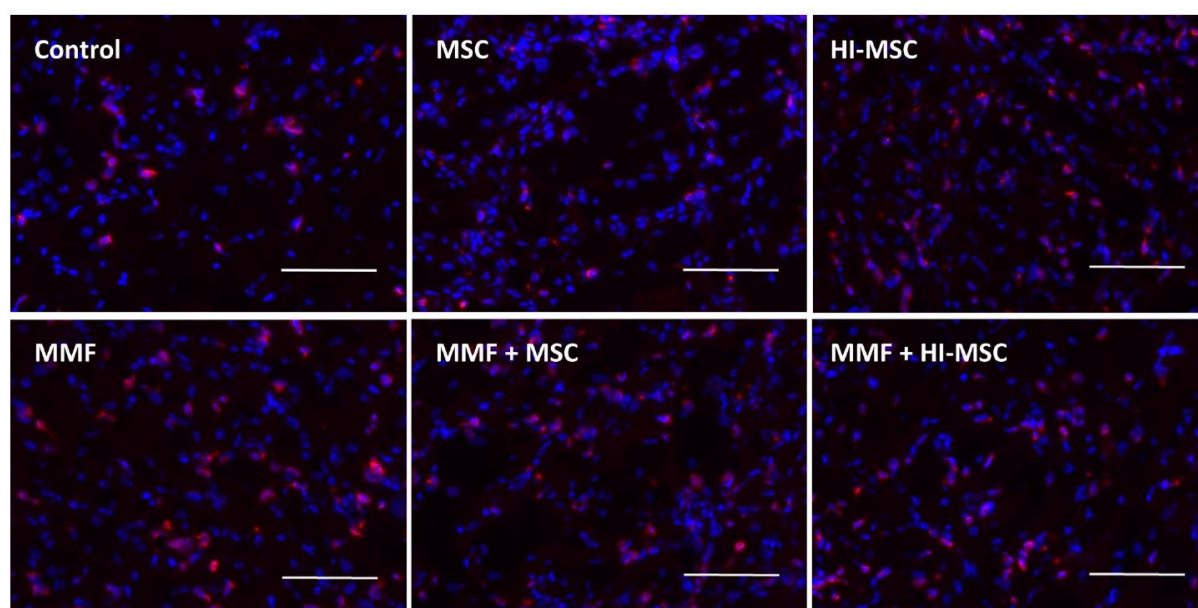


Abbildung 9: Immunfluoreszenzfärbung abgestoßener Transplantate aus der Kontrollgruppe und den Versuchsgruppen. Die rote Farbe markiert CD3⁺ T-Zellen, die zum Zeitpunkt der Abstoßung die Organe infiltrieren. Die blaue Farbe markiert die mittels DAPI sichtbar gemachten Zellkerne. Die weiße Linie markiert 80µm.

4 Diskussion

Bereits seit einigen Jahren finden MSC im Rahmen klinischer Transplantationsstudien vor allem bei Patienten nach Nierentransplantation Anwendung [98, 99]. Um eine sichere und verlässliche Therapie gewährleisten zu können ist es daher unabdinglich weitere Details bzgl. des Wirkmechanismus von MSC zu klären. Dies ist vor allem im Hinblick auf potenzielle Wechselwirkungen der MSC mit Medikamenten und zur Prävention von Langzeitschäden von eminenter Wichtigkeit.

Da HI-MSC einen inaktiven Zellmetabolismus aufweisen [90] liegt die Annahme nahe, dass HI-MSC hinsichtlich der tumorigenen Wirkung von MSC [30–32, 100] ein geringeres Nebenwirkungspotenzial als vitale MSC aufweisen könnten. Sie würden daher zum Zwecke einer Immunmodulation im Rahmen einer Organtransplantation bei entsprechender Wirksamkeit eine vielversprechende Alternative zu vitalen MSC darstellen. Bisher durchgeführte Studien beschäftigten sich wie bereits eingangs erläutert zum überwiegenden Teil mit der Erforschung von MSC hinsichtlich ihres Potenzials zur Zellkommunikation über lösliche Faktoren. Vielversprechende Ergebnisse aus jüngsten Studien zeigen Mechanismen auf, die eine Sekretom-unabhängige Immunmodulation durch MSC beschreiben [90–92]. Um ein eingehenderes Verständnis über die MSC-vermittelte Immunmodulation zu erlangen, wurden in der vorliegenden Studie die Effekte von MSC bzw. HI-MSC in einem etablierten Herztransplantationsmodell an der Maus [101, 102] verglichen. Es konnte gezeigt werden, dass sich HI-MSC nicht positiv auf das Überleben nach Herztransplantation auswirkten. Im Folgenden werden die Ergebnisse in dieser Hinsicht diskutiert und versucht, die präsentierten Resultate mit dem aktuellen Forschungsstand zu vergleichen.

In der vorliegenden Studie konnte gezeigt werden, dass HI-MSC im Rahmen der allogenen Herztransplantation bei Mäusen nicht zu einem verlängerten Überleben führen. Es konnte hingegen sogar ein Trend in Richtung einer verkürzten Überlebensdauer im Vergleich zur Kontrollgruppe festgestellt werden. Daher gilt es zu erörtern, welche Mechanismen für die verzögerte Transplantatabstoßung bei MSC verantwortlich sind, folglich aber nicht durch HI-MSC in Gang gesetzt werden können.

Der grundlegende Unterschied zwischen MSC und HI-MSC liegt in der fehlenden Stoffwechselfähigkeit der HI-MSC. Die Applikation Sekretom-defizienter bzw. IFN γ -aktivierter MSC hatte bei Lee et al. ähnliche Effekte auf die systemischen Zytokinspiegel verglichen mit der Verabreichung konventioneller MSC. Dies lässt darauf schließen,

dass der initiale systemische Effekt nicht von der Aktivität der MSC selbst, jedoch maßgeblich von der Reaktion anderer Zellen auf die MSC abhängt.[103] Auf dieser Grundlage fußt die Annahme, dass HI-MSC einen mit MSC vergleichbaren Effekt im Sinne einer verbesserten Transplantatakzeptanz erzielen könnten.

In den beschriebenen Versuchen wurde von einer vollständigen und irreversiblen metabolischen Inaktivität der HI-MSC ausgegangen, die Luk et al. bereits nachweisen konnten [90]. In Übereinstimmung hiermit konnte bei allen durchgeführten Messungen der metabolischen Aktivität der HI-MSC mittels MTT-Assay 0h und 24h nach Hitzechock eine fehlende Reduktionsfähigkeit der HI-MSC belegt werden. Dies zeigte sich durch die verminderte Absorption der Reaktionsprodukte in den Assays der HI-MSC zu allen Versuchszeitpunkten verglichen mit den vitalen MSC, wie es auch bei Luk et al. [90] der Fall war. Da HI-MSC keine parakrine Aktivität aufweisen [90], wäre es möglich, dass die in dieser Studie durch HI-MSC hervorgerufenen Effekte der direkten Interaktion mit anderen Zellen über Mechanismen der Oberflächenantigenerkennung und direktem Zellkontakt zugeschrieben werden könnten, da eine Sekretom-vermittelte Zellkommunikation weitgehend ausgeschlossen werden kann.

Die längsten Transplantatüberlebenszeiten konnten in der Versuchsgruppe beobachtet werden, die eine Kombination aus vitalen MSC und MMF erhielt. Jedem Tier wurden 5×10^5 vitale MSC vier Tage vor der Transplantation i.v. verabreicht. Die Wirkung von MSC unterliegt einem dosisabhängigen Effekt. Die Schwelle für eine systemische Wirkung nach i.v.-Applikation liegt bei ca. 3×10^5 Zellen [103]; dieser Schwellenwert konnte somit um ein Vielfaches überschritten werden. Der günstigste Zeitpunkt für die MSC-Verabreichung erwies sich als vier Tage vor der Transplantation [93], weshalb dieser Zeitpunkt auch in der vorliegenden Studie gewählt wurde. Bei Popp et al. zeigten sich analog zur vorliegenden Studie durch die Kombination von MSC mit gewichtsadaptiertem MMF für sieben Tage postoperativ ebenfalls die längsten Überlebenszeiten nach allogener Herztransplantation [60]. Im Gegensatz dazu konnten HI-MSC in Kombination mit MMF, verglichen mit den Ergebnissen aus der Kontrollgruppe, keine Verzögerung der Transplantatabstoßung bewirken. Es konnte sogar ein Trend hinsichtlich einer verfrühten Abstoßung der Organe beobachtet werden. Dies lässt darauf schließen, dass unter dem alleinigen Einfluss der Oberflächenstruktur der MSC unter Ausnahme ihrer sekretorischen Wirkung Prozesse gefördert werden, die zu einer beschleunigten Abstoßungsreaktion führen. Ein intakter Zellmetabolismus der MSC kann daher als unabdinglich für die im Rahmen der allogenen Herztransplantation

beobachteten abstoßungsverzögernden Effekte von MSC [101, 102, 104, 105] angesehen werden.

Da der Effekt von MSC von deren Erkennung durch Empfängerzellen und die darauf folgenden Reaktionen abhängig ist [103, 106], wurden zur näheren Charakterisierung der Oberflächenstruktur der HI-MSC FACS-Messungen durchgeführt, die einen reproduzierbaren, unterschiedlich ausgeprägten Verlust von einzelnen Oberflächenmarkern als Folge der Hitzeinaktivierung zeigten. Allen voran hierbei der Verlust der Marker MHC I und CD105, die von MSC unter nativen Bedingungen exprimiert werden [90, 107–109]. Dies steht in Kontrast zur von Luk et al. [90] beobachteten Konservierung des Immunophänotyps durch die Hitzeinaktivierung humaner MSC. Hier scheint demnach eine herabgesetzte Toleranz der Zelloberflächenmarker muriner Zellen im Vergleich zu Zellen humanen Ursprungs gegenüber der Hitzeexposition bei +50°C zu bestehen. Dies wirft die Frage auf, inwiefern diese Veränderungen Einfluss auf den Wirkmechanismus der murinen HI-MSC haben könnten.

MHC I stellt einen inhibitorischen Liganden für NK-Zellen dar [110]. NK-Zellen reagieren auf das Fehlen von Molekülen, die üblicherweise auf der Oberfläche von Zellen des Empfängers vorkommen [111]. Es konnte gezeigt werden, dass das Fehlen von MHC I folglich zur Aktivierung von NK-Zellen führt [112] und damit zur Apoptose der Zielzelle. Der Verlust von MHC I kann daher beruhend auf dieser „Missing-self-Hypothese“ zur beschleunigten Apoptose von Zellen führen. Die Beobachtungen von Luk et al. zeigen jedoch, dass HI-MSC keine Apoptose eingehen [91], weshalb dieser Mechanismus vermutlich als unbedeutend für die Erklärung der aufgezeigten Ergebnisse erachtet werden kann. Zudem zeigen MSC und HI-MSC nach i.v.-Applikation bei gesunden Mäusen eine vergleichbare Abnahme der im Körper nachweisbaren MSC nach i.v.-Applikation [90]. Daher kann eine verfrühte Elimination von HI-MSC verglichen mit MSC vermutlich nicht als Ursache für deren schlechtere Wirkung im Herztransplantationsmodell verantwortlich gemacht werden kann.

CD105 blieb bei den humanen MSC von Luk et al. [90] nach Hitzeschock weiter detektierbar. Das Glykoprotein ist Teil des TGFβ-Rezeptorkomplexes und an der Angiogenese beteiligt [113, 114]. Anderson et al. konnten *in vitro* eine effizientere Suppression der Proliferation von CD4⁺T-Zellen durch CD105⁻ murine MSC verglichen mit CD105⁺ MSC feststellen [115]. Dieser Effekt basierte auf der erhöhten Produktion von iNOS und IL-6 durch die MSC, weshalb dieser Mechanismus für die stoffwechsellinaktiven HI-MSC nicht in Frage kommt. Da in der vorliegenden Studie *in vitro* keine T-Zell-

Suppression durch HI-MSC festgestellt werden konnte (Abbildung 6) ist anzunehmen, dass CD105⁻ MSC nur bei intakter Stoffwechselaktivität zur effektiveren T-Zell-Suppression verglichen mit CD105⁺ MSC fähig sind. Auf stoffwechselunabhängige Formen der Wirkung von CD105⁻ MSC gibt es in der Literatur zum aktuellen Zeitpunkt noch keine Verweise. Um ein besseres Verständnis über den Wirkmechanismus von HI-MSC zu erlangen, erfordert es daher weitere Untersuchungen und eine detailliertere Beschreibung der Oberflächenmarker dieser Zellentität.

Da Monozyten wesentlich an der Vermittlung der immunmodulatorischen Effekte von MSC beteiligt sind [91] und sie zudem wichtige Akteure im Rahmen der Transplantatabstoßung darstellen [116], wurde der Effekt von HI-MSC auf diese Zellgruppe näher betrachtet. Konkret wurde die Inhibitionsfähigkeit von MSC bzw. HI-MSC auf Monozyten nach Lipopolysaccharid-Stimulation *in vitro* untersucht. Für Sekretomdefiziente HI-MSC ist bereits bekannt, dass sie ähnliche Effekte auf die systemischen Zytokinspiegel haben wie native MSC [103] und dass Monozyten zur Erkennung von HI-MSC fähig sind [90]. In Übereinstimmung damit konnte sowohl in der MSC- als auch in der HI-MSC-Gruppe eine Reduktion der TNF α -Produktion durch Monozyten nach Stimulation mit LPS gemessen werden. Da ein verfrühtes Absterben von Monozyten in Co-Kultur mit HI-MSC nachgewiesen werden konnte [117], ist dies als Ursache für diese Beobachtung in Erwägung zu ziehen. HI-MSC sind ebenso wie MSC zur Suppression der TNF α -Produktion durch LPS-stimulierte Monozyten *in vitro* fähig. Es stellt sich die Frage nach dem zugrundeliegenden Mechanismus, der im vorliegenden Herztransplantationsmodell für die Regulation der Monozyten *in vivo* verantwortlich ist.

MSC und HI-MSC weisen nach intravenöser Applikation das gleiche Verteilungsmuster auf und sind 2h nach Verabreichung in der Lunge lokalisierbar und nach 24h zu >99% nicht mehr detektierbar [90]. Es ist davon auszugehen, dass sie dort analog zu MSC phagozytiert werden. Die Phagozytose von MSC bewirkt die Polarisierung von Monozyten zu einem Subtyp mit antiinflammatorischen Eigenschaften [91, 118]. Zudem steigert die i.v.-Applikation von MSC die Phagozytoseaktivität von Monozyten [119]. Dies erlaubt den Schluss, dass die Phagozytose von infundierten MSC zu erhöhten Spiegeln an antiinflammatorischen Monozyten führen müsste, was Miteva et al. in einem Maus-Myokarditismodell belegen konnten [120]. Gesteigerte Phagozytose führt somit zur effektiveren Monozytenmodulation durch MSC.

Weiss et al. konnten zeigen, dass HI-MSC effizienter von Makrophagen erkannt bzw. phagozytiert werden als MSC. Weiters konnten HI-MSC einen überlegenen

antiinflammatorischen Effekt gegenüber MSC bei Sepsis durch Zökumpunktion bzw. mit MSC vergleichbare Ergebnisse nach Sepsisinduktion durch LPS-Stimulation hervorrufen.[90, 117] Diese Erkenntnisse indizieren, dass Phagozytose der maßgebliche Faktor für die durch HI-MSC hervorgerufene Modulation der Monozytenfunktion sein könnte. Die Zellapplikation erfolgte in diesem Sepsis-Modell intraperitoneal. So konnte ein Verbleiben der Zellen in der Lunge umgangen und eine direkte Zell-Zell-Interaktion am Ort des Geschehens herbeigeführt werden. Die Tiere aus der HI-MSC-Gruppe wiesen längere Überlebenszeiten auf als die der MSC-Gruppe [117]. Daher scheint allem voran die Kombination aus Hitzeinaktivierung und direkter Zellapplikation ins Zielgewebe vorteilhaft für die Vermittlung antiinflammatorischer Prozesse durch MSC zu sein. Dies steht im Einklang mit der beobachteten Suppression der TNF α -Spiegel durch HI-MSC *in vitro* (Abbildung 7). Aus diesem Grund kann angenommen werden, dass dieser Effekt auf direktem Zellkontakt der HI-MSC mit den Monozyten beruhte, da keine Interaktion durch Stoffwechselprodukte möglich war. Folglich ist anzunehmen, dass der Effekt von HI-MSC *in vivo* analog zu MSC [108] vom Verabreichungsweg der Zellen abhängig ist und dies bei der Auswahl des Einsatzgebietes von HI-MSC beachtet werden sollte.

Die intravenöse Zellverabreichung stellt im Herztransplantationsmodell einen etablierten Standard dar [61, 105]. Es konnte jedoch gezeigt werden, dass MSC nach direkter Injektion ins Gewebe bis zu vier Monate überleben [48] und nach intramyokardialer Injektion über zehn Wochen hinweg im Herz detektierbar bleiben [121], das Implantationsgewebe also nicht verließen. Verfolgt man die Theorie, dass HI-MSC ihre Wirkung auch nach lokaler Applikation effektiv entfalten können, wäre wohl auch im Rahmen der Herztransplantation ein alternativer Verabreichungsweg in Erwägung zu ziehen, wenn man auf stoffwechsellinaktive HI-MSC als Vermittler der Immunmodulation setzt. Da HI-MSC nicht wie vitale MSC agieren können, sollte überdacht werden, ob für MSC etablierte Verfahren analog auf HI-MSC angewandt werden sollten, oder ob es hier neuer Ansätze bedarf.

Für MSC ist bekannt, dass sie zum großen Teil innerhalb 24 Std. nach Transfusion absterben und von Monozyten in der Lunge phagozytiert werden, was die Expression von programmed death-ligand 1 (PD-L1) und IL-10 bewirkt, und die TNF α - und IL-17-Ausschüttung sinken lässt [91, 122]. Verantwortlich dafür ist eine Regulierung durch von MSC produziertem IL-6, HGF und IL-1RA, die eine Differenzierung von Monozyten und Makrophagen zu einem regulatorischen M2-Phänotyp mit antiinflammatorischer

Wirkung begünstigen [20, 68, 122, 123]. Da HI-MSC aufgrund ihrer metabolischen Inaktivität nicht mehr zur Sekretion fähig sind, muss davon ausgegangen werden, dass die Monozytenmodulation im vorliegenden Modell nicht in dieser Art stattgefunden hat.

Es ist eine enzymatische Aktivität der Oberfläche von HI-MSC hinsichtlich ihres Wirkmechanismus auf Monozyten in Betracht zu ziehen. MSC-Membranpartikel zeigten bei Goncalves et al. *in vitro* enzymatische Aktivität und dezimierten proinflammatorische CD14⁺CD16⁺ Monozyten durch Induktion selektiver Apoptose [124]. De Witte et al. konnten zeigen, dass die Phagozytose von MSC den Phänotyp von Monozyten sowohl *in vitro* als auch *in vivo* nachweislich verändert. Nach der Phagozytose von MSC wurde ein Shift der untersuchten Monozyten von einem klassischen CD14⁺⁺CD16⁻ Subtyp hin zu einem immunregulatorischen CD14⁺⁺CD16⁺ Intermediärtyp beobachtet. Sowohl Phagozytose als auch die Exposition der Monozyten gegenüber mit MSC vorkonditioniertem Medium konnten eine Veränderung des Phänotyps der Monozyten *in vitro* hervorrufen. Jedoch konnte nur durch Phagozytose von MSC durch Monozyten, nicht jedoch durch Kultivierung der Monozyten im vorkonditionierten MSC-Medium eine Hochregulation der Marker CD163 und CD206 nachgewiesen werden.[91] CD163, ein Scavenger-Rezeptor mit hoher Affinität für den Hämoglobin-Haptoglobin-Komplex, und der Mannose-Rezeptor CD206 werden mit immunregulatorischen Funktionen von Monozyten assoziiert [125, 126]. Die alleinige Exposition von Monozyten gegenüber von MSC produzierten löslichen Faktoren reicht demnach nicht aus, um das regulatorische Potenzial von MSC auf Monozyten vollständig auszuschöpfen, sondern erfordert die Phagozytose von MSC. Da Monozyten zur Erkennung von HI-MSC fähig sind [90], erscheint Phagozytose daher wiederholt als plausibler Mechanismus für die Erklärung des beobachteten Effektes von HI-MSC auf die Monozytenfunktion.

Die Versuchstiere der HI-MSC Gruppe wiesen ein signifikant geringeres Transplantatüberleben auf verglichen mit Tieren der PBS-Kontrollgruppe und der Gruppe, die ausschließlich MSC erhielt (Abbildung 8). Es ist daher davon auszugehen, dass durch HI-MSC Prozesse gefördert werden, die verglichen mit MSC eine Transplantatabstoßung begünstigen. Demzufolge ist anzunehmen, dass die durch MSC bewirkte Monozytenmodulation im Transplantationsmodell nach i.v.-Applikation der Zellen sowohl durch metabolische/sekretorische, als auch durch Zell-Zell-Kontakte vermittelt wird, was auch andere Arbeitsgruppen bereits zeigen konnten [90].

Wie gezeigt werden konnte, lässt sich zum Zeitpunkt der Transplantatabstoßung eine Invasion von CD3⁺ T-Zellen in die Organe beobachten (Abbildung 9). Diese Zellen nehmen eine zentrale Rolle in der Abstoßungsreaktion von Herztransplantaten ein [127–129]. Aus diesem Grund wurde der Effekt von HI-MSC auf T-Zellen näher betrachtet. Zu diesem Zweck wurden MLR durchgeführt, in denen, im Gegensatz zu MSC, keine Hemmung der T-Zell-Proliferation durch die HI-MSC nach allogener Stimulation der Lymphozyten beobachtet werden konnte (Abbildung 6). Auch Luk et al. konnten keine Inhibition der T-Zell Proliferation durch HI-MSC beobachten [90]. Bei Weiss et al. zeigte sich eine dosisabhängige Inhibition der Proliferation von CD3⁺ T-Zellen durch humane MSC, nicht jedoch durch HI-MSC [117]. Goncalves et al. untersuchten den Effekt von humanen MSC-Membranpartikeln ohne vorangehende Hitzeinaktivierung in der MLR und konnten auch dort keine Suppression der T-Zell-Proliferation feststellen [124]. Demnach scheint die Stoffwechselaktivität der MSC essenziell für deren proliferationshemmende Wirkung auf T-Zellen zu sein. Dies wurde von English et al. nachgewiesen, die ein Zusammenwirken von Zellkontakt sowie der Expression von PGE₂ und TGF-β₁ für die Induktion von CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺ T_{reg} durch MSC und damit verbundener Toleranzausbildung nachweisen konnten [130]. Daneben konntenIDO, damit verbundener Zellstress durch Tryptophanmangel und Stickstoffmonoxid (NO) als essenzielle Faktoren der Inhibition von T-Zellen durch MSC identifiziert werden, für deren Bildung ein intakter Zellmetabolismus obligat ist [72, 131, 132]. Humane HI-MSC haben demnach keinen Einfluss auf die Proliferation von T-Zellen und nur bei intakter Stoffwechseltätigkeit zeigen humane MSC proliferationshemmende Eigenschaften auf T-Zellen. Murine MSC weisen in dieser Hinsicht ein anderes Verhalten auf, da die murinen HI-MSC in der vorliegenden Studie in der MLR nicht nur keine Inhibition, sondern eine Steigerung der T-Zell-Proliferation bewirkten. Die Oberfläche von murinen HI-MSC wirkt allem Anschein nach also als Proliferationsstimulus auf T-Zellen, was sich mit der verkürzten Transplantatüberlebensdauer in der HI-MSC-Gruppe deckt.

MSC sind neben der Proliferationshemmung von T-Zellen auch zur Rekrutierung und Regulation von T_{reg} durch die Konversion von Effektor-T-Zellen zu T_{reg} fähig [64, 83, 133]. Direkter Zellkontakt durch den Inducible T-cell co-stimulator Ligand (ICOSL) erwies sich als obligat für die kontaktabhängige Regulation der durch MSC vermittelten T_{reg}-Induktion [134]. Es ist auch bekannt, dass die Expression vonIDO, TGF-β bzw. PD-1/PD-L1 durch MSC von Bedeutung ist für die Induktion von T_{reg} [64, 135], wozu

HI-MSC nicht fähig sind. Weiters zeigte sich die Anwesenheit von Monozyten und deren Sekretion von TGF- β 1 und CCL-18 als obligat für die Hochregulation von T_{reg}, da dieses Chemokin mitverantwortlich für die Bildung von T_{reg} aus Gedächtnis-T-Zellen ist [136–138]. Bekanntermaßen sind T_{reg} unabdinglich für die Aufrechterhaltung der Selbsttoleranz eines Organismus [139] und tragen durch die Suppression der Immunantwort auf Fremd-Antigene zur Transplantattoleranz bei [64, 140]. HI-MSC führen *in vitro* jedoch zu einem beschleunigten Absterben von Monozyten [117], was den erläuterten Prozess der T_{reg}-Bildung negativ beeinflussen könnte und so ebenfalls zur verminderten Transplantatakzeptanz durch HI-MSC beitragen könnte.

In abgestoßenen Nierentransplantaten konnten gewebständige CD8⁺ Gedächtnis-T-Zellen mit ausgeprägten Effektorfähigkeiten zur Produktion von TNF α und IFN γ , sowie hohen intrazellulären Spiegeln der Serinprotease Granzym B, nachgewiesen werden [141]. HI-MSC sind im Gegensatz zu MSC nicht dazu fähig die Expression von Granzym B durch allogene stimulierte CD8⁺ T-Zellen zu hemmen [117]. Granzym B ist ein grundlegender Mediator der Transplantatabstoßung [141, 142]. Im zeitlichen Verlauf werden die T-Zellen des Spenders im Organ zunehmend von alloreaktiven T-Zellen des Empfängers ersetzt [141], die wie beschrieben, ebenfalls nicht von HI-MSC gehemmt werden können. HI-MSC sind somit nicht in der Lage, auf diesen elementaren Mechanismus der Transplantatabstoßung Einfluss zu nehmen und so eine Abstoßungsreaktion zu verhindern.

Die metabolisch inaktiven HI-MSC in Kombination mit MMF zeigten einen Trend in Richtung eines verkürzten Transplantatüberlebens verglichen mit der MMF-Gruppe (Abbildung 8). Diese Beobachtung in Zusammenschau mit den aufgezeigten Effekten von HI-MSC auf T-Zellen lässt vermuten, dass die Ursache für die fehlende Wirkung von HI-MSC im Herztransplantationsmodell auf deren Unfähigkeit zur Sekretions- und Proliferationshemmung von T-Zellen beruht. Die Induktion von T_{reg} durch MSC liegt einem komplexen, noch nicht vollständig verstandenem Mechanismus zugrunde, der sowohl von Zellkontakt, löslichen Faktoren, der Induktion extrazellulärer Vesikeln, als auch von APC abhängt [143]. Dies lässt vermuten, dass HI-MSC möglicherweise nicht zur Hochregulation von T_{reg} fähig sein könnten, da sie die Transplantatakzeptanz nicht verbessern konnten. Es besteht daher Grund zur Annahme, dass die metabolische Aktivität der MSC einen unverzichtbaren Faktor für die T_{reg}-Induktion durch MSC darstellt und unterstreicht die Rolle der T_{reg} in der MSC-vermittelten Transplantattoleranz.

In der vorliegenden Studie erfolgte auf Basis der Ergebnisse vielversprechender *in vitro* Versuche mit humanen HI-MSC [90] der Einsatz von murinen HI-MSC in einem *in vivo* Modell. Es zeigten sich jedoch reproduzierbare Unterschiede im Oberflächenmarkerprofil der murinen HI-MSC im Vergleich zu den humanen, wie bereits vorangehend erläutert wurde. Luk et al. konnten keinen Anhalt für die Induktion von zellulärem Stress oder Apoptose durch die Hitzeinaktivierung von humanen MSC finden [90], was in der vorliegenden Arbeit nicht gesondert für murine MSC untersucht wurde. Jedoch lässt sich indirekt aufgrund des kompletten Fehlens der metabolischen Aktivität der HI-MSC darauf schließen.

Für die Zellakquise erfolgte die Ernte der Kulturen in den Passagen 4-6. Da MSC mit steigender Passage an Differenzierungspotential verlieren [144, 145], wäre eine Ernte in möglichst frühen Passagen, etwa 2-4, vorteilhaft, wobei dies erheblich höhere Zahlen an Spendertieren erforderlich machen würde. Arbeitsgruppen mit ähnlichem Versuchsaufbau verwendeten Zellen der Passagen 2-12 [90, 105], was den Vergleich von Ergebnissen mit diesen Studien daher durchaus zulässt.

In der vorliegenden Studie wurden die Effekte von hitzeinaktivierten MSC im Rahmen einer allogenen Organtransplantation *in vitro* und *in vivo* untersucht. Da kontinuierlich metabolisch aktive MSC zum Vergleich eingesetzt wurden, konnte beurteilt werden, für welche Prozesse mit großer Wahrscheinlichkeit die Stoffwechselaktivität der MSC bzw. deren Sekretom nötig ist, bzw. welche Effekte auf einer Erkennung der metabolisch inaktiven HI-MSC durch Zellen des Immunsystems beruhen könnten. Eine interessante Ergänzung der Ergebnisse würde einerseits eine Untersuchung des Sekretoms von metabolisch aktiven murinen MSC nach dem Vorbild von Luk et al. [90] darstellen. Darüber hinaus könnte durch eine detailliertere Charakterisierung des Oberflächenprofils hitzeinaktivierter MSC mehr Aufschluss über deren Interaktionspotenzial mit anderen Zellen erlangt werden.

4.1 Ausblick

Murine HI-MSC erwiesen sich als nicht förderlich für das Transplantatüberleben nach allogener Herztransplantation im Mausmodell. Hier scheinen vitale MSC deutlich überlegen zu sein.

Es konnte jedoch bereits gezeigt werden, dass es auch Voraussetzungen gibt, unter denen vitale Zellen einen eher ungünstigen Ausgang bewirken. So etwa konnte nach i.v.-Applikation von apoptotischen MSC im CLP-Sepsismodell von Ratten eine geringere Lungen- und Nierenschädigung, sowie eine Reduktion von oxidativem Stress, Apoptose und histopathologischen Veränderungen im Vergleich zur Verabreichung von lebenden MSC festgestellt werden [146]. Apoptotische MSC konnten bei Chang et al. die Mortalität in einem CLP-Sepsis Modell bei Ratten durch Senkung von TNF α , T-Helfer- und zytotoxischen T-Zellen vermindern. Durch vitale MSC konnte kein vergleichbarer Effekt beobachtet werden.[147] Apoptotische MSC zeigten sich in Kombination mit Melatonin überlegen in der Behandlung eines akuten Ischämie-Reperfusionsschadens der Lunge gegenüber vitalen MSC [148]. Die Phagozytose von apoptotischen MSC durch Makrophagen zeigte sich weiters als vorteilhaft für das Überleben hypoxischer Kardiomyozyten [106]. Zellvitalität bzw. aktiver Metabolismus scheinen demnach keine absoluten Voraussetzungen für die erfolgreiche Behandlung verschiedenster Krankheitsbilder mit MSC darzustellen. Es ist vielmehr anzunehmen, dass die Induktion einer langfristigen Transplantattoleranz durch MSC schlichtweg einen Einsatzbereich darstellt, für den ein Zellmetabolismus obligat ist, wie es bei den aufgezählten Erkrankungen jedoch nicht der Fall zu sein scheint.

Nicht nur die zu behandelnde Krankheit, auch die zu behandelnden Patienten stellen eine optimierungsfähige Variable in der Therapie mit MSC dar. Galleu et al. beobachteten, dass nur GvHD-Patienten mit hoher zytotoxischer Aktivität gegenüber MSC zu einer Reaktion auf die Infusion mit MSC fähig waren, nicht aber Patienten mit geringer zytotoxischer Zellaktivität [92]. Dies indiziert, dass der Behandlung von Patienten mit MSC eine Evaluation ihrer Reaktionsfähigkeit auf MSC vorausgehen sollte, um bestmögliche Erfolgsaussichten zu gewähren und vermeidbare Nebenwirkungen reduzieren zu können.

Vor dem Hintergrund eine Alternative für metabolisch aktive MSC zu finden, stellen auch MSC-Membranpartikel eine vielversprechende Option dar, da für diese *in vitro* eine Induktion selektiver Apoptose von Monozyten, sowie enzymatische Aktivität nachgewiesen werden konnte [124].

Durch die Präaktivierung von MSC mit TNF α , IFN γ und IL-1 β zeigte sich *in vitro* ein verstärktes immunmodulatorisches Potenzial [149, 150]. Der Einsatz solcher präaktivierter MSC zur Hitzeinaktivierung könnte daher ebenfalls einen Ansatzpunkt für künftige Experimente darstellen. Auch Genmodifikation bietet einen Ansatz zur

Optimierung des therapeutischen Effekts durch MSC im Rahmen der Organtransplantation [151–154] und könnte Gegenstand nachfolgender Forschung mit MSC bzw. HI-MSC sein.

Um einen effektiven, sicheren und zielgerichteten Einsatz von HI-MSC ermöglichen zu können, erfordert es jedoch ein besseres Verständnis der Funktionsweise von MSC bzw. HI-MSC als es zum aktuellen Zeitpunkt der Fall ist. Zukünftige Forschung sollte sich daher der detaillierten Aufklärung der Kommunikationsmechanismen von MSC auf zellulärer Ebene widmen, um so potenzielle Einsatzgebiete für HI-MSC identifizieren zu können.

5 Zusammenfassung

In der vorliegenden Studie wurde der Einsatz von hitzeinaktivierten mesenchymalen Stammzellen in einem Modell allogener, heterotoper Herztransplantation bei Mäusen evaluiert. Ergänzend wurden *in vitro* Versuche durchgeführt, um den Wirkmechanismus der HI-MSC besser nachvollziehen zu können. Es sollte gezeigt werden, ob für die bereits bekannte MSC-vermittelte Abschwächung der Transplantatabstoßung die metabolische Aktivität von MSC vonnöten ist.

Durch die Hitzeinaktivierung für 30min bei +50°C wurde eine vollständige, irreversible metabolische Inaktivität der MSC erreicht, was mittels MTT-Assay nachgewiesen werden konnte. Durchflusszytometrische Messungen der HI-MSC zeigten einen reproduzierbaren Signalverlust bzw. -rückgang einzelner Marker, wodurch nachgewiesen werden konnte, dass die Hitzebehandlung die Oberflächenstruktur der HI-MSC teilweise verändert. Durch eine Immunfluoreszenzfärbung abgestoßener Organe konnte die Invasion von CD3⁺ T-Lymphozyten zum Zeitpunkt der Transplantatabstoßung nachgewiesen werden und somit deren essenzielle Rolle im Rahmen der Transplantatabstoßung gezeigt werden. *In vitro* zeigte sich - im Gegensatz zu vitalen MSC - ein proliferationsfördernder Effekt von HI-MSC auf T-Lymphozyten nach allogener Stimulation. Sowohl MSC als auch HI-MSC hatten *in vitro* einen inhibitorischen Effekt auf LPS-stimulierte Monozyten, der durch verminderte Konzentrationen an TNF α mittels ELISA nachgewiesen werden konnte. HI-MSC sind folglich dazu in der Lage, durch Zell-Zell-Kontakt eine Modulation der Monozytenfunktion herbeizuführen. Durch den Einsatz von HI-MSC im Rahmen der Herztransplantation konnte kein verlängertes Transplantatüberleben erzielt werden. Ein Trend in Richtung eines verkürzten Überlebens verglichen mit der Kontrollgruppe wurde beobachtet.

Diese Ergebnisse zeigen, dass der immunmodulatorische Effekt von MSC im Herztransplantationsmodell der Maus eines intakten Zellmetabolismus bedarf.

6 Anhang

6.1 Abkürzungsverzeichnis

27G	Kanüle mit einem Durchmesser von 27 Gauge
A.	Arterie
Abb.	Abbildung
Balb/c	Maus: Balb/c AnNCrl
BMDM	Bone marrow derived monocytes
bzw.	beziehungsweise
C57BL/6J	Maus: C57BL/6J „Black 6“
CD	Cluster of differentiation
CLP	Cecal Ligation and Puncture
Corp.	Corporation
DAPI	4',6-Diamidin-2-phenylindol
DMEM	Dulbecco's modified Eagle's medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure („deoxyribonucleic acid“)
DC	Dendritische Zellen
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
eGFR	estimated GFR, geschätzte glomeruläre Filtrationsrate
et al.	et aliud
FCS	Fetal Calf Serum
FITC	Fluorescein Isothiocyanat
HGF	Hepatocyte Growth Factor
HLA	Human Leukocyte Antigen
HSC	Hämatopoietische Stammzellen
i.v.	intravenös
ICAM-1	Intracellular adhesion molecule 1
IDO	Indolamin-2,3-dioxygenase
Ig	Immunglobulin

IGF1	Insulin-like growth factor 1
IL	Interleukin
IL-1RA	Interleukin-1 Rezeptor Antagonist
Inc.	Incorporation
INF	Interferon
IRI	Ischaemia Reperfusion Injury
Kg	Kilogramm
KG	Körpergewicht
KGF	Keratinocyte Growth Factor
LPS	Lipopolysaccharide
M	Mol
MCP-2	Monocyte Chemotactic Protein-2
MEM	Minimum Essential Medium Eagle
MELD	Model of End Stage Liver Disease
MHC	Major Histocompatibility Complex
min	Minute(n)
MiSOT	Mesenchymal Stem Cells in Solid Organ Transplantation
ml	Milliliter
MLR	Mixed lymphocyte reaction
MMF	Mycofenolat-Mofetil
MSC	Mesenchymal Stem Cell/s
MTT	3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid
NK-Zellen	natürliche Killerzellen
PGE ₂	Prostaglandin E ₂
PBS	Phosphate-Buffered Saline
PE	Phycoerythrin
ROS	reaktive oxygen species
rpm	rounds per minute
Tab.	Tabelle
TGF	Transforming growth factor
Th-Zellen	T-Helferzellen
TLR	Toll like Rezeptoren
TSG-6	TNF-stimulated gene 6 protein
TNF	Tumornekrosefaktor

T _{reg}	regulatorische T-Zelle
V.	Vene
VCAM-1	Vascular Cell Adhesion Molecule 1

6.2 Verbrauchsmaterialien

6 well Cell Culture Cluster	Corning Inc., Corning USA
96 well cell culture plate	Corning Inc., Corning USA
BioCoat Control Inserts 24-Well Plate	BD Biosciences
BD Microlance 20G	Becton, Dickinson and Company Ltd, Ireland
BD Plastik 1ml Test	Becton, Dickinson and Company Ltd, Ireland
Cellstar 2ml	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen
Cellstar Tubes 15ml	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen
Cellstar Tubes 50ml	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen
Combitips 0,2ml	Eppendorf, Hamburg
Corning 175 cm ² Cell Culture Flask	Corning Incorporated, Corning USA
Corning 75 cm ² Vell Culture Flask	Corning Incorporated, Corning USA
Dafilon 11/0 nichtresorbierbares chirurgisches Nahtmaterial	B. Braun Surgical, Melsungen
Einmal-Injektionskanülen (27G)	Becton Dickson, USA
Eppendorf Cups 1,5ml	Eppendorf, Hamburg
Eppendorf Cups 2ml	Eppendorf, Hamburg
FACS-Röhrchen	Sarstedt, Nümbrecht
Fixierpflaster	3M, Neuss
Handschuhe NeoTouch	Ansell Healthcare, Brüssel
HTS Transwell-96 Well Permeable Support System	Corning Inc.
Kompressen	Hartmann, Heidenheim
Millipore Steriflip 100 µm	Merck Millipore Corporation, Billerica
Millipore Steriflip 22µm	Merck Millipore Corporation, Billerica
Multiwell 12 well	Becton Dickinson Labware, France
Primaria Tissue Culture Flask 250 ml	Becton Dickinson Labware Europe, France

Pipettenspitze nerbe plus 1000µl	Nerbe plus GmbH, Winsen
Safe Seal SurPhop Spitzen 10µl	Biozym Scientific GmbH
Safe Seal SurPhop Spitzen 20µl	Biozym Scientific GmbH
Safe Seal SurPhop Spitzen 100µl	Biozym Scientific GmbH
Safe Seal SurPhop Spitzen 200µl	Biozym Scientific GmbH
Serological Pipette 10ml	nerbe plus, Germany
Serological Pipette 25ml	nerbe plus, Germany
Serological Pipette 50ml	nerbe plus, Germany
Serological Pipette 5ml	nerbe plus, Germany
Serological Pipette 2ml	nerbe plus, Germany

6.3 Chemikalien und Reagenzien

2-Mercaptoethanol 50mM	Life Technologies Corporation, NY
2-Propanol 70%	Braun, Melsungen
β-Glycerophosphat	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
CellCept 500mg (Mycophenolat-Mofetil)	Roche Basel, Schweiz
Cell Proliferation dye eFlour670 APC	eBioscience Inc., USA
Collagenase Type 4 305u/mg	Worthington
Color Reagent A	R&D Systems, Minneapolis
Color Reagent B	R&D Systems, Minneapolis
DAPI	Sigma Aldrich, St. Louis
DAKO fluorescence mounting medium	Dako Omnis/Agilent, CA, USA
Dexamethason	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
DMSO	Carl Roth GmbH u. Co.KG, Karlsruhe
Dulbecco's Phosphate Buffered saline	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Enzyme Reagent SAv-HRP	BD Biosciences
Erythrocyte lysis buffer	Qiagen GmbH, Hilden
Fetal Bovine Serum	Life technologies Corporation, NY
Foxp3 Staining Buffer Set	eBioscience Affymetrix Inc., San Diego
Heparin 25000 I.E./5ml	Rotexmedica GmbH, Trittau

IBMX	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
H ₂ SO ₄	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
HEPES	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Indomethacin	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Insulin	Lilly Deutschland GmbH
Isopropylalkohol 99,8%	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Isotone Natriumchloridlösung 0,9%:	Braun, Melsungen
Ketamin 10%	Bela Pharma GmbH & Co.KG, Vechta
L-Ascorbinsäure	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
L-Glutamine 200mM	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Lipopolysaccharid	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
LIVE/DEAD Fixable Aqua Dead Cell Stain	ThermoFisher Scientific
M-CSF	PeptoTech
MEM Non-essential Amino acid Solution (100x)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
MEM Vitamin Solution	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Minimum Essential Medium Eagle	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
MTT	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Oil RedO	Fluka Chemie GmbH, Buchs
Penicillin-Streptomycin	Sigma-Aldrich Chemie-GmbH, Steinheim
Pyrogallol 99% A.C.S reagent	Sigma-Aldrich Chemie-GmbH, Steinheim
RPMI 1640 Medium	Life Technologies Corporation, NY
Silver nitrate	Sigma-Aldrich Chemie-GmbH, Steinheim
Sodium Pyruvat Solution	Sigma-Aldrich Life Science, UK
Sodium thiosulfate	Sigma-Aldrich Chemie-GmbH, Steinheim
Sofasept N	Braun, Melsungen

Trypan Blue Solution (0,4%)	Sigma-Aldrich Chemie-GmbH, Steinheim
Trypsin-EDTA Solution	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Tween	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Xylazin 2%	Serumwerk Bernburg AG, Bernburg

6.4 Antikörper

Anti-Mouse CD3e	eBioscience Inc., USA
Anti-Mouse CD3e PE	eBioscience Inc., USA
Anti-Mouse CD4 PE	eBioscience Inc., USA
FITC anti-mouse Ly-6A/E	Becton Dickinson Co
Anti-Mouse CD73 PE	eBioscience Inc., USA
Anti-Mouse CD11b eFluor 450	eBioscience Inc., USA
APC Rat Anti-Mouse CD44	BD Biosciences
Anti-Mouse/Rat CD29 APC	eBioscience Inc., USA
Anti-Mouse CD105 PE	eBioscience Inc., USA
Anti-Mouse CD106 FITC	eBioscience Inc., USA
Capture Antibody Purified Anti-Mouse TNF	BD Biosciences
Detection Antibody Biotin Anti-Mouse TNF	BD Biosciences
rabbit anti-CD3G monoclonal antibody, EPR4517	Abcam, Cambridge, UK
Cy TM 3 AffiniPure F(ab') ₂ Fragment Donkey Anti-Rabbit IgG (H+L)	Jackson ImmunoResearch Europe Ltd, UK
Anti-Mouse MHC Class I (H-2Kb) FITC (clone AF6-88.5.5.3)	eBioscience Inc., USA
Anti-Mouse MHC Class II I-Ab APC (clone AF6-120.1)	eBioscience Inc., USA

6.5 Instrumente und sonstige Materialien

Anlegezange	Aesculap, Tuttlingen
-------------	----------------------

Feine Schere	Aesculap, Tuttlingen
Feine Arterienklemmen	Aesculap, Tuttlingen
Immedge™ pen	Vector Laboratories, CA
Knüpf-Pinzetten	Pilling/Meck/Teleflex Medical
Mikro-Federschere mit Flachgriff	Aesculap, Tuttlingen
Mikro-Nadelhalter mit Rundgriff	Pilling/Meck/Teleflex Medical
Mini-Aneurysmen-Clips	Aesculap, Tuttlingen
Multipette Stepper	Eppendorf, Hamburg
Nalgene Cryo 1°C Freezing Container	Nalge Nunc International
Präparier- und Strabismusschere	Aesculap, Tuttlingen
Pinzette	F.S.T.
Pipette Eppendorf Research 1000µl	Eppendorf, Hamburg
Pipette Eppendorf Research 10µl	Eppendorf, Hamburg
Pipette Eppendorf Research 20µl	Eppendorf, Hamburg
Pipette Eppendorf Research 200µl	Eppendorf, Hamburg
Pipette Eppendorf Research 100µl	Eppendorf, Hamburg
Pipetus	Hirschmann Laborgeräte
Zählkammer	Neubauer Improved

6.6 Geräte

BD FACSCanto II	Becton, Dickinson and Company
Mikroskop (Axio Observer Z1)	Zeiss, Jena
OP-Mikroskop	Zeiss, Jena
Top Mix	Fisher Bioblock Scientific
Wasserbad W13	Haake
Tischzentrifuge 5415D	Eppendorf, Hamburg
Wasserbad SW-20C	Julabo, Seelbach
Zentrifuge Megafuge 1.OR	Haereus Instruments

6.7 Programme

Adobe Acrobat Reader DC	Adobe
-------------------------	-------

Citavi 5	Swiss Academic Software
GraphPad Prism Version 7.03	GraphPad Software
FlowJo V7.1.3	Tree Star
Microsoft Excel 2013, 2015	Microsoft Corporation
Microsoft Word 2013, 2015	Microsoft Corporation

6.8 Abbildungen



Abbildung 10: Die plastikadhärenten MSC weisen lichtmikroskopisch eine Spindelform auf

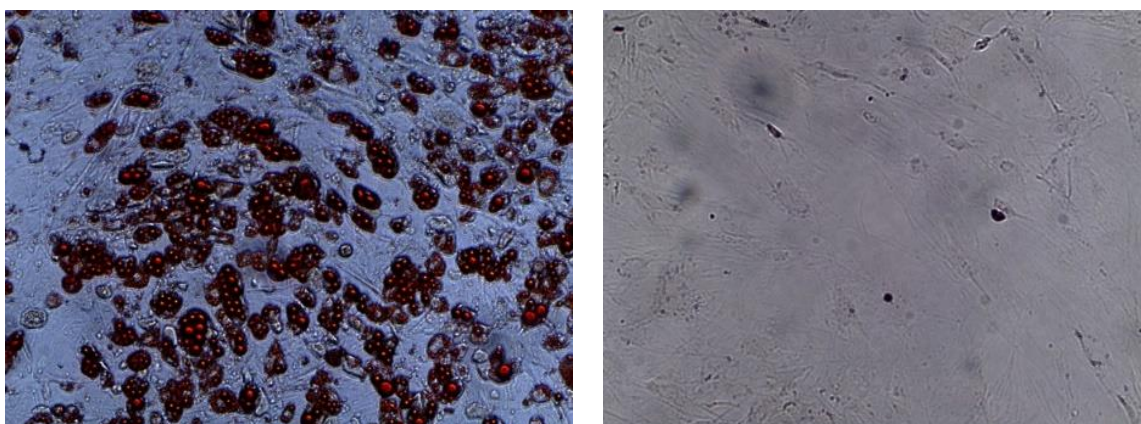


Abbildung 11: Adipozytennachweis mit Red-Oil-O bei MSC nach einer Woche Inkubation mit Differenzierungsmedium (links) und normalem Zellkulturmedium als Kontrollgruppe (rechts): Die zu Adipozyten

differenzierten MSC nehmen den Farbstoff auf und weisen im Gegensatz zu den undifferenzierten MSC eine deutliche Rotfärbung auf. (Vergrößerung 20x)

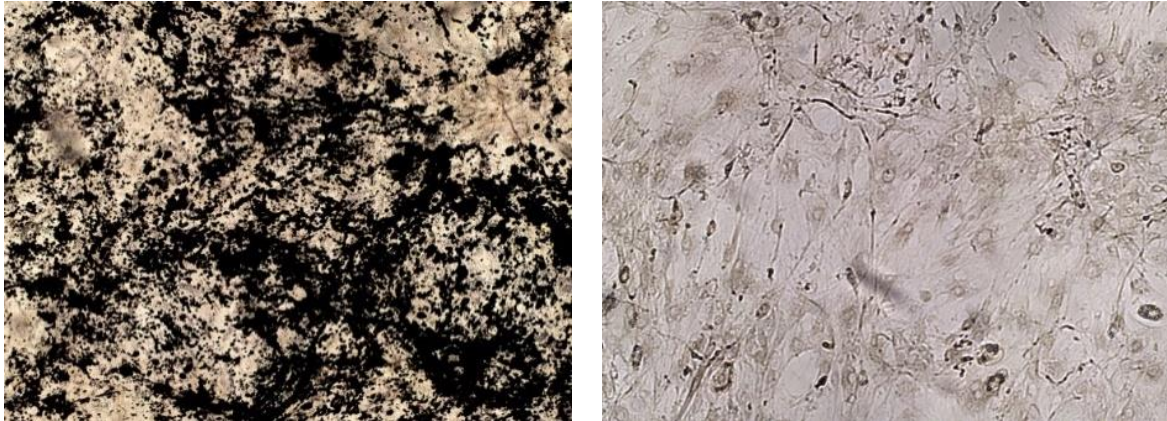


Abbildung 12: Kossa-Assay bei MSC nach zweiwöchiger Differenzierung (links) und der Kontrollgruppe mit normalem Zellkulturmedium (rechts): Die zu Osteoblasten ausdifferenzierten MSC färben sich deutlich schwarz an, wohingegen die MSC weitestgehend farblos bleiben. (Vergrößerung 10x)

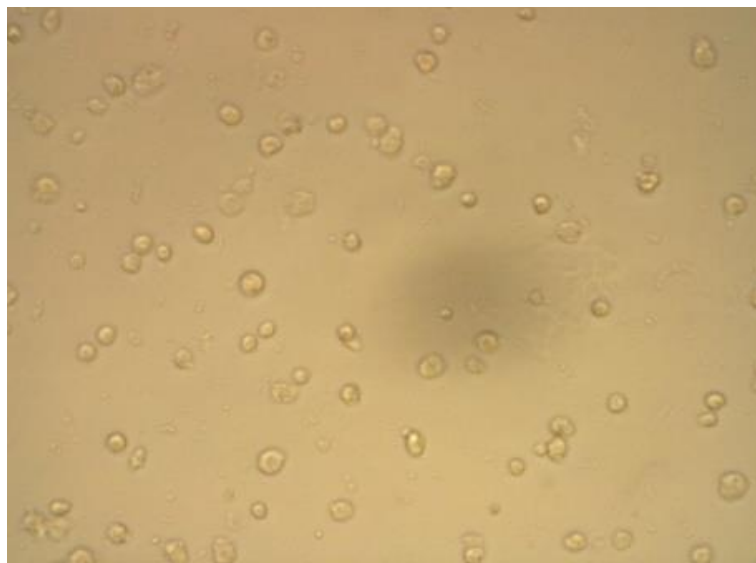


Abbildung 13: Die hitzeinaktivierten MSC verlieren ihre Plastikadhärenz und kommen lichtmikroskopisch rundlich zur Darstellung.

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, März 2021

Elisabeth Geißler

Literaturverzeichnis

- [1] Organspende. Die Geschichte der Organ- und Gewebetransplantation beginnt vor vielen Jahrtausenden; 2020 [cited 2020 June 3] Available from: URL: <https://www.organspende-info.de/zahlen-und-fakten/geschichte.html>.
- [2] Eurotransplant. Eurotransplant Statistical Report 2017.
- [3] Dahlke MH, Hoogduijn M, Eggenhofer E, *et al.* Toward MSC in solid organ transplantation: 2008 position paper of the MISOT study group. *Transplantation* 2009; 88(5): 614–9
[<https://doi.org/10.1097/TP.0b013e3181b4425a>][PMID: 19741455]
- [4] Busauschina A, Schnuelle P, van der Woude FJ. Cyclosporine nephrotoxicity. *Transplant Proc* 2004; 36(2 Suppl): 229S-233S
[<https://doi.org/10.1016/j.transproceed.2004.01.021>][PMID: 15041343]
- [5] Amboss. Immunsuppressiva [cited 2019 May 28] Available from: URL: <https://www.amboss.com/de/library#xid=qM0Cpg&anker=Zc6763ba41b01703be22b571f211ad6ac>.
- [6] Geissler EK, Schlitt HJ. The relation between immunosuppressive agents and malignancy. *Current Opinion in Organ Transplantation* 2004; 9(4): 394–9
[<https://doi.org/10.1097/01.mot.0000146559.20280.29>]
- [7] CD W, *al e.* The janus face of immunosuppression - de novo malignancy after renal transplantation: the experience of the Transplantation Center Munich. - PubMed - NCBI [cited 2018 November 12] Available from: URL: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17332737>.
- [8] Desai R, Neuberger J. Donor transmitted and de novo cancer after liver transplantation. *World J Gastroenterol* 2014; 20(20): 6170–9
[<https://doi.org/10.3748/wjg.v20.i20.6170>][PMID: 24876738]
- [9] Glennie S, Soeiro I, Dyson PJ, Lam EW-F, Dazzi F. Bone marrow mesenchymal stem cells induce division arrest anergy of activated T cells. *Blood* 2005; 105(7): 2821–7
[<https://doi.org/10.1182/blood-2004-09-3696>][PMID: 15591115]
- [10] Pittenger MF, Mackay AM, Beck SC, *et al.* Multilineage Potential of Adult Human Mesenchymal Stem Cells. *Science* 1999: 143–7.
- [11] Lee J-H, Kemp DM. Human adipose-derived stem cells display myogenic potential and perturbed function in hypoxic conditions. *Biochem Biophys Res Commun* 2006; 341(3): 882–8
[<https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2006.01.038>][PMID: 16442498]
- [12] Lee W-CC, Rubin JP, Marra KG. Regulation of alpha-smooth muscle actin protein expression in adipose-derived stem cells. *Cells Tissues Organs* 2006; 183(2): 80–6
[<https://doi.org/10.1159/000095512>][PMID: 17053324]
- [13] Corre J, Barreau C, Cousin B, *et al.* Human subcutaneous adipose cells support complete differentiation but not self-renewal of hematopoietic progenitors. *Journal of Cellular Physiology* 2006; 208(2): 282–8
[<https://doi.org/10.1002/jcp.20655>][PMID: 16619234]

- [14] Planat-Bénard V, Menard C, André M, *et al.* Spontaneous cardiomyocyte differentiation from adipose tissue stroma cells. *Circulation research* 2004; 94(2): 223–9
[<https://doi.org/10.1161/01.RES.0000109792.43271.47>][PMID: 14656930]
- [15] Huat TJ, Khan AA, Pati S, Mustafa Z, Abdullah JM, Jaafar H. IGF-1 enhances cell proliferation and survival during early differentiation of mesenchymal stem cells to neural progenitor-like cells. *BMC neuroscience* 2014; 15: 91
[<https://doi.org/10.1186/1471-2202-15-91>][PMID: 25047045]
- [16] Păunescu V, Deak E, Herman D, *et al.* In vitro differentiation of human mesenchymal stem cells to epithelial lineage. *J Cell Mol Med* 2007; 11(3): 502–8
[<https://doi.org/10.1111/j.1582-4934.2007.00041.x>][PMID: 17635641]
- [17] Hong SH, Gang EJ, Jeong JA, *et al.* In vitro differentiation of human umbilical cord blood-derived mesenchymal stem cells into hepatocyte-like cells. *Biochem Biophys Res Commun* 2005; 330(4): 1153–61
[<https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2005.03.086>][PMID: 15823564]
- [18] Timper K, Seboek D, Eberhardt M, *et al.* Human adipose tissue-derived mesenchymal stem cells differentiate into insulin, somatostatin, and glucagon expressing cells. *Biochem Biophys Res Commun* 2006; 341(4): 1135–40
[<https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2006.01.072>][PMID: 16460677]
- [19] Aggarwal S, Pittenger MF. Human mesenchymal stem cells modulate allogeneic immune cell responses. *Blood* 2005; 105(4): 1815–22
[<https://doi.org/10.1182/blood-2004-04-1559>][PMID: 15494428]
- [20] Eggenhofer E, Hoogduijn MJ. Mesenchymal stem cell-educated macrophages. *Transplant Res* 2012; 1(1): 12
[<https://doi.org/10.1186/2047-1440-1-12>][PMID: 23369493]
- [21] Batten P, D P, Sarathchandra P, *et al.* Human Mesenchymal Stem Cells Induce T Cell Anergy and Downregulate T Cell Allo-Responses via the TH2 Pathway: Relevance to Tissue Engineering Human Heart Valves. *Tissue Engineering* 2006; 12(8): 2263–73.
- [22] Friedenstein, A. J. P.-S. I., Petrakova, K. V. Osteogenesis in transplants of bone marrow cells. *The Journal of Embryological Experimental Morphology* 1966; (16): 381–90.
- [23] Friedenstein AJ, Petrakova KV, Kurolesova AI, Frolova GP. Heterotopic of bone marrow. Analysis of precursor cells for osteogenic and hematopoietic tissues. *Transplantation* 1968; 6(2): 230–47
[PMID: 5654088]
- [24] Mesenchymal stem cells.
- [25] Bartholomew A, Sturgeon C, Siatskas M, *et al.* Mesenchymal stem cells suppress lymphocyte proliferation in vitro and prolong skin graft survival in vivo. *Experimental Hematology* 2002; 30(1): 42–8
[[https://doi.org/10.1016/S0301-472X\(01\)00769-X](https://doi.org/10.1016/S0301-472X(01)00769-X)]
- [26] Popp FC, Slowik P, Eggenhofer E, *et al.* No contribution of multipotent mesenchymal stromal cells to liver regeneration in a rat model of prolonged hepatic injury. *Stem Cells* 2007; 25(3): 639–45
[<https://doi.org/10.1634/stemcells.2006-0515>][PMID: 17110617]

- [27] Caplan AI. Mesenchymal stem cells. *J Orthop Res* 1991; 9(5): 641–50
[<https://doi.org/10.1002/jor.1100090504>][PMID: 1870029]
- [28] Hoogduijn MJ, Crop MJ, Peeters AMA, *et al.* Human heart, spleen, and perirenal fat-derived mesenchymal stem cells have immunomodulatory capacities. *Stem Cells Dev* 2007; 16(4): 597–604
[<https://doi.org/10.1089/scd.2006.0110>][PMID: 17784833]
- [29] Karnoub AE, Dash AB, Vo AP, *et al.* Mesenchymal stem cells within tumour stroma promote breast cancer metastasis. *Nature* 2007; 449(7162): 557–63
[<https://doi.org/10.1038/nature06188>][PMID: 17914389]
- [30] Djouad F, Bony C, Apparailly F, Louis-Plence P, Jorgensen C, Noël D. Earlier onset of syngeneic tumors in the presence of mesenchymal stem cells. *Transplantation* 2006; 82(8): 1060–6
[<https://doi.org/10.1097/01.tp.0000236098.13804.0b>][PMID: 17060855]
- [31] Djouad F, Plence P, Bony C, *et al.* Immunosuppressive effect of mesenchymal stem cells favors tumor growth in allogeneic animals. *Blood* 2003; 102(10): 3837–44
[<https://doi.org/10.1182/blood-2003-04-1193>][PMID: 12881305]
- [32] Zhu W, Xu W, Jiang R, *et al.* Mesenchymal stem cells derived from bone marrow favor tumor cell growth in vivo. *Exp Mol Pathol* 2006; 80(3): 267–74
[<https://doi.org/10.1016/j.yexmp.2005.07.004>][PMID: 16214129]
- [33] Murphy JM, Fink DJ, Hunziker EB, Barry FP. Stem cell therapy in a caprine model of osteoarthritis. *Arthritis Rheum* 2003; 48(12): 3464–74
[<https://doi.org/10.1002/art.11365>][PMID: 14673997]
- [34] Ando W, Tateishi K, Hart DA, *et al.* Cartilage repair using an in vitro generated scaffold-free tissue-engineered construct derived from porcine synovial mesenchymal stem cells. *Biomaterials* 2007; 28(36): 5462–70
[<https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2007.08.030>][PMID: 17854887]
- [35] Horwitz EM, Prockop DJ, Fitzpatrick LA, *et al.* Transplantability and therapeutic effects of bone marrow-derived mesenchymal cells in children with osteogenesis imperfecta. *Nat Med* 1999; 5(3): 309–13
[<https://doi.org/10.1038/6529>][PMID: 10086387]
- [36] Quarto Rodolfo, Mastrogiacomo Maddalena, Cancedda Ranieri, *et al.* Repair of Large Bone Defects with the Use of Autologous Bone Marrow Stromal Cells. *New England Journal of Medicine* 2001; 344(5): 385–6.
- [37] Omer N. Koç, Stanton L. Gerson, Brenda W. Cooper, *et al.* Rapid Hematopoietic Recovery After Coinfusion of Autologous-Blood Stem Cells and Culture-Expanded Marrow Mesenchymal Stem Cells in Advanced Breast Cancer Patients Receiving High-Dose Chemotherapy.
- [38] Koc ON, Gerson SL, Cooper BW, *et al.* Rapid hematopoietic recovery after coinfusion of autologous-blood stem cells and culture-expanded marrow mesenchymal stem cells in advanced breast cancer patients receiving high-dose chemotherapy. *J Clin Oncol* 2000; 18(2): 307–16
[<https://doi.org/10.1200/JCO.2000.18.2.307>][PMID: 10637244]

- [39] Jiang W, Ma A, Wang T, *et al.* Intravenous transplantation of mesenchymal stem cells improves cardiac performance after acute myocardial ischemia in female rats. *Transpl Int* 2006; 19(7): 570–80
[<https://doi.org/10.1111/j.1432-2277.2006.00307.x>][PMID: 16764636]
- [40] Mirotsov M, Zhang Z, Deb A, *et al.* Secreted frizzled related protein 2 (Sfrp2) is the key Akt-mesenchymal stem cell-released paracrine factor mediating myocardial survival and repair. *PNAS* 2007; 104(5): 1643–8.
- [41] Németh K, Leelahavanichkul A, Yuen PST, *et al.* Bone marrow stromal cells attenuate sepsis via prostaglandin E2-dependent reprogramming of host macrophages to increase their interleukin-10 production. *Nat Med* 2008; 15(1): 42–9
[<https://doi.org/10.1038/nm.1905>]
- [42] Okamoto R, Yajima T, Yamazaki M, *et al.* Damaged epithelia regenerated by bone marrow-derived cells in the human gastrointestinal tract. *Nat Med* 2002; 8(9): 1011–7
[<https://doi.org/10.1038/nm755>][PMID: 12195435]
- [43] Akiyama K, Chen C, Wang D, *et al.* Mesenchymal-Stem-Cell-Induced Immunoregulation Involves FAS-Ligand-/FAS-Mediated T Cell Apoptosis. *Cell Stem Cell* 2012; 10(5): 544–55
[<https://doi.org/10.1016/j.stem.2012.03.007>]
- [44] Chang J-W, Tsai H-L, Chen C-W, *et al.* Conditioned mesenchymal stem cells attenuate progression of chronic kidney disease through inhibition of epithelial-to-mesenchymal transition and immune modulation. *J. Cell. Mol. Med.* 2012; 16(12): 2935–49
[<https://doi.org/10.1111/j.1582-4934.2012.01610.x>]
- [45] Popp FC, Renner P, Eggenhofer E, *et al.* Mesenchymal stem cells as immunomodulators after liver transplantation. *Liver Transpl* 2009; 15(10): 1192–8
[<https://doi.org/10.1002/lt.21862>][PMID: 19790154]
- [46] da Silva Meirelles L. Mesenchymal stem cells reside in virtually all post-natal organs and tissues. *Journal of cell science* 2006; 119(11): 2204–13
[<https://doi.org/10.1242/jcs.02932>][PMID: 16684817]
- [47] Eggenhofer E, Luk F, Dahlke MH, Hoogduijn MJ. The life and fate of mesenchymal stem cells. *Front Immunol* 2014; 5: 148
[<https://doi.org/10.3389/fimmu.2014.00148>][PMID: 24904568]
- [48] Muñoz MF, Argüelles S, Guzman-Chozas M, *et al.* Cell tracking, survival, and differentiation capacity of adipose-derived stem cells after engraftment in rat tissue. *Journal of Cellular Physiology* 2018; 233(10): 6317–28
[<https://doi.org/10.1002/jcp.26439>][PMID: 29319169]
- [49] Hoogduijn MJ, Verstegen MMA, Engela AU, *et al.* No Evidence for Circulating Mesenchymal Stem Cells in Patients with Organ Injury. *Stem Cells Dev* 2014; 23(19): 2328–35
[<https://doi.org/10.1089/scd.2014.0269>][PMID: 25105211]
- [50] Fischer UM, Harting MT, Jimenez F, *et al.* Pulmonary passage is a major obstacle for intravenous stem cell delivery: the pulmonary first-pass effect. *Stem Cells Dev* 2009; 18(5): 683–92
[<https://doi.org/10.1089/scd.2008.0253>][PMID: 19099374]

- [51] Kidd S, Spaeth E, Dembinski JL, *et al.* Direct evidence of mesenchymal stem cell tropism for tumor and wounding microenvironments using in vivo bioluminescent imaging. *STEM CELLS* 2009; 27(10): 2614–23
[<https://doi.org/10.1002/stem.187>][PMID: 19650040]
- [52] Eggenhofer E, Benseler V, Kroemer A, *et al.* Mesenchymal stem cells are short-lived and do not migrate beyond the lungs after intravenous infusion. *Front Immunol* 2012; 3: 297
[<https://doi.org/10.3389/fimmu.2012.00297>][PMID: 23056000]
- [53] Saat TC, van den Engel S, Bijman-Lachger W, *et al.* Fate and Effect of Intravenously Infused Mesenchymal Stem Cells in a Mouse Model of Hepatic Ischemia Reperfusion Injury and Resection. *Stem Cells Int* 2016; 2016: 5761487
[<https://doi.org/10.1155/2016/5761487>][PMID: 26981132]
- [54] Uccelli A, Moretta L, Pistoia V. Mesenchymal stem cells in health and disease. *Nat Rev Immunol* 2008; 8(9): 726–36
[<https://doi.org/10.1038/nri2395>][PMID: 19172693]
- [55] Squillaro T, Peluso G, Galderisi U. Clinical Trials With Mesenchymal Stem Cells: An Update. *Cell Transplant* 2016; 25(5): 829–48
[<https://doi.org/10.3727/096368915X689622>][PMID: 26423725]
- [56] Reinders MEJ, Fijter JW de, Roelofs H, *et al.* Autologous bone marrow-derived mesenchymal stromal cells for the treatment of allograft rejection after renal transplantation: Results of a phase I study. *Stem Cells Transl Med* 2013; 2(2): 107–11
[<https://doi.org/10.5966/sctm.2012-0114>][PMID: 23349326]
- [57] Le Blanc K, Frassoni F, Ball L, *et al.* Mesenchymal stem cells for treatment of steroid-resistant, severe, acute graft-versus-host disease: a phase II study. *The Lancet* 2008; 371(9624): 1579–86
[[https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(08\)60690-X](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(08)60690-X)]
- [58] Lohan P, Murphy N, Treacy O, *et al.* Third-Party Allogeneic Mesenchymal Stromal Cells Prevent Rejection in a Pre-sensitized High-Risk Model of Corneal Transplantation. *Front Immunol* 2018; 9: 2666
[<https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.02666>][PMID: 30515159]
- [59] Lee SH, Lee MW, Yoo KH, *et al.* Co-transplantation of third-party umbilical cord blood-derived MSCs promotes engraftment in children undergoing unrelated umbilical cord blood transplantation. *Bone Marrow Transplant* 2013; 48(8): 1040–5
[<https://doi.org/10.1038/bmt.2013.7>][PMID: 23396407]
- [60] Popp FC, Eggenhofer E, Renner P, *et al.* Mesenchymal stem cells can induce long-term acceptance of solid organ allografts in synergy with low-dose mycophenolate. *Transpl Immunol* 2008; 20(1-2): 55–60
[<https://doi.org/10.1016/j.trim.2008.08.004>][PMID: 18762258]
- [61] Zhou HP, Yi DH, Yu SQ, *et al.* Administration of donor-derived mesenchymal stem cells can prolong the survival of rat cardiac allograft. *Transplant Proc* 2006; 38(9): 3046–51
[<https://doi.org/10.1016/j.transproceed.2006.10.002>][PMID: 17112896]

- [62] Casiraghi F, Remuzzi G, Perico N. Mesenchymal stromal cells to promote kidney transplantation tolerance. *Current Opinion in Organ Transplantation* 2014; 19(1): 47–53
[<https://doi.org/10.1097/MOT.000000000000035>][PMID: 24257324]
- [63] Tan J, Wu W, Xu X, *et al.* Induction Therapy With Autologous Mesenchymal Stem Cells in Living-Related Kidney Transplants. *JAMA* 2012; 307(11): 1169
[<https://doi.org/10.1001/jama.2012.316>]
- [64] Ge W, Jiang J, Arp J, Liu W, Garcia B, Wang H. Regulatory T-Cell Generation and Kidney Allograft Tolerance Induced by Mesenchymal Stem Cells Associated With Indoleamine 2,3-Dioxygenase Expression. *Transplantation* 2010; 90(12): 1312–20
[<https://doi.org/10.1097/TP.0b013e3181fed001>]
- [65] Seifert M, Stolk M, Polenz D, Volk H-D. Detrimental effects of rat mesenchymal stromal cell pre-treatment in a model of acute kidney rejection. *Front Immunol* 2012; 3: 202
[<https://doi.org/10.3389/fimmu.2012.00202>][PMID: 22826709]
- [66] Perico N, Casiraghi F, Inrona M, *et al.* Autologous mesenchymal stromal cells and kidney transplantation: A pilot study of safety and clinical feasibility. *Clin J Am Soc Nephrol* 2011; 6(2): 412–22
[<https://doi.org/10.2215/CJN.04950610>][PMID: 20930086]
- [67] Engela AU, Baan CC, Peeters AMA, Weimar W, Hoogduijn MJ. Interaction between adipose tissue-derived mesenchymal stem cells and regulatory T-cells. *Cell Transplant* 2013; 22(1): 41–54
[<https://doi.org/10.3727/096368912X636984>][PMID: 22472599]
- [68] Luz-Crawford P, Djouad F, Toupet K, *et al.* Mesenchymal Stem Cell-Derived Interleukin 1 Receptor Antagonist Promotes Macrophage Polarization and Inhibits B Cell Differentiation. *Stem Cells* 2016; 34(2): 483–92
[<https://doi.org/10.1002/stem.2254>][PMID: 26661518]
- [69] Ionescu LI, Alphonse RS, Arizmendi N, *et al.* Airway delivery of soluble factors from plastic-adherent bone marrow cells prevents murine asthma. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2012; 46(2): 207–16
[<https://doi.org/10.1165/rcmb.2010-0391OC>][PMID: 21903873]
- [70] Bai L, Lennon DP, Eaton V, *et al.* Human bone marrow-derived mesenchymal stem cells induce Th2-polarized immune response and promote endogenous repair in animal models of multiple sclerosis. *Glia* 2009; 57(11): 1192–203
[<https://doi.org/10.1002/glia.20841>][PMID: 19191336]
- [71] Beyth S, Borovsky Z, Mevorach D, *et al.* Human mesenchymal stem cells alter antigen-presenting cell maturation and induce T-cell unresponsiveness. *Blood* 2005; 105(5): 2214–9
[<https://doi.org/10.1182/blood-2004-07-2921>][PMID: 15514012]
- [72] Meisel R, Zibert A, Laryea M, Gobel U, Daubener W, Dilloo D. Human bone marrow stromal cells inhibit allogeneic T-cell responses by indoleamine 2,3-dioxygenase-mediated tryptophan degradation. *Blood* 2004; 103(12): 4619–21
[<https://doi.org/10.1182/blood-2003-11-3909>][PMID: 15001472]
- [73] Ren G, Zhang L, Zhao X, *et al.* Mesenchymal Stem Cell-Mediated Immunosuppression Occurs via Concerted Action of Chemokines and Nitric Oxide. *Cell Stem Cell* 2008; 2(2): 141–50
[<https://doi.org/10.1016/j.stem.2007.11.014>]

- [74] Ren G, Zhang L, Zhao X, *et al.* Mesenchymal stem cell-mediated immunosuppression occurs via concerted action of chemokines and nitric oxide. *Cell Stem Cell* 2008; 2(2): 141–50
[<https://doi.org/10.1016/j.stem.2007.11.014>][PMID: 18371435]
- [75] Ren G, Su J, Zhang L, *et al.* Species variation in the mechanisms of mesenchymal stem cell-mediated immunosuppression. *Stem Cells* 2009; 27(8): 1954–62
[<https://doi.org/10.1002/stem.118>][PMID: 19544427]
- [76] Di Nicola M. Human bone marrow stromal cells suppress T-lymphocyte proliferation induced by cellular or nonspecific mitogenic stimuli. *Blood* 2002; 99(10): 3838–43
[<https://doi.org/10.1182/blood.V99.10.3838>]
- [77] Ortiz LA, DuTreil M, Fattman C, *et al.* Interleukin 1 receptor antagonist mediates the antiinflammatory and antifibrotic effect of mesenchymal stem cells during lung injury. *PNAS* 2007; 107(26): 11002–7.
- [78] Selmani Z, Naji A, Zidi I, *et al.* Human leukocyte antigen-G5 secretion by human mesenchymal stem cells is required to suppress T lymphocyte and natural killer function and to induce CD4+CD25highFOXP3+ regulatory T cells. *STEM CELLS* 2008; 26(1): 212–22
[<https://doi.org/10.1634/stemcells.2007-0554>][PMID: 17932417]
- [79] Choi Y-H, Kurtz A, Stamm C. Mesenchymal stem cells for cardiac cell therapy. *Hum Gene Ther* 2011; 22(1): 3–17
[<https://doi.org/10.1089/hum.2010.211>][PMID: 21062128]
- [80] Lee H, Park JB, Lee S, Baek S, Kim H, Kim SJ. Intra-osseous injection of donor mesenchymal stem cell (MSC) into the bone marrow in living donor kidney transplantation; a pilot study. *J Transl Med* 2013; 11: 96
[<https://doi.org/10.1186/1479-5876-11-96>][PMID: 23578110]
- [81] Groh ME, Maitra B, Szekely E, Koç ON. Human mesenchymal stem cells require monocyte-mediated activation to suppress alloreactive T cells. *Experimental Hematology* 2005; 33(8): 928–34
[<https://doi.org/10.1016/j.exphem.2005.05.002>][PMID: 16038786]
- [82] Corcione A, Benvenuto F, Ferretti E, *et al.* Human mesenchymal stem cells modulate B-cell functions. *Blood* 2006; 107(1): 367–72
[<https://doi.org/10.1182/blood-2005-07-2657>][PMID: 16141348]
- [83] Engela AU, Hoogduijn MJ, Boer K, *et al.* Human adipose-tissue derived mesenchymal stem cells induce functional de-novo regulatory T cells with methylated FOXP3 gene DNA. *Clin Exp Immunol* 2013; 173(2): 343–54
[<https://doi.org/10.1111/cei.12120>][PMID: 23607314]
- [84] Franquesa M, Mensah FK, Huizinga R, *et al.* Human adipose tissue-derived mesenchymal stem cells abrogate plasmablast formation and induce regulatory B cells independently of T helper cells. *Stem Cells* 2015; 33(3): 880–91
[<https://doi.org/10.1002/stem.1881>][PMID: 25376628]
- [85] Franquesa M, Hoogduijn MJ, Bestard O, Grinyo JM. Immunomodulatory effect of mesenchymal stem cells on B cells. *Front Immunol* 2012; 3: 212
[<https://doi.org/10.3389/fimmu.2012.00212>][PMID: 22833744]

- [86] Maccario R, Podesta M, Moretta A, *et al.* Interaction of human mesenchymal stem cells with cells involved in alloantigen-specific immune response favors the differentiation of CD4+ T-cell subsets expressing a regulatory/suppressive phenotype. *Haematologica* 2005; 90(4): 516–25.
- [87] Spaggiari GM, Capobianco A, Abdelrazik H, Becchetti F, Mingari MC, Moretta L. Mesenchymal stem cells inhibit natural killer-cell proliferation, cytotoxicity, and cytokine production: Role of indoleamine 2,3-dioxygenase and prostaglandin E2. *Blood* 2008; 111(3): 1327–33
[<https://doi.org/10.1182/blood-2007-02-074997>][PMID: 17951526]
- [88] Zhang W, Ge W, Li C, *et al.* Effects of mesenchymal stem cells on differentiation, maturation, and function of human monocyte-derived dendritic cells. *Stem Cells Dev* 2004; 13(3): 263–71
[<https://doi.org/10.1089/154732804323099190>][PMID: 15186722]
- [89] Abdi R, Fiorina P, Adra CN, Atkinson M, Sayegh MH. Immunomodulation by mesenchymal stem cells: A potential therapeutic strategy for type 1 diabetes. *Diabetes* 2008; 57(7): 1759–67
[<https://doi.org/10.2337/db08-0180>][PMID: 18586907]
- [90] Luk F, Witte SFH de, Korevaar SS, *et al.* Inactivated Mesenchymal Stem Cells Maintain Immunomodulatory Capacity. *Stem Cells Dev* 2016; 25(18): 1342–54
[<https://doi.org/10.1089/scd.2016.0068>][PMID: 27349989]
- [91] Witte SFH de, Luk F, Sierra Parraga JM, *et al.* Immunomodulation By Therapeutic Mesenchymal Stromal Cells (MSC) Is Triggered Through Phagocytosis of MSC By Monocytic Cells. *Stem Cells* 2018; 36(4): 602–15
[<https://doi.org/10.1002/stem.2779>][PMID: 29341339]
- [92] Galleu A, Riffo-Vasquez Y, Trento C, *et al.* Apoptosis in mesenchymal stromal cells induces in vivo recipient-mediated immunomodulation. *Sci Transl Med* 2017; 9(416)
[<https://doi.org/10.1126/scitranslmed.aam7828>][PMID: 29141887]
- [93] Popp FC, Eggenhofer E, Renner P, *et al.* Mesenchymal stem cells can affect solid organ allograft survival. *Transplantation* 2009; 87(9 Suppl): S57-62
[<https://doi.org/10.1097/TP.0b013e3181a288aa>][PMID: 19424009]
- [94] Corselli M, Chen C-W, Sun B, Yap S, Rubin JP, Péault B. The tunica adventitia of human arteries and veins as a source of mesenchymal stem cells. *Stem Cells Dev* 2012; 21(8): 1299–308
[<https://doi.org/10.1089/scd.2011.0200>][PMID: 21861688]
- [95] Kern S, Eichler H, Stoeve J, Klüter H, Bieback K. Comparative analysis of mesenchymal stem cells from bone marrow, umbilical cord blood, or adipose tissue. *Stem Cells* 2006; 24(5): 1294–301
[<https://doi.org/10.1634/stemcells.2005-0342>][PMID: 16410387]
- [96] Holschbach M. Durchflusszytometrie (FACS): Messprinzip & Aufbau (Ressourcen) [cited 2017 March 8] Available from: URL: <http://www.antikoerper-online.de/resources/17/1247/durchflusszytometrie-facs-messprinzip-aufbau/>.
- [97] Dominici M, Le Blanc K, Mueller I, *et al.* Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy* 2006; 8(4): 315–7
[<https://doi.org/10.1080/14653240600855905>][PMID: 16923606]

- [98] Pan G-h, Chen Z, Xu L, *et al.* Low-dose tacrolimus combined with donor-derived mesenchymal stem cells after renal transplantation: a prospective, non-randomized study. *Oncotarget* 2016; 7(11): 12089–101
[<https://doi.org/10.18632/oncotarget.7725>][PMID: 26933811]
- [99] Peng Y, Ke M, Xu L, *et al.* Donor-derived mesenchymal stem cells combined with low-dose tacrolimus prevent acute rejection after renal transplantation: a clinical pilot study. *Transplantation* 2013; 95(1): 161–8
[<https://doi.org/10.1097/TP.0b013e3182754c53>][PMID: 23263506]
- [100] Yu PF, Huang Y, Han YY, *et al.* TNF α -activated mesenchymal stromal cells promote breast cancer metastasis by recruiting CXCR2 + neutrophils. *Oncogene* 2017; 36(4): 482–90
[<https://doi.org/10.1038/onc.2016.217>]
- [101] Eggenhofer E, Renner P, Soeder Y, *et al.* Features of synergism between mesenchymal stem cells and immunosuppressive drugs in a murine heart transplantation model. *Transpl Immunol* 2011; 25(2-3): 141–7
[<https://doi.org/10.1016/j.trim.2011.06.002>][PMID: 21704160]
- [102] Eggenhofer E, Popp FC, Mendicino M, *et al.* Heart grafts tolerized through third-party multipotent adult progenitor cells can be retransplanted to secondary hosts with no immunosuppression. *Stem Cells Transl Med* 2013; 2(8): 595–606
[<https://doi.org/10.5966/sctm.2012-0166>][PMID: 23836805]
- [103] Lee OJ, Luk F, Korevaar SS, *et al.* The Importance of Dosing, Timing, and (in)Activation of Adipose Tissue-Derived Mesenchymal Stromal Cells on Their Immunomodulatory Effects. *Stem Cells Dev* 2020; 29(1): 38–48
[<https://doi.org/10.1089/scd.2019.0225>][PMID: 31696786]
- [104] Casiraghi F, Azzollini N, Cassis P, *et al.* Pretransplant Infusion of Mesenchymal Stem Cells Prolongs the Survival of a Semiallogeneic Heart Transplant through the Generation of Regulatory T Cells. *The Journal of Immunology* 2008; 181(6): 3933–46
[<https://doi.org/10.4049/jimmunol.181.6.3933>]
- [105] Obermajer N, Popp FC, Soeder Y, *et al.* Conversion of Th17 into IL-17A(neg) regulatory T cells: a novel mechanism in prolonged allograft survival promoted by mesenchymal stem cell-supported minimized immunosuppressive therapy. *J Immunol* 2014; 193(10): 4988–99
[<https://doi.org/10.4049/jimmunol.1401776>][PMID: 25305313]
- [106] Lu W, Fu C, Song L, *et al.* Exposure to supernatants of macrophages that phagocytized dead mesenchymal stem cells improves hypoxic cardiomyocytes survival. *Int J Cardiol* 2013; 165(2): 333–40
[<https://doi.org/10.1016/j.ijcard.2012.03.088>][PMID: 22475845]
- [107] Le Blanc K, Tammik C, Rosendahl K, Zetterberg E, Ringdén O. HLA expression and immunologic properties of differentiated and undifferentiated mesenchymal stem cells. *Experimental Hematology* 2003; 31(10): 890–6
[[https://doi.org/10.1016/s0301-472x\(03\)00110-3](https://doi.org/10.1016/s0301-472x(03)00110-3)][PMID: 14550804]

- [108]Gu L-H, Zhang T-T, Li Y, Yan H-J, Qi H, Li F-R. Immunogenicity of allogeneic mesenchymal stem cells transplanted via different routes in diabetic rats. *Cell Mol Immunol* 2015; 12(4): 444–55
[<https://doi.org/10.1038/cmi.2014.70>][PMID: 25242276]
- [109]Inoue S, Popp FC, Koehl GE, *et al.* Immunomodulatory effects of mesenchymal stem cells in a rat organ transplant model. *Transplantation* 2006; 81(11): 1589–95
[<https://doi.org/10.1097/01.tp.0000209919.90630.7b>][PMID: 16770249]
- [110]Bessoles S, Grandclément C, Alari-Pahissa E, Gehrig J, Jeevan-Raj B, Held W. Adaptations of Natural Killer Cells to Self-MHC Class I. *Front Immunol* 2014; 5: 349
[<https://doi.org/10.3389/fimmu.2014.00349>][PMID: 25101089]
- [111]Ohlén C, Kling G, Höglund P, *et al.* Prevention of allogeneic bone marrow graft rejection by H-2 transgene in donor mice. *Science* 1989; 246(4930): 666–8
[<https://doi.org/10.1126/science.2814488>][PMID: 2814488]
- [112]Kärre K, Ljunggren HG, Piontek G, Kiessling R. Selective rejection of H-2-deficient lymphoma variants suggests alternative immune defence strategy. *Nature* 1986; 319(6055): 675–8
[<https://doi.org/10.1038/319675a0>][PMID: 3951539]
- [113]Wong SH, Hamel L, Chevalier S, Philip A. Endoglin expression on human microvascular endothelial cells association with betaglycan and formation of higher order complexes with TGF-beta signalling receptors. *Eur J Biochem* 2000; 267(17): 5550–60
[<https://doi.org/10.1046/j.1432-1327.2000.01621.x>][PMID: 10951214]
- [114]Barry FP, Boynton RE, Haynesworth S, Murphy JM, Zaia J. The monoclonal antibody SH-2, raised against human mesenchymal stem cells, recognizes an epitope on endoglin (CD105). *Biochem Biophys Res Commun* 1999; 265(1): 134–9
[<https://doi.org/10.1006/bbrc.1999.1620>][PMID: 10548503]
- [115]Anderson P, Carrillo-Gálvez AB, García-Pérez A, Cobo M, Martín F. CD105 (endoglin)-negative murine mesenchymal stromal cells define a new multipotent subpopulation with distinct differentiation and immunomodulatory capacities. *PLoS ONE* 2013; 8(10): e76979
[<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0076979>][PMID: 24124603]
- [116]van den Bosch TPP, Kannegieter NM, Hesselink DA, Baan CC, Rowshani AT. Targeting the Monocyte-Macrophage Lineage in Solid Organ Transplantation. *Front Immunol* 2017; 8: 153
[<https://doi.org/10.3389/fimmu.2017.00153>][PMID: 28261211]
- [117]Weiss ARR, Lee O, Eggenhofer E, *et al.* Differential effects of heat-inactivated, secretome-deficient MSC and metabolically active MSC in sepsis and allogeneic heart transplantation. *Stem Cells* 2020; 38(6): 797–807
[<https://doi.org/10.1002/stem.3165>][PMID: 32101344]
- [118]Braza F, Dirou S, Forest V, *et al.* Mesenchymal Stem Cells Induce Suppressive Macrophages Through Phagocytosis in a Mouse Model of Asthma. *Stem Cells* 2016; 34(7): 1836–45
[<https://doi.org/10.1002/stem.2344>][PMID: 26891455]
- [119]Krasnodembskaya A, Samarani G, Song Y, *et al.* Human mesenchymal stem cells reduce mortality and bacteremia in gram-negative sepsis in mice in part by enhancing the phagocytic activity of

- blood monocytes. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2012; 302(10): L1003-13
[<https://doi.org/10.1152/ajplung.00180.2011>][PMID: 22427530]
- [120] Miteva K, Pappritz K, El-Shafeey M, *et al.* Mesenchymal Stromal Cells Modulate Monocytes Trafficking in Coxsackievirus B3-Induced Myocarditis. *Stem Cells Transl Med* 2017; 6(4): 1249–61
[<https://doi.org/10.1002/sctm.16-0353>][PMID: 28186704]
- [121] Bai X, Yan Y, Coleman M, *et al.* Tracking long-term survival of intramyocardially delivered human adipose tissue-derived stem cells using bioluminescence imaging. *Mol Imaging Biol* 2011; 13(4): 633–45
[<https://doi.org/10.1007/s11307-010-0392-z>][PMID: 20730500]
- [122] Melief SM, Geutskens SB, Fibbe WE, Roelofs H. Multipotent stromal cells skew monocytes towards an anti-inflammatory interleukin-10-producing phenotype by production of interleukin-6. *Haematologica* 2013; 98(6): 888–95
[<https://doi.org/10.3324/haematol.2012.078055>][PMID: 23349310]
- [123] Deng Y, Zhang Y, Ye L, *et al.* Umbilical Cord-derived Mesenchymal Stem Cells Instruct Monocytes Towards an IL10-producing Phenotype by Secreting IL6 and HGF. *Sci Rep* 2016; 6: 37566
[<https://doi.org/10.1038/srep37566>][PMID: 27917866]
- [124] Gonçalves FdC, Luk F, Korevaar SS, *et al.* Membrane particles generated from mesenchymal stromal cells modulate immune responses by selective targeting of pro-inflammatory monocytes. *Sci Rep* 2017; 7(1): 12100
[<https://doi.org/10.1038/s41598-017-12121-z>][PMID: 28935974]
- [125] Etzerodt A, Moestrup SK. CD163 and inflammation: biological, diagnostic, and therapeutic aspects. *Antioxid Redox Signal* 2013; 18(17): 2352–63
[<https://doi.org/10.1089/ars.2012.4834>][PMID: 22900885]
- [126] Martinez-Pomares L. The mannose receptor. *J Leukoc Biol* 2012; 92(6): 1177–86
[<https://doi.org/10.1189/jlb.0512231>][PMID: 22966131]
- [127] Vergani A, Tezza S, D'Addio F, *et al.* Long-Term Heart Transplant Survival by Targeting the Ionotropic Purinergic Receptor P2X7. *Circulation* 2012; 127(4): 463–75
[<https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.112.123653>][PMID: 23250993]
- [128] Lanio N, Sarmiento E, Gallego A, *et al.* The potential role of T-cell memory distribution as predisposing factor for rejection in heart transplant recipients. *Transplant Proc* 2009; 41(6): 2480–4
[<https://doi.org/10.1016/j.transproceed.2009.06.043>][PMID: 19715957]
- [129] Fischer K, Ohori S, Meral FC, *et al.* Testing the Efficacy of Contrast-Enhanced Ultrasound in Detecting Transplant Rejection Using a Murine Model of Heart Transplantation. *Am J Transplant* 2017; 17(7): 1791–801
[<https://doi.org/10.1111/ajt.14180>][PMID: 28009476]
- [130] English K, Ryan JM, Tobin L, Murphy MJ, Barry FP, Mahon BP. Cell contact, prostaglandin E 2 and transforming growth factor beta 1 play non-redundant roles in human mesenchymal stem cell induction of CD4 + CD25 High forkhead box P3 + regulatory T cells. *Clinical & Experimental Immunology* 2009; 156(1): 149–60
[<https://doi.org/10.1111/j.1365-2249.2009.03874.x>]

- [131] Laing AG, Fanelli G, Ramirez-Valdez A, Lechler RI, Lombardi G, Sharpe PT. Mesenchymal stem cells inhibit T-cell function through conserved induction of cellular stress. *PLoS ONE* 2019; 14(3): e0213170
[<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0213170>][PMID: 30870462]
- [132] Sato K, Ozaki K, Oh I, *et al.* Nitric oxide plays a critical role in suppression of T-cell proliferation by mesenchymal stem cells. *Blood* 2007; 109(1): 228–34
[<https://doi.org/10.1182/blood-2006-02-002246>][PMID: 16985180]
- [133] Di Ianni M, Del Papa B, Ianni M de, *et al.* Mesenchymal cells recruit and regulate T regulatory cells. *Experimental Hematology* 2008; 36(3): 309–18
[<https://doi.org/10.1016/j.exphem.2007.11.007>][PMID: 18279718]
- [134] Lee H-J, Kim S-N, Jeon M-S, Yi T, Song SU. ICOSL expression in human bone marrow-derived mesenchymal stem cells promotes induction of regulatory T cells. *Sci Rep* 2017; 7: 44486
[<https://doi.org/10.1038/srep44486>][PMID: 28290526]
- [135] Azevedo RI, Minskaia E, Fernandes-Platzgummer A, *et al.* Mesenchymal stromal cells induce regulatory T cells via epigenetic conversion of human conventional CD4 T cells in vitro. *Stem Cells* 2020
[<https://doi.org/10.1002/stem.3185>][PMID: 32352186]
- [136] Schmidt A, Zhang X-M, Joshi RN, *et al.* Human macrophages induce CD4(+)Foxp3(+) regulatory T cells via binding and re-release of TGF- β . *Immunol Cell Biol* 2016; 94(8): 747–62
[<https://doi.org/10.1038/icb.2016.34>][PMID: 27075967]
- [137] Melief SM, Schrama E, Brugman MH, *et al.* Multipotent stromal cells induce human regulatory T cells through a novel pathway involving skewing of monocytes toward anti-inflammatory macrophages. *Stem Cells* 2013; 31(9): 1980–91
[<https://doi.org/10.1002/stem.1432>][PMID: 23712682]
- [138] Chang Y, Nadai P de, Azzaoui I, *et al.* The chemokine CCL18 generates adaptive regulatory T cells from memory CD4+ T cells of healthy but not allergic subjects. *FASEB J* 2010; 24(12): 5063–72
[<https://doi.org/10.1096/fj.10-162560>][PMID: 20702776]
- [139] Marson A, Kretschmer K, Frampton GM, *et al.* Foxp3 occupancy and regulation of key target genes during T-cell stimulation. *Nature* 2007; 445(7130): 931–5
[<https://doi.org/10.1038/nature05478>][PMID: 17237765]
- [140] Sakaguchi S, Sakaguchi N, Asano M, Itoh M, Toda M. Immunologic self-tolerance maintained by activated T cells expressing IL-2 receptor α -chains (CD25). Breakdown of a single mechanism of self-tolerance causes various autoimmune diseases. *J Immunol* 1995; 155(3): 1151–64
[PMID: 7636184]
- [141] Leur K de, Dieterich M, Hesselink DA, *et al.* Characterization of donor and recipient CD8+ tissue-resident memory T cells in transplant nephrectomies. *Sci Rep* 2019; 9(1): 5984
[<https://doi.org/10.1038/s41598-019-42401-9>][PMID: 30979940]

- [142]Harper SJF, Ali JM, Wlodek E, *et al.* CD8 T-cell recognition of acquired alloantigen promotes acute allograft rejection. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2015; 112(41): 12788–93
[<https://doi.org/10.1073/pnas.1513533112>][PMID: 26420874]
- [143]Negi N, Griffin MD. Effects of mesenchymal stromal cells on regulatory T cells: Current understanding and clinical relevance. *Stem Cells* 2020; 38(5): 596–605
[<https://doi.org/10.1002/stem.3151>][PMID: 31995249]
- [144]Shall G, Menosky M, Decker S, *et al.* Effects of Passage Number and Differentiation Protocol on the Generation of Dopaminergic Neurons from Rat Bone Marrow-Derived Mesenchymal Stem Cells. *Int J Mol Sci* 2018; 19(3)
[<https://doi.org/10.3390/ijms19030720>][PMID: 29498713]
- [145]Zhang F-B, Li L, Fang B, Zhu D-L, Yang H-T, Gao P-J. Passage-restricted differentiation potential of mesenchymal stem cells into cardiomyocyte-like cells. *Biochem Biophys Res Commun* 2005; 336(3): 784–92
[<https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2005.08.177>][PMID: 16143296]
- [146]Sung P-H, Chang C-L, Tsai T-H, *et al.* Apoptotic adipose-derived mesenchymal stem cell therapy protects against lung and kidney injury in sepsis syndrome caused by cecal ligation puncture in rats. *Stem Cell Res Ther* 2013; 4(6): 155
[<https://doi.org/10.1186/scrt385>][PMID: 24451364]
- [147]Chang C-L, Leu S, Sung H-C, *et al.* Impact of apoptotic adipose-derived mesenchymal stem cells on attenuating organ damage and reducing mortality in rat sepsis syndrome induced by cecal puncture and ligation. *J Transl Med* 2012; 10: 244
[<https://doi.org/10.1186/1479-5876-10-244>][PMID: 23217183]
- [148]Yip H-K, Chang Y-C, Wallace CG, *et al.* Melatonin treatment improves adipose-derived mesenchymal stem cell therapy for acute lung ischemia-reperfusion injury. *J Pineal Res* 2013; 54(2): 207–21
[<https://doi.org/10.1111/jpi.12020>][PMID: 23110436]
- [149]Oliveira RL, Chagastelles PC, Sesterheim P, Pranke P. In Vivo Immunogenic Response to Allogeneic Mesenchymal Stem Cells and the Role of Preactivated Mesenchymal Stem Cells Cotransplanted with Allogeneic Islets. *Stem Cells Int* 2017; 2017: 9824698
[<https://doi.org/10.1155/2017/9824698>][PMID: 28553360]
- [150]Philipp D, Suhr L, Wahlers T, Choi Y-H, Paunel-Görgülü A. Preconditioning of bone marrow-derived mesenchymal stem cells highly strengthens their potential to promote IL-6-dependent M2b polarization. *Stem Cell Res Ther* 2018; 9(1): 286
[<https://doi.org/10.1186/s13287-018-1039-2>][PMID: 30359316]
- [151]Min C-K, Kim B-G, Park G, Cho B, Oh I-H. IL-10-transduced bone marrow mesenchymal stem cells can attenuate the severity of acute graft-versus-host disease after experimental allogeneic stem cell transplantation. *Bone Marrow Transplant* 2007; 39(10): 637–45
[<https://doi.org/10.1038/sj.bmt.1705644>][PMID: 17369865]

- [152]Bian L, Guo Z-K, Wang H-X, *et al.* In vitro and in vivo immunosuppressive characteristics of hepatocyte growth factor-modified murine mesenchymal stem cells. *In Vivo* 2009; 23(1): 21–7
[PMID: 19368120]
- [153]Li H, Zuo S, He Z, *et al.* Paracrine factors released by GATA-4 overexpressed mesenchymal stem cells increase angiogenesis and cell survival. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2010; 299(6): H1772-81
[<https://doi.org/10.1152/ajpheart.00557.2010>][PMID: 20870802]
- [154]Zhao N, Li H, Yan Y, Jiang R, He X. Mesenchymal stem cells overexpressing IL-35 effectively inhibit CD4+ T cell function. *Cell Immunol* 2017; 312: 61–6
[<https://doi.org/10.1016/j.cellimm.2016.12.001>][PMID: 27993351]

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Übersicht über die Stoffwechselinteraktionen von MSC mit den Zellen der Immunabwehr; Abdi, Fiorina et al [89]	12
Abbildung 2: MTT-Assay mit Reaktionsbeginn 0h nach Inaktivierung. Links: Die vitalen MSC sind zur Reduktion des gelben MTT in das blaue Formazan fähig. Rechts: Aufgrund ihrer fehlenden Stoffwechselaktivität sind die HI-MSC nicht mehr zur Reduktion des gelben MTT ins blaue Formazan fähig, ein Farbumschlag bleibt aus. Die Zellen sind aufgrund der vorangegangenen Hitzeinaktivierung nicht mehr plastikadhärent. Maßstab 150:1.	25
Abbildung 3: Messung der metabolischen Aktivität von MSC und HI-MSC 0h nach Hitzeinaktivierung im MTT-Assay mittels photometrischer Bestimmung der Absorption des Überstandes bei 540nm. HI-MSC sind im Gegensatz zu MSC nicht in der Lage das gelbe MTT zum blauen Formazan zu reduzieren, wodurch sich eine geringere Absorption ergibt. **** bezeichnet $p < 0.0001$	26
Abbildung 4: Durchflusszytometrie von MSC und HI-MSC. Direkt nach Hitzeinaktivierung haben 67,7% der Zellen ihre Vitalität verloren, nach 24h insgesamt 98,7%.	26
Abbildung 5: Oberflächenmarkerprofil von MSC und HI-MSC im Vergleich. HI-MSC zeigen im Vergleich zu MSC ein schwächeres Signal für CD29 und CD44, nur noch geringe Detektion von Sca-1 und CD106, sowie den Verlust der Nachweisbarkeit von CD105 und MHC I. Sowohl MSC als auch HI-MSC waren negativ für CD11b und MHC II.	27
Abbildung 6: Die MLR wurde mit je 10000 MSC bzw. 10000 HI-MSC durchgeführt. Es zeigte sich ein deutlicher Rückgang in der T-Zell-Proliferation der MSC-Gruppe. Die HI-MSC hatten einen leicht positiven Effekt auf die T-Zell-Proliferation. „Ohne MSC“ als Kontrollgruppe zur Referenz.	28
Abbildung 7: TNF α -Produktion der Monozyten unter dem Einfluss von MSC und HI-MSC nach Stimulation mit LPS. Sowohl MSC als auch HI-MSC sind zur Suppression der TNF α -Produktion durch die LPS-stimulierten Monozyten fähig. ** bezeichnet $p < 0.01$, *** bezeichnet $p < 0.001$	29
Abbildung 8: Transplantatüberleben nach allogener Herztransplantation. Die Grafik zeigt, dass HI-MSC + MMF mit 14 Tagen ein weitaus geringeres Überleben lieferten als die Gruppe mit vitalen MSC + MMF und einer mittleren Überlebensdauer von 36 Tagen.	30
Abbildung 9: Immunfluoreszenzfärbung abgestoßener Transplantate aus der Kontrollgruppe und den Versuchsgruppen. Die rote Farbe markiert CD3 ⁺ T-Zellen, die zum Zeitpunkt der Abstoßung die Organe infiltrieren. Die blaue Farbe markiert die mittels DAPI sichtbar gemachten Zellkerne. Die weiße Linie markiert 80 μ m.....	31
Abbildung 10: Die plastikadhärenten MSC weisen lichtmikroskopisch eine Spindelform auf.....	51
Abbildung 11: Adipozytennachweis mit Red-Oil-O bei MSC nach einer Woche Inkubation mit Differenzierungsmedium (links) und normalem Zellkulturmedium als Kontrollgruppe (rechts): Die zu Adipozyten differenzierten MSC nehmen den Farbstoff auf und weisen im Gegensatz zu den undifferenzierten MSC eine deutliche Rotfärbung auf. (Vergrößerung 20x).....	51

Abbildung 12: Kossa-Assay bei MSC nach zweiwöchiger Differenzierung (links) und der Kontrollgruppe mit normalem Zellkulturmedium (rechts): Die zu Osteoblasten ausdifferenzierten MSC färben sich deutlich schwarz an, wohingegen die MSC weitestgehend farblos bleiben. (Vergrößerung 10x)52

Abbildung 13: Die hitzeinaktivierten MSC verlieren ihre Plastikadhärenz und kommen lichtmikroskopisch rundlich zur Darstellung.....52

Danksagung

Hiermit möchte ich mich recht herzlich beim gesamten Team der Experimentellen Chirurgie am Universitätsklinikum Regensburg für die Zusammenarbeit während meiner Zeit dort bedanken. Allen voran gilt mein Dank Herrn Prof. Dr. med. Marc H. Dahke, Ph.D. für die Bereitstellung des Forschungsthemas und die Unterstützung beim Erstellen der Promotionsarbeit. Des Weiteren möchte ich mich hiermit bei PD Dr. rer. nat. Elke Eggenhofer und Dr. med. Andreas Weiß für die Betreuung bedanken. Außerdem gilt mein Dank Frau Irina Kucuk für die Durchführung der Tieroperationen, Frau Lydia Schneider und Frau Dr. Stefanie Blaimer für die FACS-Messungen und Frau Tatjana Libeld und Herrn Manfred Haas für die angenehme Atmosphäre im Labor. Schließlich bedanke ich mich natürlich auch noch bei meiner Familie und meinen Freunden für die immerwährende Unterstützung während des gesamten Studiums.

Lebenslauf

Elisabeth Geißler

Geboren am 20.04.1995 in Ried im Innkreis

Österreichische Staatsangehörigkeit

Beruf

Seit 10/2020

Ärztin in Weiterbildung zur Fachärztin für Radiologie

Institut für Radiologie, Neuroradiologie und Nuklearmedizin
Krankenhaus Barmherzige Brüder Regensburg

Ausbildung und Studium

05/2020

3. Staatsexamen und Erteilung der Approbation als Ärztin

05/2019 – 04/2020

Praktisches Jahr

09/2017 – 02/2018

Semmelweis Universität Budapest

Auslandssemester im Rahmen des ERASMUS+ Programms

10/2013 – 05/2021

Universität Regensburg

Studium der Humanmedizin

1. Staatsexamen August/September 2015

2. Staatsexamen April 2019

09/2005 – 06/2013

Bundesgymnasium Ried im Innkreis