

Aus der Klinik
für angewandte Zelltherapie
(Direktor: Prof. Dr. med. F. Fändrich)

**Der Einfluss einer Thymektomie auf die hämatopoetische Rekonstitution und
die Effektivität der Induktion spender-spezifischer Transplantationstoleranz in
einem Mausmodell der Knochenmarktransplantation**

Inauguraldissertation
zur
Erlangung der Doktorwürde
der medizinischen Fakultät
der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

Vorgelegt von

Alexander Melzer

aus Oldenburg/ Oldenburg

Kiel 2013

1. Berichterstatter: Prof. Dr. med. F. Fändrich
2. Berichterstatter: Prof. Dr. med. U. Kunzendorf
Tag der mündlichen Prüfung: 09.04.2014
Zum Druck genehmigt, Kiel, den 09.04.2014

| Inhaltsverzeichnis | Seite |
|---|--------------|
| Glossar | |
| 1. Einleitung | 01 |
| 1.1 Transplantation und Immunsuppression | 01 |
| 1.2 Transplantationstoleranz durch hämatopoetischen Chimärismus | 02 |
| 1.3 Induktion von hämatopoetischen Chimärismus | 05 |
| 1.4 Die Rolle des Thymus bei der Induktion der Transplantationstoleranz | 07 |
| 2. Fragestellung | 09 |
| 3. Material und Methoden | 10 |
| 3.1 Versuchstiere und Tierhaltung | 10 |
| 3.2 Operationsverfahren | 11 |
| 3.2.1 Narkose und technische Hilfsmittel | 11 |
| 3.2.2 Thymektomie und Histologie | 11 |
| 3.2.3 Konditionierung und Knochenmarktransplantation | 12 |
| 3.3 Hämatologische Untersuchung und Durchflusszytometrie | 12 |
| 3.4 Angewandte Antikörper | 13 |
| 3.5 Technik der Hauttransplantation | 15 |
| 3.6 Einteilung der Versuchsgruppen | 16 |
| 3.7 Statistik | 16 |
| 4. Ergebnisse | 17 |
| 4.1 Hämatopoetische Rekonstitution nach Knochenmarktransplantation | 17 |
| 4.2 Rate und Niveau der Induktion eines Chimärismus | 22 |
| 4.3 Verteilung der Zellpopulationen im peripheren Blut | 25 |
| 4.4 Verlauf der Hauttransplantationen | 29 |

| | Seite |
|---|--------------|
| 5. Diskussion | 32 |
| 5.1 Einfluss der Thymektomie auf die hämatopoetische Rekonstitution | 32 |
| 5.2 Mögliche Mechanismen der Toleranzentwicklung durch hämatopoetischen Chimärismus | 34 |
| 5.2.1 Induktion von Toleranz durch Deletion alloreaktiver Zellklone im Thymus | 34 |
| 5.2.2 Induktion von Toleranz durch extrathymale Deletion alloreaktiver Zellklone | 36 |
| 5.2.3 Induktion von Toleranz durch regulatorische Zellen | 37 |
| 5.2.4 Anergie bei der Induktion von Toleranz durch hämatopoetischen Chimärismus | 38 |
| 5.2.5 Induktion von Toleranz durch Ignoranz | 38 |
| 5.3 Kritische Betrachtung zum Modell der chirurgischen Thymektomie in C57Bl/6 Mäusen | 39 |
| 6. Zusammenfassung | 41 |
| 7. Literaturverzeichnis | 42 |
| 8. Danksagung | 50 |
| 9. Lebenslauf | 52 |

Glossar

| | |
|-------------|---|
| AG | Aktiengesellschaft |
| AICD | activation induced cell death, Induzierter Zelltod |
| AKR Mäuse | Inzucht-Mäusestamm, der eine hohe spontane Leukämie-rate aufweist |
| B220 | Form des CD45 Rezeptors mit höherem Molekulargewicht |
| B-Zellen | B-Lymphozyten |
| Balb/c | von Halsey Bagg (1913-1916) entwickelter BALB/c-Mausinzuchtstamm: (B:Bagg, ALB:albino) |
| CD | Membranproteine der Lymphozytenoberfläche (engl.: cluster of differentiation) |
| cGy/ Gy | centi-Gray (Einheit für Strahlendosis: cGy*cm ² (centi-Gray pro Quadratzentimeter)/ Gray |
| C3H/HeNCrl | Inzuchtstamm aus der Kreuzung eines Balb/c Mäuseweibchens mit DBA-Stamm-Männchen durch Strong 1920 |
| C57BL/6NCrl | C.C. Little züchtet 1921 den Mausstamm C57Bl/6 aus einer weiblichen Maus mit der Codierung 57 |
| d.h. | das heißt |
| DX | Marker für natürliche Killerzellen |
| Et al. | selten ausgeschrieben et alii (Maskulinum), „und andere“ |
| Fa. | Firma |
| Fas | klassisches transmembranöses Protein Typ I. Den Tumornekrosefaktorrezeptoren zugeordnet |
| FACS | fluorescence activated cell sorting, Zellanalyse |
| FITC | Fluoresceinisothiocyanat, Reaktivfarbstoff zur Koppelung mit Antigenen, Färbung im FACS |
| FoxP3 | Scurfin, Regulationsprotein für Entwicklung und Regulation der T-Zellen |
| GVH | Graft-versus-host Reaktion |
| Gr | Immunologischer Marker für Makrophagen |
| H2-b/k/d | MHC Haplotypen, Gewebemerkmale |
| H.E. | Hämatoxylin- Eosin Färbung (Paraffinfärbung) |
| IgG | Immunglobulin G oder Gammaglobulin |

| | |
|------------|---|
| IL | Interleukin |
| I-LD | Histokompatibilitätsantigen durch Lymphozytenkultur definierbar |
| i.p. | intraperitoneal |
| kDA | Kilo Dalton Gewicht |
| KG | Körpergewicht |
| LY | Immunologischer Marker für |
| µm | Mikrometer |
| MAC | Membranangriffskomplex (membrane attack complex) |
| ml | Milliliter |
| MHC | Major Histocompatibility Complex, Haupthistokompatibilitätskomplex |
| MLC | mixed lymphocyte culture/ gemischte Lymphozyten Kultur |
| n | number/ Anzahl |
| NK | natürliche Killerzellen |
| nl | Nanoliter |
| n.s. | nicht signifikant |
| p | statistische Signifikanz |
| PBS | Phosphatgepufferte Salzlösung, phosphate buffered saline |
| PE | R-phycoerythrin, Reaktivfarbstoff zur Koppelung mit Antigenen, Färbung im FACS |
| RPMI- 1640 | Zellkulturmedium für Leukozyten sowie humane und tierische Zelltypen, am Roswell Park Memorial Institute entwickelt |
| SCID Mäuse | severe combined immunodeficiency; schwerer kombinierter Immundefekt |
| SEM | standard error of the mean |
| TCR | T-cell receptor, T-Zell Rezeptor (Proteinkomplex) |
| Vβ-Klone | Antikörper ansprechend der variablen Region des T-Zell Rezeptors |
| vgl. | vergleich |
| v.s. | versus |
| z.B. | zum Beispiel |

1. Einleitung

1.1 Transplantation und Immunsuppression

Eine Transplantation, sei es die Knochenmarktransplantation oder die Transplantation vaskularisierter Organe selbst, bietet Patienten im Endstadium irreversibler Erkrankungen eine gute Möglichkeit zur Therapie, die sich im medizinischen Alltag als Routineverfahren durchgesetzt hat.

Obwohl der Gesundheitszustand und die Lebensqualität nach einer Transplantation in der Regel dramatisch verbessert sind, sind diese Patienten jedoch nicht geheilt. Ihr Zustand ist immer noch sehr stark abhängig von der kontinuierlichen, regelmäßigen und zuverlässigen Einnahme immunsuppressiver Medikamente, die jedoch zum Teil erhebliche Risiken und Nebenwirkungen für den Patienten mit sich bringen. Zu den häufigsten Komplikationen der unspezifischen Immunsuppression gehören Infektionen. So berichteten z.B. Nashan et al. über durchschnittlich 11% CMV Infektionen nach Nierentransplantationen (Nashan et al. 1999), wobei jedoch das individuelle Risiko der Infektion von der Art und Dosierung der immunsuppressiven Medikamente abhängt. Ein weiterer unerwünschter Effekt der Immunsuppression ist eine erhöhte Inzidenz von Malignomen (Nashan et al. 1999). Bei Vergleichen der Todesursache von Patienten, die eine Nierentransplantation 10 Jahre oder mehr überlebten, mit Patienten, die den gleichen Zeitraum ohne Transplantation an der Dialyse verbrachten, zeigte sich in einer Untersuchung von Penn, dass 26% der transplantierten Patienten an einem Malignom bzw. dessen Folgen starben, was nur für 1% der nicht- transplantierten Patienten zutraf (Penn 1998). Neben der erhöhten Anfälligkeit für Infekte und Malignome entstehen zusätzliche Probleme durch toxische Nebenwirkungen der Immunsuppression selbst. Ein Beispiel hierfür ist Ciclosporin A, welches unter anderem eine erhebliche Nephrotoxizität aufweist (Rodicio 2000).

Die Immunsuppression ist nicht in der Lage, die Abstoßung der transplantierten Organe vollständig zu verhindern. Während die akute Abstoßung durch eine immunsuppressive Therapie heutzutage in der Regel gut beherrscht werden kann, ist die chronische Abstoßung nach wie vor ein gravierendes Problem. Sie ist der häufigste Grund für einen späten Transplantatverlust (Nagano u. Tilney 1997) (McLaren et al. 2000). Entsprechend sind die 1-Jahres-Überlebensraten für die

meisten Transplantationen exzellent (Lebertransplantation 88%; Nierentransplantation 96%). Die 10-Jahresüberlebensraten hingegen sind deutlich schlechter (Lebertransplantation 52,5%; Nierentransplantation 40,5%) (Annual Report of the US Organ Procurement and Transplant Scientific Registry of Transplant Recipients 2007).

1.2 Transplantationstoleranz durch hämatopoetischen Chimärismus

Die oben beschriebenen Probleme könnten umgangen werden, wenn es gelänge, eine spender-spezifische Toleranz gegenüber den transplantierten Organen zu induzieren. Eine in den letzten Jahren intensiv untersuchte Möglichkeit zur Toleranzinduktion ist der gemischte hämatopoetische Chimärismus.

Der Begriff chimär stammt aus der griechischen Mythologie und bezeichnet eine Kreatur, die sich aus Bestandteilen unterschiedlicher Spezies zusammensetzt. In der Transplantationsimmunologie wird unter Chimärismus die Koexistenz von spender- und empfänger-spezifischen Zellen in einem Individuum verstanden.

Die Entdeckung der Toleranzinduktion durch hämatopoetischen Chimärismus geht auf Experimente Mitte der 50iger Jahre des letzten Jahrhunderts zurück. Damals hatten die Engländer Billingham und Medawar eine Technik der Hauttransplantation entwickelt und festgestellt, dass Transplantate zwischen genetisch identischen Individuen akzeptiert, während sie zwischen genetisch unterschiedlichen Individuen abgestoßen werden. (Billingham u. Medawar 1951). Sie wurden vom britischen Agrarministerium gebeten, diese Technik anzuwenden, um eineiige Kälberzwillinge von zweieiigen, sogenannten Freemartin Kälberzwillingen zu unterscheiden. Dies war für die Farmer von Bedeutung, da bei den Freemartin Kälbern die weiblichen Tiere steril sind und dadurch einen geringeren Marktwert erbringen als eineiige Kälberzwillinge. Zur Überraschung aller wurden die Hauttransplantate zwischen den Freemartin Kälbern jedoch nicht abgestoßen, obwohl es sich bei diesen zweieiigen Kälberzwillingen um genetisch unterschiedliche Individuen handelte (Billingham et al. 1952). Billingham et al. erinnerten sich an eine Entdeckung aus den 40iger Jahren, wo herausgefunden wurde, dass diese Kälber durch ihre gemeinsame Plazenta einen Chimärismus für rote Blutzellen aufwiesen (Owen 1945). Das heißt, im Blut der Kälber waren sowohl rote Blutzellen vom eigenen Typ als auch vom genetisch unterschiedlichen Geschwisterkalb nachweisbar. Es wurde die Hypothese entwickelt,

dass dieser Chimärismus für die Toleranz verantwortlich sein musste. Um dies zu beweisen, führten Billingham, Brent und Medawar die folgenden Versuche in Mäusen durch: sie inokulierten Zellhomogenate aus Geweben (Milz, Hoden, etc.) in fötale Empfänger im Mutterleib. Nach der Geburt erhielten die Tiere ein Hauttransplantat. Es wurden zum einen Spender verwendet, die mit den Spendern der inokulierten Gewebe genetisch identisch waren (spender-spezifische Transplantate); zum anderen wurde auch Haut transplantiert, die von genetisch differenten Spendern stammte (Drittstammtransplantate). Es zeigte sich, dass die Tiere eine spender-spezifische Transplantationstoleranz aufwiesen, d.h. spender-spezifische Transplantate wurden akzeptiert, während Drittstammtransplantate abgestoßen wurden (Billingham et al. 1953). Allerdings konnte dieser Effekt nur beobachtet werden, solange die Gewebekomponenten in fötale Empfänger eingebracht wurden. Wurden neugeborene Empfänger zum Zeitpunkt der Geburt inokuliert, so konnte keine Toleranz induziert werden. Eine Inokulation von Geweben in erwachsene Empfänger führte statt zu einer Toleranzinduktion sogar zu einer Immunisierung und somit zu einer beschleunigten Abstoßung spender-spezifischer Hauttransplantate (Billingham, et al. 1953).

Die Tatsache, dass hämatopoetischer Chimärismus spender-spezifische Toleranz induziert, erweckte in den folgenden Jahren große Aufmerksamkeit. 1985 konnte Knobler mit Mitarbeitern erstmals im Menschen eine Transplantationstoleranz nach Knochenmarktransplantation nachweisen. Ein Patient, der aufgrund einer hämatologischen Erkrankung eine Knochenmarktransplantation erhalten hatte, litt an einem chronischen Ulcus cruris. Er erhielt ein spender-spezifisches Hauttransplantat, welches ohne jegliche Immunsuppression vom Empfängerorganismus akzeptiert wurde (Knobler et al. 1985). Sayegh und Kollegen zeigte 1991, dass durch eine Knochenmarktransplantation auch eine spender-spezifische Transplantationstoleranz für Nierentransplantate erzielt werden kann (Sayegh et al. 1991). In der von ihnen veröffentlichten Fallbeschreibung wurde über zwei Patienten berichtet, die nach einer Knochenmarktransplantation durch die damit verbundene Chemotherapie und Bestrahlung niereninsuffizient wurden. Diese Patienten erhielten ein Nierentransplantat von dem Spender, von dem auch das transplantierte Knochenmark stammte. Die Transplantate wurden ohne weitere Immunsuppression vom Organismus des Empfängers akzeptiert (Sayegh et al. 1991). Wichtig ist es zu beachten, dass diese Induktion spender-spezifischer Toleranz in Patienten

nachgewiesen wurde, bei denen im Rahmen der Knochenmark-Transplantation ein hämatopoetischer Makrochimärismus entstand. In der Diskussion über die Induktion von Transplantationstoleranz durch hämatopoetischen Chimärismus wird in der Regel nicht ausreichend beachtet, dass es bei diesem Chimärismus sehr unterschiedliche Formen gibt. Der Makrochimärismus definiert sich über das Anwachsen der hämatopoetischen Stammzelle des Spenders im Organismus des Empfängers, so dass auf Dauer alle hämatologischen Zellpopulationen vom Spendertyp im Empfänger gebildet werden. Eine andere, in der Forschung eingehend untersuchte Form des hämatopoetischen Chimärismus ist der Mikrochimärismus. Er entsteht, indem Lymphozyten aus dem Transplantat mit der Transplantation des Organs auf den Empfänger übertragen werden. Spenderlymphozyten wandern aus dem transplantierten Organ aus und verteilen sich in Geweben des Empfängers. Eine Konditionierung mittels Bestrahlung und Chemotherapie, wie sie im Rahmen von Knochenmarktransplantationen durchgeführt wird, kommt hierbei nicht zum Einsatz. Es kommt allerdings auch nicht zum Anwachsen der hämatopoetischen Stammzelle. Der Mikrochimärismus unterscheidet sich deshalb vom Makrochimärismus durch zwei Dinge: zum einen ist der Anteil der Spenderzellen im Organismus des Empfängers niedriger als im Makrochimärismus, zum anderen sind beim Mikrochimärismus nicht alle hämatologischen Zellpopulationen des Spenders vorhanden.

Eine Induktion von Transplantattoleranz durch den vermuteten Mechanismus des Mikrochimärismus ist für Einzelfälle, insbesondere bei Leber- aber auch Nierentransplantierten, beschrieben (Starzl et al. 1992; Starzl et al. 1993). Es gibt aber auch kritische Stimmen, die hypothetisieren, dass der Mikrochimärismus nicht die Ursache, sondern ein Epiphänomen von Toleranz ist. Es wird vermutet, dass die Zellen in toleranten Empfängern im peripheren Blut nachweisbar sind, da sie aufgrund der Toleranz nicht abgestoßen werden (Hundrieser et al. 1995). Andere Untersuchungen vermögen überhaupt keinen Zusammenhang zwischen Mikrochimärismus und Toleranz nachzuweisen (Schlitt et al. 1994).

In der Folge wird deshalb das Phänomen des Mikrochimärismus vernachlässigt und der Begriff des Chimärismus mit dem oben beschriebenen Makrochimärismus gleichgesetzt.

1.3 Induktion von hämatopoetischen Chimärismus

Wie bisher aufgezeigt, kann also durch das Anwachsen der hämatopoetischen Stammzelle des Spenders im Organismus des Empfängers spender-spezifische Transplantationstoleranz erzielt werden. Das Anwachsen der hämatopoetischen Stammzelle wird im Rahmen einer konventionellen Knochenmarktransplantation durch eine Konditionierung des Empfängers vor der Knochenmarktransplantation ermöglicht. Zur Konditionierung gibt es unterschiedliche Protokolle, die verschiedene Kombinationen von Bestrahlung und/ oder Chemotherapie beinhalten.

Da die Knochenmarktransplantation zunächst vor allem im Bereich der hämatologischen Malignome eingesetzt wurde, existieren viele Konditionierungsregime, die zu einer kompletten Ablation des Immunsystems des Empfängers führen (Riley et al. 2005). Durch die Knochenmarktransplantation wird das Immunsystem des Spenders im Empfänger etabliert und ersetzt das empfängereigene Immunsystem (vollständiger hämatopoetischer Chimärismus). Dieses Verfahren ist allerdings mit einer erheblichen Komplikationsrate behaftet. Zu den Komplikationen gehören toxische Nebenwirkungen der Konditionierung, ein verzögertes Anwachsen des Transplantates oder sogar ein Transplantatversagen, Infektionen und die Graft-versus-Host Disease (Riley et al 2005). Die Induktion spender-spezifischer Transplantationstoleranz ist hingegen in diesem System sehr zuverlässig, da durch den kompletten Ersatz des Immunsystems des Empfängers durch das des Spenders, das transplantierte Spenderorgan vom Immunsystem nicht mehr als fremd erkannt wird. Allerdings rechtfertigen Morbidität und Mortalität der Knochenmark-Transplantation das Verfahren nicht als Routineverfahren im Rahmen der Toleranzinduktion bei solider Organtransplantation.

Eine andere Möglichkeit, das Anwachsen der hämatopoetischen Stammzelle und damit die Induktion eines Makrochimärismus zu erzielen, ist eine Knochenmarktransplantation mit einer nur partiellen, nicht-myeloablativen Konditionierung. Hierbei wird das Immunsystem des Empfängers nur geschwächt, aber nicht komplett zerstört. Der erhaltene Teil des Immunsystems des Empfängers bildet zusammen mit dem Immunsystem des Spenders den gemischten hämatopoetischen Makrochimärismus. Im peripheren Blut des Empfängers kommt es zu einer Koexistenz von Zellen des Spenders und des Empfängers, wobei das Überleben der hämatopoetischen Stammzelle des Empfängers im Idealfall genauso

gewährleistet ist wie die Produktion aller hämatologischen Zellpopulationen vom Spendertyp über das Anwachsen seiner Stammzelle. Daraus ergibt sich ein wesentlicher Vorteil: im Falle eines Transplantatversagens kann das Immunsystem aus dem geschwächten Anteil des eigenen Immunsystems nachgebildet werden. Auch ist das Konditionierungsregime bei dieser Methode deutlich weniger toxisch, somit vermindert sich das Morbiditäts- und Mortalitätsrisiko (Slavin et al. 2003). Darüber hinaus gibt es Hinweise, dass Individuen mit gemischtem Chimärismus eine bessere Immunkompetenz aufweisen als Individuen mit komplettem Chimärismus (Ildstad et al. 1985) und auch das Risiko einer Graft-versus-Host Erkrankung geringer ist (Jaquet et al. 2003). Auch die ursprünglichen Experimente von Billingham, Brent und Medawar basierten nicht auf einem kompletten Austausch des Immunsystems, sondern auf einer Koexistenz von Spender- und Empfängerzellen (Billingham et al. 1953), wobei in diesen Experimenten die entsprechenden Mittel für eine differenzierte Analyse des Chimärismus, wie z.B. die Durchflusszytometrie, noch nicht zur Verfügung standen.

Detaillierte Untersuchungen zur Effektivität der Induktion von Transplantattoleranz durch gemischtem hämatopoetischen Chimärismus stammen von Ildstad und Sachs, die zunächst Mäuse nach einer vollständig ablativen Konditionierung mit einem Gemisch aus Spender- und Empfängerspezifischem Knochenmark transplantierten. Die Tiere entwickelten einen gemischten Chimärismus und wiesen ebenso eine spenderspezifische Toleranz auf wie vollständige Chimären (Ildstad u. Sachs 1984). Dies konnte auch an Tieren gezeigt werden, bei denen der gemischte Chimärismus über eine Transplantation von Spenderknochenmark in partiell konditionierte Empfänger erreicht wurde. Die erste Veröffentlichung dazu stammte von Wood und Monaco, die mit Hilfe von Antilymphozytenserum das Anwachsen von allogenen Knochenmark über inkompatible minore Transplantationsantigene hinweg erreichten (Wood et al. 1971). Später wurde das polyklonale Antilymphozytenserum durch monoklonale Antikörper ersetzt (Cobbold et al. 1986). Ein Anwachsen des transplantierten Knochenmarkes über inkompatible Majorhistokompatibilitätsantigene hinweg konnte allerdings erst in Kombination mit einer Bestrahlung erreicht werden. So entwickelten Sharabi und Sachs ein Konditionierungskonzept aus einer Behandlung mit anti-CD4 und anti-CD8 Antikörpern in Kombination mit 300 cGy Ganzkörperbestrahlung und 700 cGy Thymusbestrahlung (Sharabi u. Sachs 1989). Setzt man in der Konditionierung zusätzlich zur Bestrahlung zytoreduktive Agentien

wie z.B. Cyclophosphamid ein, so wird das Anwachsen der Knochenmarkzellen noch weiter verbessert (Mayumi u. Good 1988). Wird die Anwendung von Cyclophosphamid mit einer präoperativen Gabe von Antilymphozytenserum (Colson et al. 1996) oder T-Zell depletierender monoklonaler Antikörper (Exner et al. 1997) kombiniert, so kann man mit einer relativ geringen Dosis an Ganzkörperbestrahlung stabilen Makrochimärismus erzielen.

Aus Versuchen im syngenen Mausmodell ist bekannt, dass auch die Dosis transplantierte Zellen einen erheblichen Einfluss auf ein erfolgreiches Anwachsen der transplantierten Zellen nimmt (Rao et al. 1997). Unter Ausnutzung dieses Effektes wurde von Wekerle und Kollegen erstmalig ein Konzept entwickelt, indem durch Blockade co-stimulatorischer Signale für die T-Zell Aktivierung und Transplantation einer höheren Zellzahl aus dem Knochenmark ein stabiler Makrochimärismus ohne zusätzliche Ganzkörperbestrahlung erzielt werden konnte (Wekerle et al. 2000). Inzwischen gibt es nicht nur Nagetiermodelle zur Induktion von gemischtem hämatopoetischen Chimärismus, sondern auch Großtiermodelle, wie z.B. das von Fuchimoto et al. im Minipig (Fuchimoto et al. 2000). Auch in der klinischen Anwendung gibt es erste Ansätze, dieses Verfahren für Patienten mit hämatologischen Erkrankungen zu etablieren (Spitzer et al. 1999; Fudaba et al. 2006).

1.4 Die Rolle des Thymus bei der Induktion der Transplantationstoleranz

Die im vorangegangenen Kapitel beschriebenen Tiermodelle beschäftigten sich primär mit verschiedenen Möglichkeiten zur Induktion von Chimärismus und nicht mit den Mechanismen, über die ein einmal induzierter Chimärismus die Transplantationstoleranz vermittelt. Diese Mechanismen sind bislang nicht komplett verstanden. Es wird u. a. vermutet, dass durch das Anwachsen der spender-spezifischen Stammzellen und die dadurch erzielte kontinuierliche Produktion von hämatologischen Zellen des Spendertyps, eine Präsentation von Spenderantigenen im Thymus gewährleistet wird. Hierdurch soll eine Deletion von spender-reaktiven T-Zellen im Empfängerorganismus erzielt werden, welches dann zur Ausbildung von Toleranz führt (Tomita 1994; Manilay 1998; Eto et al. 1999). Sollten die Forschungsbemühungen und Entwicklungen so weitergehen, könnten Strategien entwickelt werden, die einen gemischten Chimärismus induzieren, ohne die

Nachteile und vielen Nebenwirkungen der Konditionierung in Kauf nehmen zu müssen, die bislang eine klinische Anwendung behindert haben.

In diesem Zusammenhang wäre es von großem Vorteil die zugrunde liegenden Mechanismen der Toleranzinduktion besser zu verstehen, um sie ggf. optimieren zu können.

In den Experimenten der vorliegenden Dissertationsschrift soll die Rolle des Thymus bei der Toleranzinduktion durch hämatopoetischen Chimärismus weiter geklärt werden. Dabei soll weiter untersucht werden, ob auch über andere Mechanismen, in Abwesenheit des Thymus, die Entwicklung einer spender-spezifischen Toleranz durch gemischten Chimärismus stattfinden kann. Diese Fragen sind vor allem in Bezug auf die Übertragung des Konzeptes des gemischten Chimärismus in die Klinik von Bedeutung, denn der Thymus unterliegt einer Altersinvolution. In der Forschung werden zumeist Tiere in relativ jungem Alter mit intaktem Thymus verwendet (z.B. Mäuse im Alter von 4- 6 Wochen). In der Transplantationsmedizin werden aber vorwiegend erwachsene Patienten behandelt bei denen der Thymus bereits einer Involution unterlegen ist.

2. Fragestellung

In der vorliegenden Arbeit soll die Rolle des Thymus bei der Entstehung eines hämatopoetischen Chimärismus sowie seine Rolle bei der Induktion spender-spezifischer Transplantationstoleranz in einem allogenen Mausmodell untersucht werden. Im Einzelnen werden folgende Fragestellungen behandelt:

1. In wieweit kann durch eine Vorbehandlung im Sinne einer partiell ablativen Konditionierung und eine anschließende allogene Knochenmarktransplantation in dem vorliegenden Mausmodell ein hämatopoetischer Chimärismus induziert und durchflusszytometrisch nachgewiesen werden?
2. Führt die Induktion von hämatopoetischen Chimärismus zur Ausbildung von Transplantattoleranz gegenüber zweizeitig transplantierten Hauttransplantaten?
3. Ist die Induktion von Transplantattoleranz spenderspezifisch?
4. Welche Rolle kommt dem Thymus im Rahmen der hämatopoetischen Rekonstitution zu? In wieweit unterscheiden sich dabei thymektomierte Tiere von Tieren, deren vor Behandlung Thymus nicht entfernt wurde?

3. Material und Methoden

3.1 Versuchstiere und Tierhaltung

Die Versuche zu dieser Arbeit wurden vom zuständigen Ministerium für „Natur und Umwelt“ des Landes Schleswig-Holstein unter dem Titel „Untersuchung der Mechanismen zur Induktion spender-spezifischer Transplantationstoleranz mittels gemischtem hämatopoetischem Chimärismus im Mausmodell“ mit dem Aktenzeichen V252-72241.121-7(38-3/00) genehmigt.

Als Versuchstiere dienten männliche Mäuse dreier unterschiedlicher Inzuchtstämme. Ihr Alter betrug zwischen 4 und 6 Wochen. Die Tierhaltung erfolgte unter Einhaltung eines 12-stündigen Hell–Dunkel–Rhythmus bei 22 (\pm 2) °C Raumtemperatur und einer relativen Luftfeuchtigkeit von 55 – 65 % in eigens für sie hergestellten Hart-Kunststoffkäfigen. Die Tiere erhielten Altromin® Pressfutter (Altromin GmbH, Lage) und Wasser ad libitum.

Hier die verwendeten Inzuchtstämme im tabellarischen Überblick:

| Inzuchtstamm | Mäusebezeichnung | Funktion | MHC- Haplotyp |
|--------------|------------------|-----------------------|---------------|
| I | C57BL/6NCrl | Knochenmark-Empfänger | H2-b |
| II | C3H/HeNCrl | Knochenmark-Spender | H2-k |
| III | Balb/c | 3. - Stamm | H2-d |

Tabelle 3.1: Für die Versuche eingesetzte Mäuseinzuchtstämme

3.2 Operationsverfahren

3.2.1 Narkose und technische Hilfsmittel

Die Narkose wie auch die Tötung der einzelnen Tiere, insbesondere der zu thymektomierenden C57BL/6 Empfänger- sowie C3H Spendertiere wurde unter Ätherinhalationsnarkose (Äther, Carl Benz und Sohn, Frankfurt/Main) durchgeführt.

3.2.2 Thymektomie und Histologie

Nach Rasur und Desinfektion der ventralen Thoraxhaut wurde diese mit einem medianen Hautschnitt, vom Hals bis zur Sternumspitze reichend, durchtrennt und somit der Halsfettkörper freigelegt. Dieser, wie auch die ventrale Halsmuskulatur wurden gespalten und nach links und rechts verlagert. Anschließend erfolgte die Präparation bis auf die Trachea und die Spaltung des Sternums. Die nun exponierten 2 Thymusanteile wurden in einem Stück unter Schonung der anatomisch wichtigen Strukturen nach Setzen einer Fadenligatur extrahiert. Nach Entfernung des Thymus wurde die Wunde zweireihig verschlossen. Die anschließende Erholungsphase der Maus wurde durch die Gabe von Sauerstoff unterstützt. Die Operationszeit betrug 5 ± 2 Minuten.

Die anschließende Konditionierung und Knochenmarktransplantation erfolgten nach Abschluss der Wundheilung, 10 Tage nach durchgeführtem Eingriff.

Nach endgültiger Beendigung der Versuchsreihen wurde den thymektomierten Tieren zusätzlich eine Gewebeprobe aus der ehemaligen Thymusloge entnommen. Die Proben wurden in 4%-igem Formalin (Fa. Merck KGaA, Darmstadt) fixiert, in Paraffin (Fa. Merck KGaA, Darmstadt) geschnitten und nach Hämatoxylin-Eosin (H.E.) gefärbt. Die Begutachtung der gefärbten Schnitte wurde von einem unabhängigen Pathologen kontrolliert. Es wurden nur Tiere in der Auswertung verwendet, bei denen kein Thymusrestgewebe mehr nachgewiesen werden konnte.

3.2.3 Konditionierung und Knochenmarktransplantation

C57BL/6NCrI Empfängertiere wurden vor Knochenmarktransplantation mit 500 cGy ganzkörperbestrahlt (Institut für Immunologie, Universität Schleswig- Holstein, Campus Kiel, Gerät Gammacell 40, Atomic Energy, Mississauga, Canada).

Anschließend erfolgte die Präparation des Spenderknochenmarks. Als Spender dienten C3H/HeNCrI Mäuse. Nach Tötung der Tiere unter Ätherinhalation wurden ihre Hinterläufe abgetrennt. Das Knochenmark aus Femur und Tibia wurde unter Spülung mit RPMI 1640 (Fa. Lonza, Belgien) über eine 17er Kanüle (B. Braun, Melsungen AG) aus dem jeweiligen Schaftapex unter der sterilen Bank gewonnen. Anschließend erfolgte eine Filtration des Knochenmarks über einen 100µm Nylon Filter (Cell stainer, FALCON®, Becton Dickinson Labware, Deutschland) und die Sammlung im Reagenzröhrchen. Die erhaltene Suspension wurde im nächsten Schritt 5 Minuten bei 1000 U/min zentrifugiert (Heraeus Megafuge 1.0, Heraeus, Hanau, Deutschland), anschließend der flüssige Überstand abgenommen. Diese Zellsuspension wurde mit einer vorher definierten Menge von 1ml RPMI 1640 erneut gelöst und die Zellzahl in einer 1:10 Verdünnung in der Neugebauer-Zählkammer (Fa. Roth, Karlsruhe, Deutschland) bestimmt. 15×10^6 Zellen/ml Nährlösung (RPMI 1640) wurden den konditionierten Empfängertieren (C57BL/6NCrI) über die Schwanzvene mittels einer 27G $\frac{3}{4}$ Injektionsnadel (BD Microlance™, Becton Dickinson Labware, Deutschland) injiziert.

Zwei Tage nach Knochenmarktransplantation erfolgte im Rahmen der chemischen Konditionierung des Empfängers die einmalige intraperitoneale Gabe von 200mg/ kg x KG Cyclophosphamid (Baxter International, Deerfield, Illinois, USA).

3.3 Hämatologische Untersuchung und Durchflusszytometrie

Vier, acht und sechzehn Wochen nach Knochenmarktransplantation wurden den Tieren aus der Schwanzvene unter Ätherinhalationsnarkose jeweils 0,5 ml Blut entnommen. Dieses Blut wurde in heparinisierte (Liquemin®, Hoffmann-La Roche AG, Grenzach-Wyhlen, Deutschland) Eppendorf Röhrchen (Fa. Roth, Karlsruhe, Deutschland) eingefüllt. Die weitere Aufbereitung des heparinisierten Blutes erfolgte in FACS Röhrchen (Sarstedt, Nürnberg), die mit je 20 µl Blut befüllt wurden. Hier erfolgte die Zugabe von jeweils 2 ml FACS Lysing- Lösung (Becton Dickinson,

Hamburg, Deutschland) für 5 min zur erforderlichen Hämolyse der enthaltenen Erythrozyten. Die Beendigung der hämolytischen Reaktion wurde durch Zugabe von 2 ml Phosphate Buffer Saline (PBS, Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland) erreicht. Anschließend erfolgte die Zentrifugation der Zellsuspension für 5 Minuten (1000 U/min). Nach diesen Arbeitsschritten wurden 20 µl der in Tabelle 3.2 angeführten und entsprechend verdünnten monoklonalen farbstoffmarkierten Antikörper pro Röhrchen hinzugefügt. Als Farbstoffmarkierung der getesteten Antikörper wurden sowohl Fluoreszeinthiocyanat (FITC) als auch R-Phycoerythrin-Streptavidin-Komplexe verwandt.

Nach einer Inkubationszeit von 30 Minuten bei 4 °C im Dunkeln erfolgte ein Waschvorgang durch Zugabe von PBS und anschließender Zentrifugation für 5 Minuten (1000 U/ min). Dieser Vorgang wurde noch zweimal wiederholt. Nach der letzten Zentrifugation wurden 200 µl Phosphat Puffer (PBS) hinzugeführt.

Die so erhaltenen Zellen und deren Populationen konnten nun anhand der Durchflusszytometrie am FACS- Gerät (FACS Calibur mit Cellquest Software, Becton Dickinson, Heidelberg, Deutschland) bestimmt und ihr Prozentanteil ermittelt werden. Die Messung erfolgte innerhalb von 5 Stunden nachdem die Zellen abgeschlossen gereinigt und in die zu messende Suspension gebracht wurden. Bei Messungen, die auf die folgenden 24h verschoben werden mussten, wurden die Zellen durch die Zugabe von 1% Paraformaldehyd fixiert.

3.4 Angewandte Antikörper

Alle verwendeten Antikörper wurden von der Firma Becton Dickinson in Heidelberg, Deutschland, bezogen.

| mAk (Antikörper) | Isotyp | Antikörper- konzentration | Färbe- eigenschaft | Reaktions- eigenschaft |
|--|-------------------------------------|------------------------------|-----------------------|--|
| H-2Kb | Mouse (Balb/c) IgG2a, k | 0,5mg/ml | FITC | Reaktion am H-2 ^{kD} MHC Klasse I Alloantigen |
| H-2Kk | Mouse (A. TL) IgG2a,k | 0,1mg/ml | PE | Reaktion am H-2 ^{kK} MHC Klasse I Alloantigen |
| CD 3 ϵ | Armenian Hamster IgG, group 1 | 0,5mg/ml | FITC | Reaktion mit 25-kDa ϵ Kette d. T-Zell assoziierten CD3 Komplexes |
| CD 4 | Rat (DA) IgG2a, k | 0,5mg/ml | FITC | Reaktion mit CD4 differenzierten Antigen auf Thymozyten + T- Lymphozyten |
| CD8a | Rat (LOU/Ws1/M) IgG2a, k | 0,5mg/ml | FITC | Reaktion mit 38-kDa α Kette d. CD8 Antigene |
| CD45R/B220 | Rat IgG2a, k | 0,5mg/ml | FITC | Reaktion mit Epitop auf extrazellulärer Domäne d. CD45 Glykoproteins |
| TCR beta Kette | Armenian Hamster IgG, group 2 | 0,5mg/ml | FITC | Reaktion mit Epitop d. β Kette d. TCR |
| gammadelta TCR | Armenian Hamster IgG, group 2 | 0,5mg/ml | FITC | Reaktion mit $\gamma\delta$ T- Zell Rezeptor Komplex |
| Pan-NK Cells | Rat IgM, k | 0,5mg/ml | FITC | Reaktion mit Mehrheit d. NK Zellen + kleine T- Zell Population |
| Ly-6G (Gr-1) | Rat IgG2b, k | 0,5mg/ml | FITC | Reaktion mit Ly-6G Protein, direkte Korrelation zur Granulozyten Differenzierung |
| CD11b (Integrin alphaM chain, Mac-1alpha chain) | Rat (DA) IgG2b, k | 0,5mg/ml | FITC | Reaktion mit 170kDa α M Kette d. Mac-1 (CD11b/CD18) |

Tabelle 3.2: In der Durchflusszytometrie und Versuchsreihen angewandte Antikörper mit entsprechendem Reaktionsmuster und Konzentration zur Darstellung der unterschiedlichen Zellreihen

3.5 Technik der Hauttransplantation

Als Hautspender dienten Mäuse aus dem Inzuchtstamm C3H/HeNCrI, deren Haut zeigen sollte, ob durch die Knochenmarktransplantation tatsächlich Toleranz induziert worden war. Die Haut der Balb/c Tiere sollte als 3.-Stamm eine Kontrolle für die Spenderspezifität des beobachteten Effektes dienen, um ihn von einer Akzeptanz durch unspezifische Immunsuppression abzugrenzen. Darüber hinaus wurde Haut von (C57BL/6NCrI) Tieren als syngene Technikkontrolle verwendet. Bei allen Tierstämmen wurde deren Schwanzhaut als Hauttransplantat genutzt.

Die Tiere wurden getötet. Die Schwanzhaut wurde dann durch zwei zirkumflexe Schnitte am proximalen und distalen Ende sowie einen medianen Hautschnitt mit einem 10er Skalpell gespalten. Danach wurde sie mit einer chirurgischen Pinzette proximal gefasst und nach distal abgezogen. Jetzt konnte die als Transplantat dienende Haut auf einer angefeuchteten Kompresse glatt gestrichen und zu 0,7x 0,7 mm großen Quadraten zugeschnitten werden.

Die Empfängertiere (C57BL/6NCrI) wurden mit einer Rompun/ Ketanest Kombinationsnarkose anästhesiert. Hierbei wird eine Gebrauchslösung von 0.05 ml Rompun (Bayer HealthCare, Deutschland) und 1,0 ml Ketanest (Pharmacia& Upjohn GmbH, Erlangen, Deutschland) intraperitoneal verabreicht. Anschließend wurde der zu transplantierende Bereich im Rücken- und Thoraxbereich rasiert und desinfiziert, um ein sauberes Entfernen der Oberhaut zu ermöglichen. Dies geschah entweder mit einer eigens dafür bestimmten Präparierschere oder mit einem vorne abgerundeten Skalpell (15er Cutfix® Skalpell, Fa. B. Braun Melsungen, Deutschland).

Nach Entfernen der Hautschichten wurde die zu transplantierende Haut vorsichtig mit einer anatomischen Pinzette gefasst und auf das etwa doppelt so groß freigelegte Areal auf dem Rücken des Empfängertieres gelegt. Eine ausreichende Fixation der Transplantate konnte mittels einer Schicht Wundgaze (Fa. Aventis Pharma, Frankfurt, Deutschland) und einer darüber, um den gesamten Thorax zirkulär gewickelten, zu einem schmalen Streifen geschnittenen Gipsbinde (Fa. Lohmann-Rauscher, GmbH, Neuwied am Rhein, Deutschland) gewährleistet werden. Dieser Zustand wurde über einen Zeitraum von 7 Tagen belassen; erst dann wurde die Ummantelung entfernt und die Transplantate freigelegt, um nun fortlaufend bis zu

einer möglichen Abstoßung und darüber hinaus begutachtet zu werden. Dabei wurden die Tiere täglich auf Sitz des Gipses und Wohlbefinden kontrolliert. An den Tagen der Kontrollabstände wurde der Zustand des Transplantates teils fotografisch festgehalten.

3.6 Einteilung der Versuchsgruppen

Zur Klärung der Relevanz und Rolle des Thymus in der Ausbildung des gemischten hämatopoetischen Chimärismus wurden insgesamt 47 Tiere transplantiert. Hierbei wurde Knochenmark von C3H/HeNCrI Spendern auf C57Bl/6NCrI Empfänger transplantiert. Diese teilten sich auf in 22 unmanipulierte Kontrolltiere und 25 thymektomierte Tiere.

Die Tiere wurden während der festgelegten Zeiträume, nach 4, 8, 16 sowie 24 Wochen auf ihren Chimärismus, die Anzahl der Leukozyten und die Verteilung der Leukozyten-Subpopulationen hin untersucht.

Vier Wochen nach Knochenmarktransplantation wurden die Versuchstiere einer Hauttransplantation unterzogen.

Diese Haut stammte zum einen von Tieren desselben Stammes wie die des Spenders des Knochenmarkes (C3H/HeNCrI), zum zweiten von Tieren desselben Stammes wie die des Empfängers des Knochenmarkes (C57Bl/6NCrI) und als letztes von Tieren eines Drittstammes (Balb/c).

3.7 Statistik

Die angeführten Ergebnisse wurden als Mittelwert \pm SEM (standard error of the mean) aufgeführt. Die statistischen Analysen erfolgten mit Hilfe der Graph Pad Prism® Software der Version 4.03 (GraphPad, San Diego, CA, U.S.A.). Für die Berechnung, ob die Wahrscheinlichkeit des erfolgreichen Anwachsens durch eine Thymektomie beeinflusst wird, wurde mit dem Chi-Quadrat Test sowie mit dem Fisher's Exact Test untersucht. Für alle anderen Analysen wurde der Student-T Test verwendet.

4. Ergebnisse

4.1 Hämatopoetische Rekonstitution nach Knochenmarktransplantation

Im Rahmen der Knochenmarktransplantation wurde eine Konditionierungsbehandlung der Tiere durchgeführt, die zu einer unvollständigen Depletion des hämatopoetischen Systems des Empfängers führte. Nach der Knochenmarktransplantation kam es zu einer hämatopoetischen Rekonstitution. Hier sollte zunächst betrachtet werden, ob sich ein Unterschied in der hämatopoetischen Rekonstitution zwischen Tieren mit funktionstüchtigem Thymus und thymektomierten Tieren findet. Als ein Maß für die hämatopoetische Rekonstitution der Tiere, wurde die Anzahl der Leukozyten im peripheren Blut gewählt. Als Referenzwerte für eine normale Leukozytenzahl bestimmten wir zunächst die durchschnittliche Leukozytenzahl im peripheren Blut von unbehandelten Mäusen des Spender- und Empfängerstammes. Sie lagen bei 6559 ± 597 Leukozyten/nl für C57BL/6 Mäuse bei 6123 ± 502 Leukozyten/nl für C3H Mäuse (vgl. Abbildung 4.1). Es zeigten sich also keine signifikanten Unterschiede zwischen diesen beiden Mausstämmen.

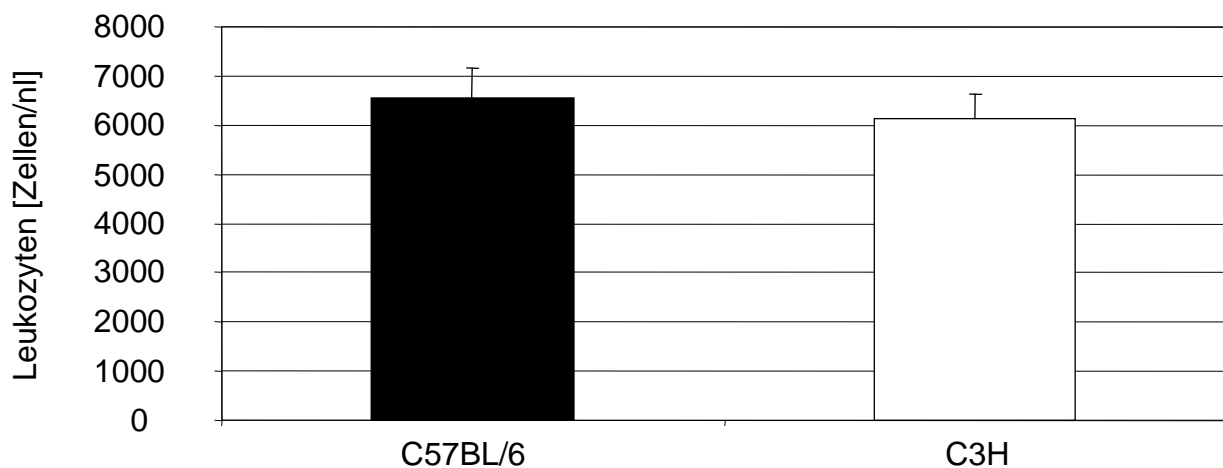


Abbildung 4.1: Im peripheren Blut nachweisbare Leukozytenzahl der unbehandelten Mausstämme C57BL/6 (Empfänger) und C3H (Spender)

Anschließend wurde die Anzahl der Leukozyten im peripheren Blut der Tiere 4, 8, 16 und 24 Wochen nach der Knochenmarktransplantation betrachtet.

Vier Wochen nach Konditionierung und Transplantation wiesen sowohl thymektomierte Tiere (1894 ± 220 Leukozyten/nl), als auch nicht-thymektomierte

Kontrolltiere (2341 ± 296 Leukozyten/nl) sehr niedrige Leukozytenzahlen auf. Es lag ein Trend zu niedrigeren Lymphozytenzahlen in den thymektomierten Tieren vor, dieser Trend war aber nicht statistisch signifikant.

Acht Wochen nach Knochenmarktransplantation verstärkte sich diese Tendenz. In den thymektomierten Tieren ließen sich nur 2715 ± 361 Leukozyten/nl nachweisen, während die nicht- thymektomierten Kontrolltiere im Durchschnitt 4527 ± 523 Leukozyten/nl im peripheren Blut zeigten. Dieser Unterschied war statistisch signifikant ($p < 0,02$). Diese Beobachtung zeigte sich an den Leukozytenzahlen 16 Wochen nach Knochenmarktransplantation in gleicher Weise, wieder lagen die Leukozytenzahlen bei den thymektomierten Tieren mit 5587 ± 456 Leukozyten/nl niedriger, als die der nicht- thymektomierten Kontrollen mit 7250 ± 301 Leukozyten/nl. Auch dieser Unterschied war mit $p < 0,01$ statistisch signifikant.

Erst 24 Wochen nach Knochenmarktransplantation hob sich dieser Unterschied auf, und die Leukozytenzahlen der thymektomierten Tiere waren mit 5893 ± 668 Leukozyten/nl nicht mehr signifikant unterschiedlich von denen der Kontrolltiere mit 6200 ± 454 Leukozyten/nl (vgl. Abbildung 4.2).

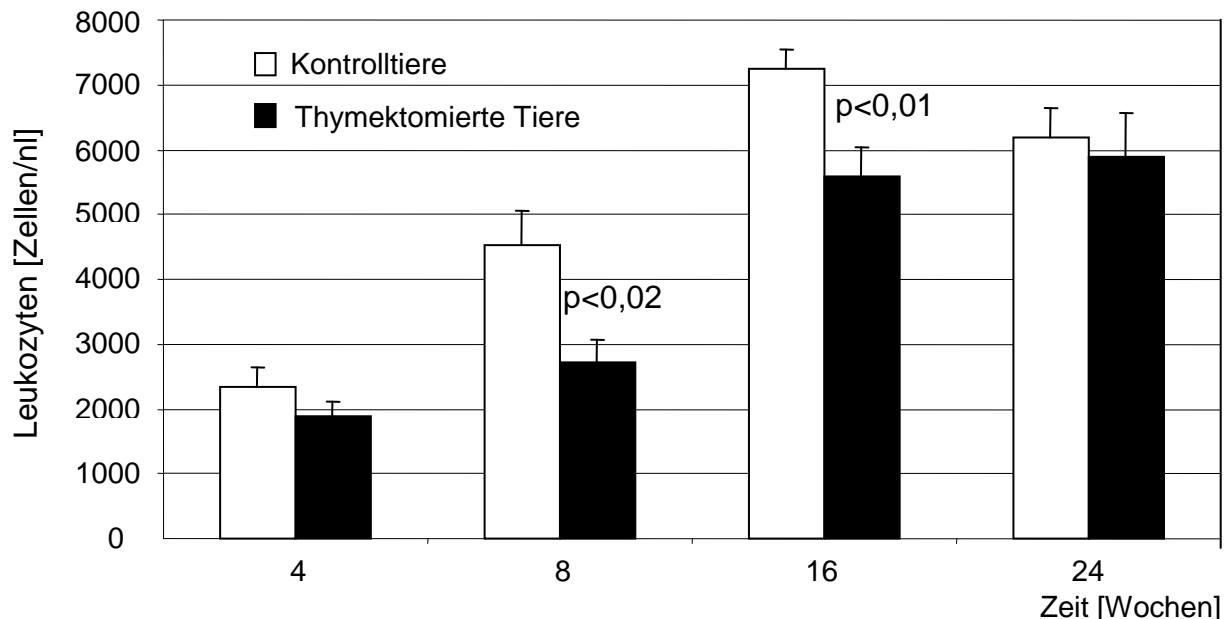


Abbildung 4.2: Vergleich der Leukozytenanzahl von thymektomierten- und nicht-thymektomierten Kontrolltieren nach Knochenmarktransplantation im zeitlichen Verlauf

Vergleich man die Leukozytenzahlen nach Knochenmarktransplantation mit denen unbehandelter C57BL/6 Empfänger bzw. C3H Spender, so fiel auf, dass sowohl bei

den thymektomierten Tieren, als auch bei den Kontrolltieren die Anzahl der Leukozyten im peripheren Blut nach 4 und nach 8 Wochen signifikant unterschiedlich von den durchschnittlichen Leukozytenzahlen unbehandelter Tiere war. Erst nach 16 bzw. 24 Wochen wurden die Ausgangswerte wieder erreicht bzw. in den Kontrolltieren 16 Wochen nach Transplantation leicht überschritten (vgl. Abbildung 4.3).

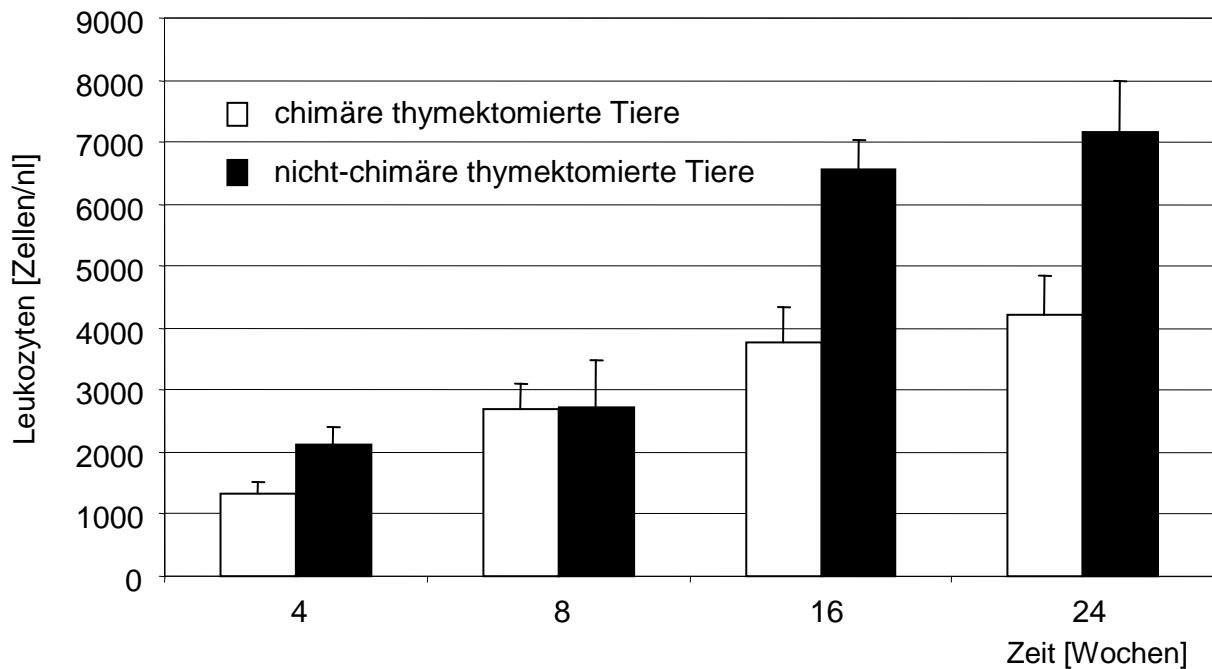


Abbildung 4.3: Leukozytenzahlen der thymektomierten Tiere aufgeschlüsselt nach chimären und nicht-chimären Tieren

Interessant war auch der Vergleich von chimären und nicht-chimären Tieren. Zunächst sollen die thymektomierten Tiere betrachtet werden: Hier erholten sich die Leukozytenzahlen langsam, unterschieden sich nach 4 und 8 Wochen aber nicht wesentlich zwischen chimären und nicht-chimären Tieren. So fanden sich nach 4 Wochen 1320 ± 206 Leukozyten/nl im Blut der chimären Tiere und 2133 ± 275 im Blut der nicht chimären Tiere. Der Trend zu höheren Zahlen bei chimären Tieren war statistisch nicht signifikant ($p < 0,1$).

Nach 8 Wochen wiesen die chimären Tiere 2700 ± 413 Leukozyten/nl im peripheren Blut auf, bei den nicht chimären Tieren fanden sich 2740 ± 736 Leukozyten/nl ($p < 0,4$). Danach jedoch stiegen die Leukozytenzahlen der thymektomierten Tiere, bei denen Knochenmark nicht angewachsen war auf das Ausgangsniveau an und

betragen nach 16 Wochen 6553 ± 479 Leukozyten/nl bzw. nach 24 Wochen 7150 ± 837 Leukozyten/nl.

Bei den chimären Tieren hingegen waren deutlich weniger Leukozyten im peripheren Blut zu finden. So betragen die Leukozytenzahlen dieser Tiere nach 16 Wochen im Durchschnitt nur 3775 ± 551 Leukozyten/nl bzw. nach 24 Wochen 4217 ± 644 Leukozyten/nl. Dieser Unterschied war mit $p < 0,02$ für den Wert nach 16 Wochen und $p < 0,03$ für den Wert nach 24 Wochen statistisch signifikant (vgl. Tabelle 4.1).

| Chimäre und nicht- chimäre Tiere zusammengefasst | C57BL/6 | C3H |
|---|--------------------|--------------------|
| 4 Wochen Kontrolle | $p < 0,0001$ | $p < 0,0001$ |
| Thymektomiert | $p < 0,0001$ | $p < 0,0001$ |
| 8 Wochen Kontrolle | $p < 0,002$ | $p < 0,03$ |
| Thymektomiert | $p = 0,0002$ | $p = 0,0001$ |
| 16 Wochen Kontrolle | n.s. ($p = 0,5$) | $p < 0,02$ |
| Thymektomiert | n.s. ($p = 0,2$) | n.s. ($p = 0,5$) |
| 24 Wochen Kontrolle | n.s. ($p = 0,6$) | n.s. ($p = 0,6$) |
| Thymektomiert | n.s. ($p = 0,4$) | n.s. ($p = 0,2$) |

Tabelle 4.1: Darstellung der statistischen Signifikanz im Vergleich der Leukozytenzahl im peripheren Blut der Tiere nach Knochenmarktransplantation mit denen unbehandelter C57BL/6 Empfänger bzw. C3H Spender

Um Rückschlüsse darauf zu erhalten, ob es sich hierbei um einen Effekt des Chimärismus generell handelte oder ob die Thymektomie einen Einfluss auf die hämatopoetische Rekonstitution der Mäuse hatte, wurden die Kontrolltiere dann nach chimären und nicht-chimären Tieren getrennt betrachtet.

Bei dieser Analyse zeigte sich, dass bei den Kontrolltieren 4, 8 und 16 Wochen nach Knochenmarktransplantation kein statistisch signifikanter Unterschied in den Leukozytenzahlen nachweisbar war (4 Wochen: 2673 ± 386 Leukozyten/nl in chimären Tieren und 1733 ± 364 Leukozyten/nl in nicht-chimären Tieren, $p < 0,2$; 8 Wochen: 4623 ± 602 Leukozyten/nl in chimären Tieren und 3900 ± 100 Leukozyten in nicht-chimären Tieren, $p < 0,7$; 16 Wochen: 6900 ± 332 Leukozyten/nl in chimären Tieren und 7667 ± 604 Leukozyten/nl in nicht-chimären Tieren, $p < 0,3$).

Nach 24 Wochen wiesen ähnlich wie bei den thymektomierten Tieren die chimären Tiere der Kontrollgruppe mit 5422 ± 525 Leukozyten/nl statistisch signifikant niedrigere Werte auf, als nicht-chimäre Tiere (7367 ± 571 Leukozyten/nl, $p < 0,03$). Allerdings zeigten sowohl chimäre als auch nicht-chimäre Tiere der Kontrollgruppe Leukozytenzahlen auf, die insgesamt den Leukozytenzahlen der unbehandelten Kontrollen mit 6559 ± 597 Leukozyten/nl für C57BL/6 Mäuse und 6123 ± 502 Leukozyten/nl für C3H Mäuse deutlich näher waren als die der thymektomierten Tiere (vgl. Abbildung 4.4).

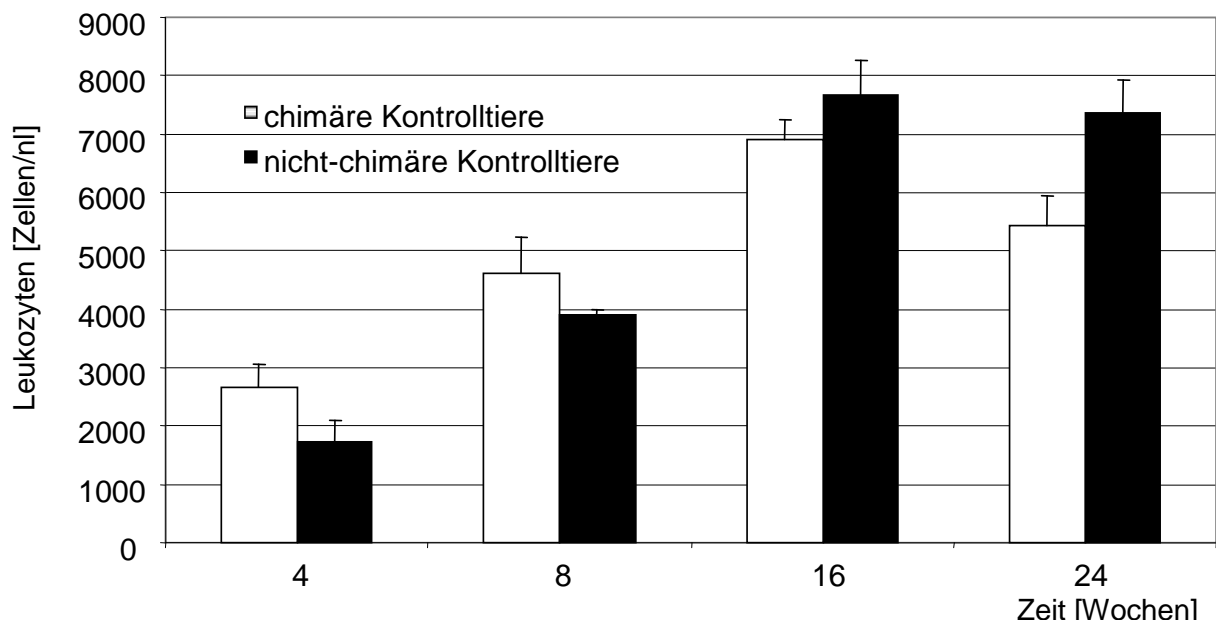


Abbildung 4.4: Leukozytenzahl der chimären und nicht-chimären Kontrolltiere

Vergleich man die Leukozytenzahlen der Tiere mit den durchschnittlich normalen Leukozytenzahlen der C57BL/6 Empfänger bzw. mit den C3H Spendern, so ergab sich, dass trotz der tendenziell unterschiedlichen Leukozytenzahlen zwischen thymektomierten Tieren und nicht-thymektomierten Tieren kein statistisch signifikanter Unterschied bestand.

4.2 Rate und Niveau der Induktion eines Chimärismus

Als nächstes wurde untersucht, ob es einen Unterschied im Anwachsen des transplantierten Knochenmarkes zwischen thymektomierten Tieren und nicht-thymektomierten Kontrollen gab.

Es wurden in unserem Modell C3H Mäuse als Spender (Mausspezifische Gewebemerkmale H-2^k) und C57BL/6 Mäuse als Empfänger (Mausspezifische Gewebemerkmale H-2^d) verwendet, so dass der Anteil spender- bzw. empfänger-spezifischer Zellen im peripheren Blut mittels fluoreszenzkonjugierter Antikörper gegen H2^k und H2^d-Antigene durchflusszytometrisch bestimmt werden konnte.

Vier Wochen nach Knochenmarktransplantation konnte bei 13 der insgesamt 23 Kontrolltiere (57%) ein spender-spezifischer Chimärismus nachgewiesen werden. Bei 10 Tieren (43%) zeigten sich 4 Wochen nach Knochenmarktransplantation keine spender-spezifischen Zellen im peripheren Blut (Abbildung 4.5).

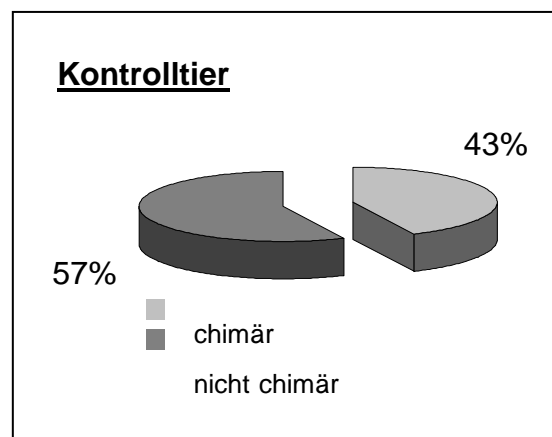


Abbildung 4.5: Anteil der chimären Tiere bei den nicht-thymektomierten Kontrolltieren

Bei den thymektomierten Tieren kam es bei 32% der Tiere zu einem gemischten hämatopoetischen Chimärismus, während das Anwachsen des Knochenmarkes in 68% nicht gelang (vgl. Abbildung 4.6).

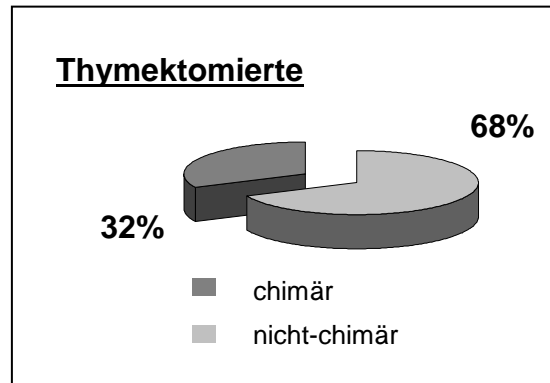


Abbildung 4.6: Anteil der chimären Tiere bei den thymektomierten Versuchstieren

In der Gruppe der nicht-thymektomierten Kontrolltiere entwickelten tendenziell mehr Tiere einen gemischten Chimärismus als bei den thymektomierten Tieren. Dieser Trend erreichte allerdings keine statistische Signifikanz ($p < 0,2$). In diesem Modell der Knochenmarktransplantation wurden die Tiere mit nur partieller Ablation des Immunsystems behandelt. Die Konditionierung war also als solche nicht letal und es überlebten auch die Tiere, bei denen das Knochenmark nicht angenommen wurde. Dieses galt sowohl für die Kontrolltiere, wie auch für die thymektomierten Tiere. Nun wurde der prozentuale Anteil der Spenderzellen im peripheren Blut chimärer Tiere analysiert.

4 Wochen nach Knochenmarktransplantation zeigte das Niveau des Chimärismus bei den thymektomierten Tieren ($46,8 \pm 5,7\%$) keinen Unterschied zu dem Niveau bei den Kontrolltieren ($46,6 \pm 4,8\%$) ($p < 0,99$). Nach 8 Wochen zeigte sich ein Abfall des Spenderanteils, der bei den thymektomierten Tieren im Trend deutlicher ausgeprägt war. So sank der durchschnittliche Anteil der Spenderzellen bei den thymektomierten Tieren auf $24,8 \pm 4,2\%$ und bei den Kontrolltieren nur auf $33,9 \pm 6,6\%$. Allerdings erreichte dieser Unterschied keine statistische Signifikanz ($p < 0,3$).

Auch nach 16 Wochen lag der Anteil der spender-spezifischen Zellen im peripheren Blut der Empfänger bei den thymektomierten Tieren mit $23,9 \pm 5\%$ niedriger zu liegen als bei den Kontrolltieren mit $37,4 \pm 5,0\%$, hier lag auch keine statistische Signifikanz vor ($p < 0,08$). Nach 24 Wochen war der Trend zu einem niedrigerem Anteil von Spenderzellen in thymektomierten Tieren verschwunden. Der Anteil der

Spenderzellen bei thymektomierten Tieren betrug $33,6 \pm 9,9\%$ und bei den Kontrolltieren $36,6 \pm 5,4\%$ (vgl. Abbildung 4.7).

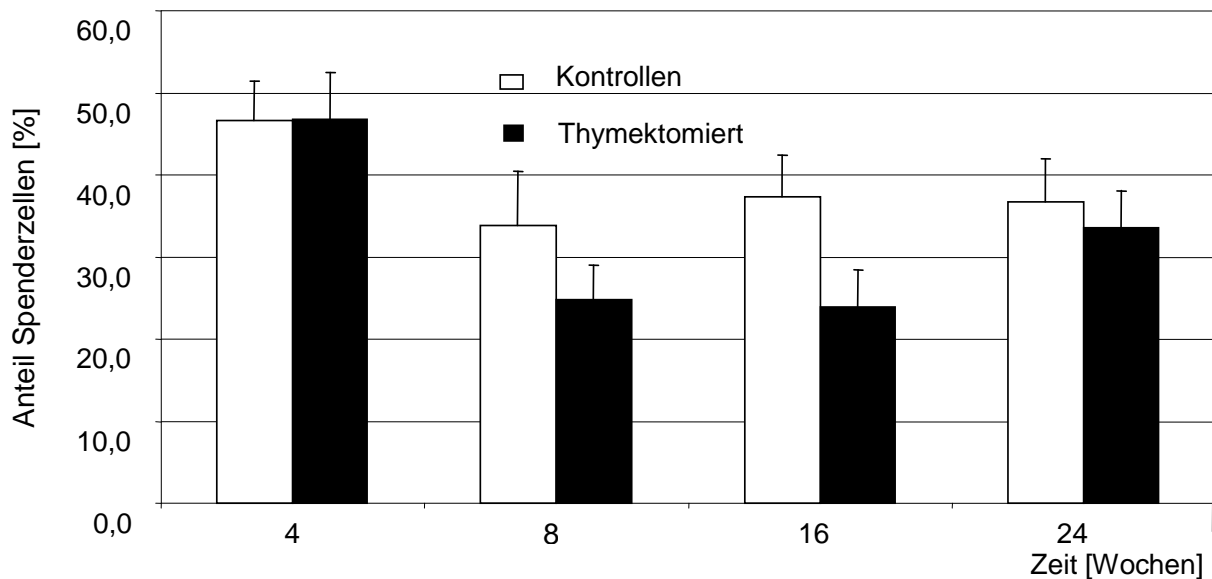


Abbildung 4.7: Prozentualer Verlauf des Anteils der Spenderzellen an den Gesamtleukozyten im peripheren Blut der Empfänger

Nicht nur der prozentuale Anteil der Zellen des Spenders an der Gesamtpopulation war interessant, sondern auch die absolute Zahl der Spenderzellen. Hierbei fiel auf, dass in thymektomierten Tieren über die gesamte Zeit weniger Spenderzellen im peripheren Blut nachweisbar waren als in Kontrolltieren (4 Wochen: 1248 ± 229 Spenderzellen/nl in Kontrolltieren, 606 ± 78 Spenderzellen/ nl in thymektomierten Tieren, $p < 0,09$; 8 Wochen: 1235 ± 289 Spenderzellen/ nl in Kontrolltieren, 644 ± 160 Spenderzellen/ nl in thymektomierten Tieren, $p < 0,2$; 16 Wochen: 2596 ± 399 Spenderzellen/ nl in Kontrolltieren, 898 ± 268 Spenderzellen/nl in thymektomierten Tieren, $p < 0,005$; 24 Wochen: 2043 ± 394 Spenderzellen/ nl in Kontrolltieren, 1246 ± 182 Spenderzellen /nl in thymektomierten Tieren, $p < 0,2$). Dieser Trend war allerdings nur in den Werten 16 Wochen nach Transplantation statistisch signifikant (vgl. Abbildung 4.8).

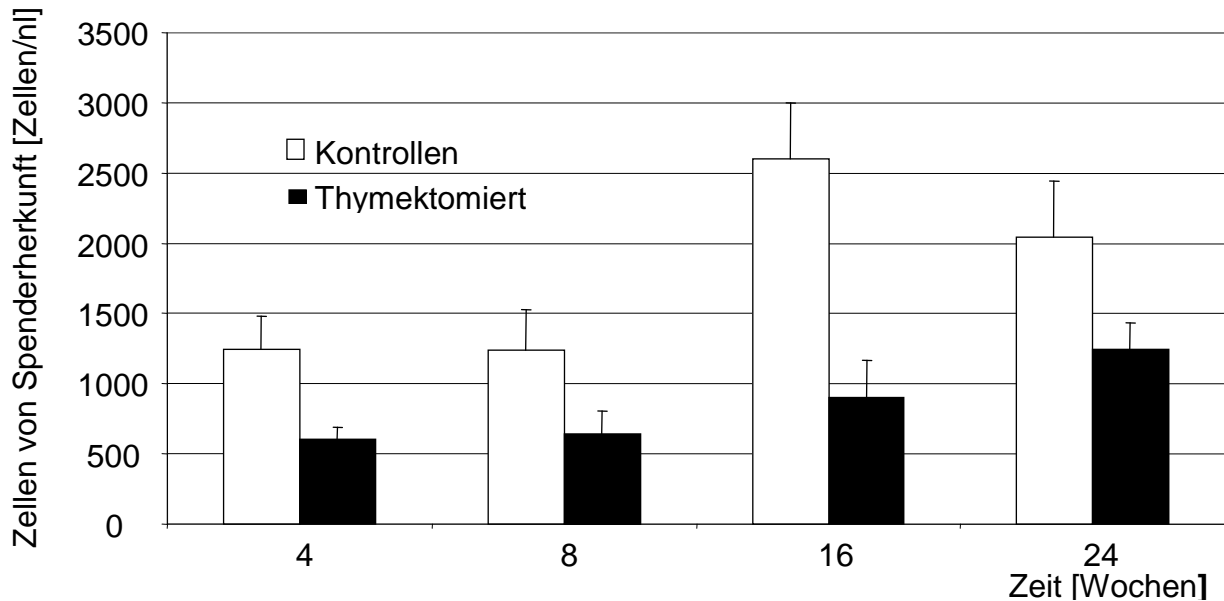


Abbildung 4.8: Verlauf der absoluten Anzahl der Spenderzellen im peripheren Blut der Empfänger

4.3 Verteilung der Zellpopulationen im peripheren Blut

Ein weiterer Parameter der hämatopoetischen Rekonstruktion ist die Verteilung der verschiedenen Zellpopulationen, der T- Zellen, B-Zellen, NK-Zellen, Granulozyten und Makrophagen. Um diese Verteilung näher zu betrachten, wurden Proben des peripheren Blutes mit Hilfe von fluoreszenz-konjugierten Antikörpern, die sich spezifisch gegen Antigene dieser Zellpopulationen richten, durchflusszytometrisch untersucht.

Als Referenzwerte für eine normale Verteilung der Zellpopulationen wurden Färbungen an unbehandelten C57BL/6 (n=8) und C3H Mäusen (n=8) durchgeführt. Es zeigte sich, dass die Verteilung der Zellpopulationen in den beiden Mausstämmen nicht gleich ist.

So zeigten C57BL/6 Mäuse mit $34,8 \pm 5,7\%$ statistisch signifikant mehr B220⁺ Zellen (B- Zell Marker) als C3H Mäuse mit $18,7 \pm 3,1\%$ ($p < 0,03$). Dafür waren in C57BL/6 Mäusen mit $11,9 \pm 2,4\%$ signifikant weniger GR-1⁺ Zellen (myeloiden Marker) als in C3H Mäusen mit $34,8 \pm 7,9\%$ ($p < 0,02$) nachzuweisen.

Der Hinweis, dass die Population von myeloiden Zellen in C57BL/6 Mäusen kleiner ist als in C3H Mäusen wird bestärkt durch die Beobachtung, dass ein ähnlicher

Unterschied in der Population für Mac-1⁺ Zellen gefunden wurde. So betrug die Mac-1⁺ Population in C57BL/6 Mäusen nur $16,1 \pm 2,8\%$, die in C3H Mäusen hingegen $38,0 \pm 7,9\%$ ($p < 0,008$). In Bezug auf die T- Zell Marker CD3, CD4, CD8, $\alpha\beta$ -TCR und $\gamma\delta$ - TCR sowie für DX-5 (Marker für natürliche Killerzellen) ließen sich keine signifikanten Unterschiede nachweisen (vgl. Abbildung 4.9).

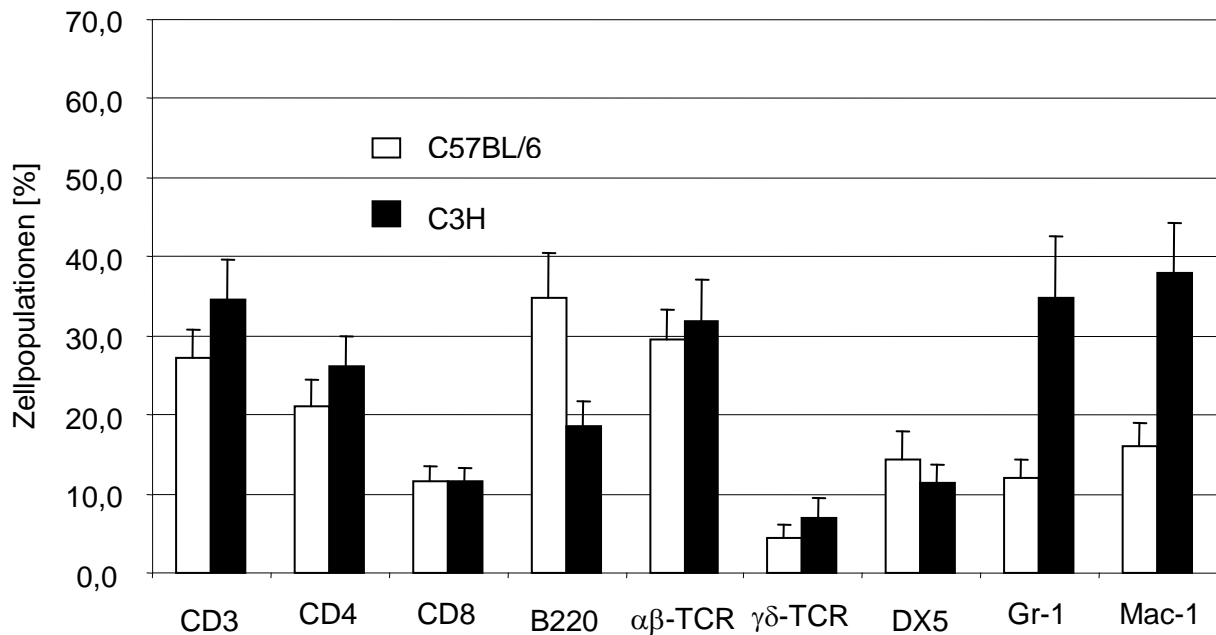


Abbildung 4.9: Durchflusszytometrische Analyse des prozentualen Anteils einzelner Zellpopulationen im peripherem Blut von unbehandelten C57BL/6 und C3H Mäusen

Da die Zahlen der Gesamtleukozyten im Blut von unbehandelten C57BL/6 und C3H Mäusen sehr ähnlich ist, ergaben sich auch bei der Berechnung der absoluten Zahlen der Zellen von einzelnen Populationen keine neuen Aspekte. Auch hier zeigte sich, dass C57BL/6 Mäuse statistisch signifikant mehr Zellen, die positiv für den B- Zellmarker B220 sind, aufwiesen als C3H Mäuse (2279 ± 375 Zellen/ nl in C57BL/6 Tieren, 1142 ± 419 Zellen/ nl in C3H, $p < 0,02$). Hingegen waren in C57BL/6 Tieren signifikant weniger Zellen nachweisbar, die positiv für die myeloiden Marker Gr-1 (782 ± 160 Zellen/ nl in C57BL/6, 2129 ± 485 Zellen/ nl, $p < 0,02$) und Mac-1 (1057 ± 183 Zellen/ nl in C57BL/6 Mäusen, 2326 ± 391 Zellen/ nl in C3H Mäusen, $p < 0,02$) waren. Auch in absoluten Zahlen ließen sich bei den T-Zellmarkern CD3, CD4, CD8, $\alpha\beta$ -

TCR und $\gamma\delta$ -TCR sowie bei dem NK-Zellmarker DX5 keine statistisch signifikanten Unterschiede in den Populationen nachweisen (vgl. Abbildung 4.10).

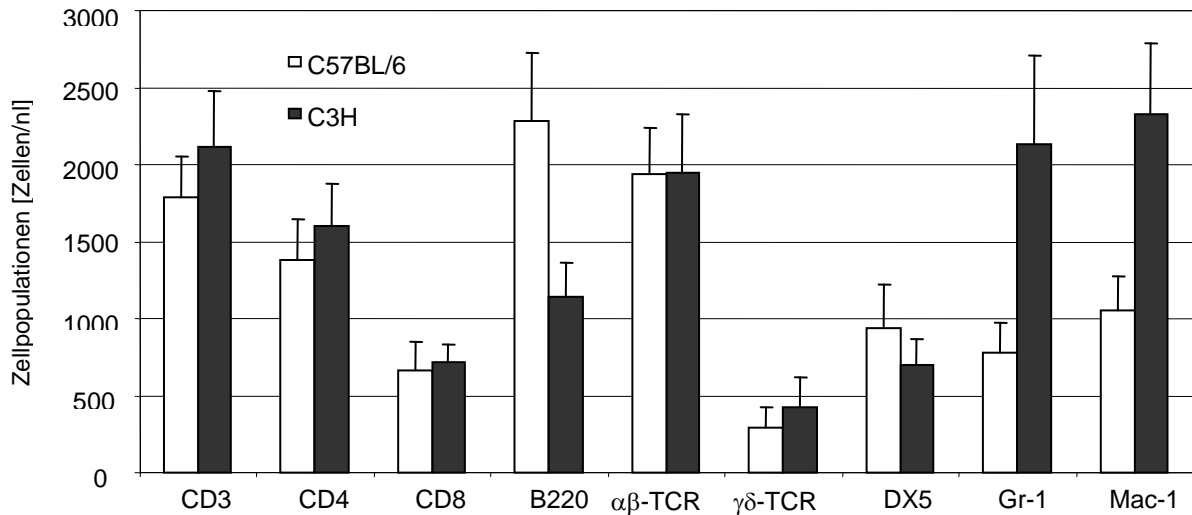


Abbildung 4.10: Absolute Zahlen einzelner Zellpopulationen im peripherem Blut von unbehandelten C57BL/6 und C3H Mäusen

Die Verteilung der Zellpopulationen wurde nun 16 Wochen nach der Knochenmarktransplantation betrachtet. Zunächst wurden die thymektomierten Tiere mit den nicht-thymektomierten Kontrollen verglichen.

Zuerst fiel auf, dass die thymektomierten Tiere deutlich weniger Zellen aufwiesen, die positiv für den Pan-T-Zellmarker CD3 waren ($35,0 \pm 2,4\%$ Kontrollen vs. $12,8 \pm 1,1\%$ Thymektomierte, $p < 0,0001$; bzw. 2434 ± 193 Zellen/ nl Kontrollen vs. $700 \pm$ Zellen/ nl Thymektomierte, $p < 0,0001$). Betrachtete man die einzelnen Subpopulationen der T-Zellen, so fand man diesen Unterschied sowohl bei $CD4^+$ Zellen ($25,5 \pm 2,2\%$ Kontrollen, vs. $8,2 \pm 0,9\%$ Thymektomierte, $p < 0,0001$; bzw. 1779 ± 169 Zellen/ nl Kontrollen vs. 446 ± 64 Zellen/ nl Thymektomierte, $p < 0,0001$) als auch bei den $CD8^+$ ($10,3 \pm 1,0\%$ Kontrollen vs. $6,2 \pm 0,7\%$ Thymektomierte, $p < 0,002$; bzw. 709 ± 70 Zellen/ nl Kontrollen vs. 340 ± 50 Zellen/ nl Thymektomierte, $p < 0,0001$). Der Unterschied betraf besonders Zellen, die $\alpha\beta$ -TCR⁺ waren ($32,1 \pm 4,0\%$ Kontrollen vs. $15,8 \pm 1,5\%$ Thymektomierte, $p < 0,0003$; bzw. 2231 ± 289 Zellen/nl Kontrollen vs. 876 ± 110 Zellen/ nl Thymektomierte, $p < 0,0001$), während kein statistisch signifikanter Unterschied in den Populationen der $\gamma\delta$ -TCT⁺ Zellen zu finden war ($5,4 \pm 0,8\%$

Kontrollen vs. $5,2 \pm 1,3\%$ Thymektomierte, $p < 1,0$; bzw. 381 ± 54 Zellen/ nl Kontrollen vs. 280 ± 65 Zellen/ nl Thymektomierte, $p < 0,3$). Bei den B-Zellen bestand, gemessen an den Zellen, die B220⁺ waren, in der prozentualen Auswertung ein tendenzieller Unterschied zu höheren Zellzahlen bei den thymektomierten Tieren, dieser Unterschied erreichte allerdings keine statistische Signifikanz ($34,9 \pm 2,9\%$ Kontrollen vs. $44,1 \pm 3,9\%$ Thymektomierte, $p < 0,08$) und betrachtete man die absoluten Zellenzahlen, so war er nicht mehr nachweisbar (2435 ± 234 Zellen/ nl Kontrollen vs. 2431 ± 320 Zellen/ nl Thymektomierte, $p < 1,0$). Die NK-Zellen (Pan-NK-Zellmarker DX5) wiesen keine Unterschiede zwischen Kontrollen und thymektomierten Tieren auf ($18,1 \pm 2,8\%$ Kontrollen vs. $21,4 \pm 2,0\%$ Thymektomierte, $p < 0,4$; bzw. 1288 ± 221 Zellen/ nl Kontrollen vs. 1194 ± 164 Zellen/ nl Thymektomierte, $p < 0,8$).

Auch in Bezug auf die Anzahl der Zellen, die myeloiden Marker exprimieren, zeigten sich keine Unterschiede. Die Werte betragen für GR-1, einen Marker der myeloiden Differenzierung, $23,8 \pm 3,2\%$ bei den Kontrollen und $28,5 \pm 3,6\%$ bei den thymektomierten Tieren, $p < 0,4$; bzw. 1699 ± 254 Zellen/ nl bei den Kontrollen und 1429 ± 168 Zellen/ nl bei den thymektomierten ($p < 0,4$). Dieses Ergebnis bestätigt sich in den Analysen der Zellzahlen für die Expression von Mac-1, einem weiteren myeloiden Marker ($28,0 \pm 3,2\%$ Kontrollen vs. $33,7 \pm 3,1\%$ Thymektomierte, $p < 0,3$; bzw. 1978 ± 255 Zellen/nl Kontrollen vs. $1710 \pm$ Zellen/nl Thymektomierte, $p < 0,4$) (vgl. Abbildung 4.11 und 4.12).

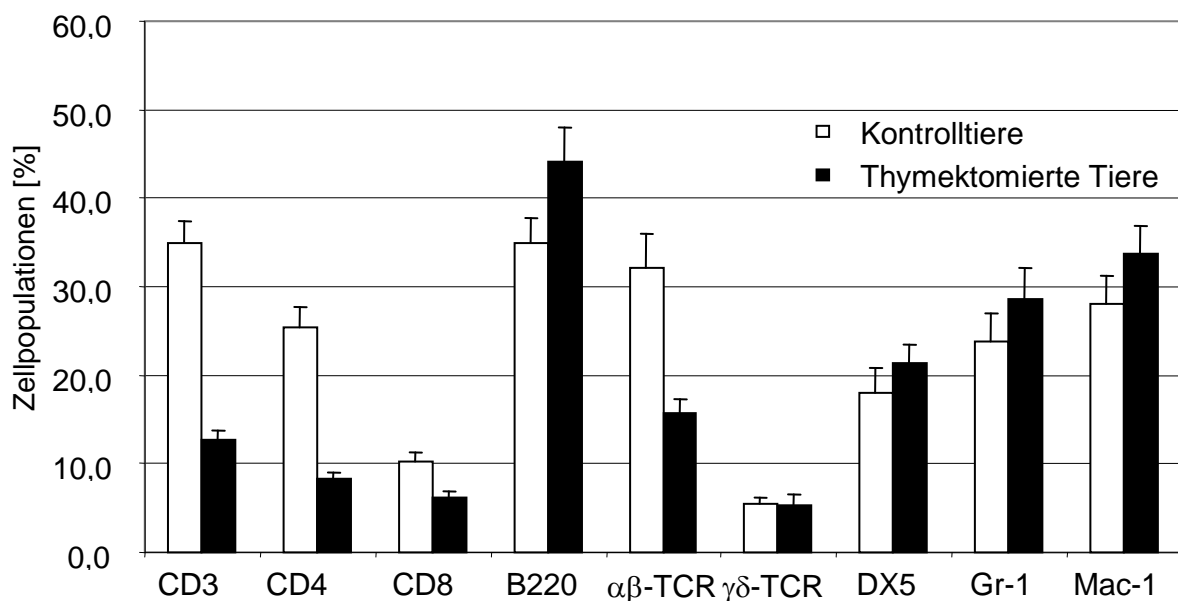


Abbildung 4.11: Verteilung der prozentual dargestellten Zellpopulationen 16 Wochen nach Knochenmarkstransplantation

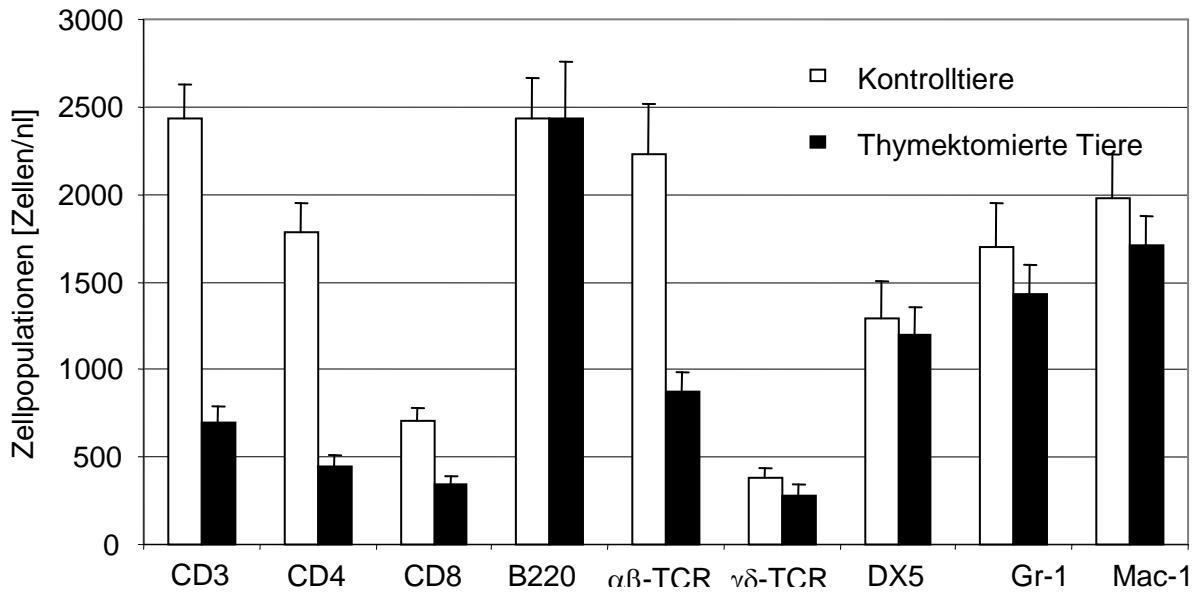


Abbildung 4.12: Zellpopulationsverteilung in absoluten Zahlen 16 Wochen nach Knochenmarktransplantation

4.4 Verlauf der Hauttransplantationen

Um die Induktion spender-spezifischer Toleranz mittels Knochenmarktransplantation in Abhängigkeit vom Thymus zu überprüfen wurde bei den Tieren 4 Wochen nach der Knochenmarktransplantation eine Hauttransplantation durchgeführt.

Jedes Tier erhielt drei Transplantate: ein syngenes (C57BL/6 Spender), eine spender-spezifisches (C3H Spender) und eines von einem allogenen Drittstamm-spender (Balb/c Spender).

Die syngenen Transplantate wurden verwendet, um die erfolgreiche Technik der Mäusehauttransplantation zu dokumentieren. In einem Beobachtungszeitraum von mehr als 120 Tagen konnte keine Abstoßung von syngenen Transplantaten beobachtet werden. Die Drittstammtransplantate (Balb/c) wurden bei den Kontrolltieren, sowohl in den chimären Tieren als auch in den nicht-chimären Tieren, abgestoßen. Die durchschnittliche Zeit bis zur Abstoßung war in chimären Kontrolltieren im Trend mit $20,0 \pm 1,8$ Tagen länger als in nicht-chimären Kontrolltieren mit $16,3 \pm 1,0$ Tagen. Dieser Trend erreichte allerdings keine statistische Signifikanz ($p < 0,09$). Bei der Transplantation von spender-spezifischer Haut wurde die Haut in Kontrolltieren mit Chimärismus in der Regel auf unbestimmte Zeit ohne Zeichen der Abstoßung akzeptiert (ein Tier mit Abstoßung am Tag 23, ein

Tier am Tag 34, 6 Tiere keine Abstoßung bei Beobachtung über 120 Tage). Hingegen wurden die Transplantate von Tieren, bei denen das Knochenmark nicht angewachsen war, durchschnittlich nach $15,2 \pm 0,9$ Tagen abgestoßen. Dieser Unterschied ist mit $p < 0,003$ statistisch signifikant.

Die Hauttransplantate bei den thymektomierten Tieren zeigten im Prinzip das gleiche Abstoßungsmuster. Auch hier wurden die Drittstammtransplantate sowohl von chimären, wie auch von nicht-chimären Tieren abgestoßen. Auch hier verlief die Abstoßung bei den chimären Tieren mit $32,1 \pm 2,9$ Tagen langsamer als in nicht-chimären Tieren mit $14,9 \pm 0,3$ Tagen. Im Gegensatz zu den Kontrolltieren erreichte dieser Unterschied in den thymektomierten Tieren mit $p < 0,0001$ statistische Signifikanz.

Die spender-spezifischen Transplantate wurden in chimären Tieren auf unbestimmte Zeit akzeptiert (ein Tier mit Abstoßung Tag 20, 4 Tiere ohne Abstoßung in mehr als 120 Tagen).

Nicht-chimäre Tiere stießen die Transplantate im Durchschnitt nach $13,3 \pm 0,2$ Tagen ab. Auch dieser Unterschied ist mit $p < 0,0001$ statistisch signifikant (vgl. Abbildung 4.14).



Abbildung 4.13: Fotografische Darstellung einiger Hauttransplantate nach Abschluss der Wundheilung und nach Induktion einer spender-spezifischen Toleranz

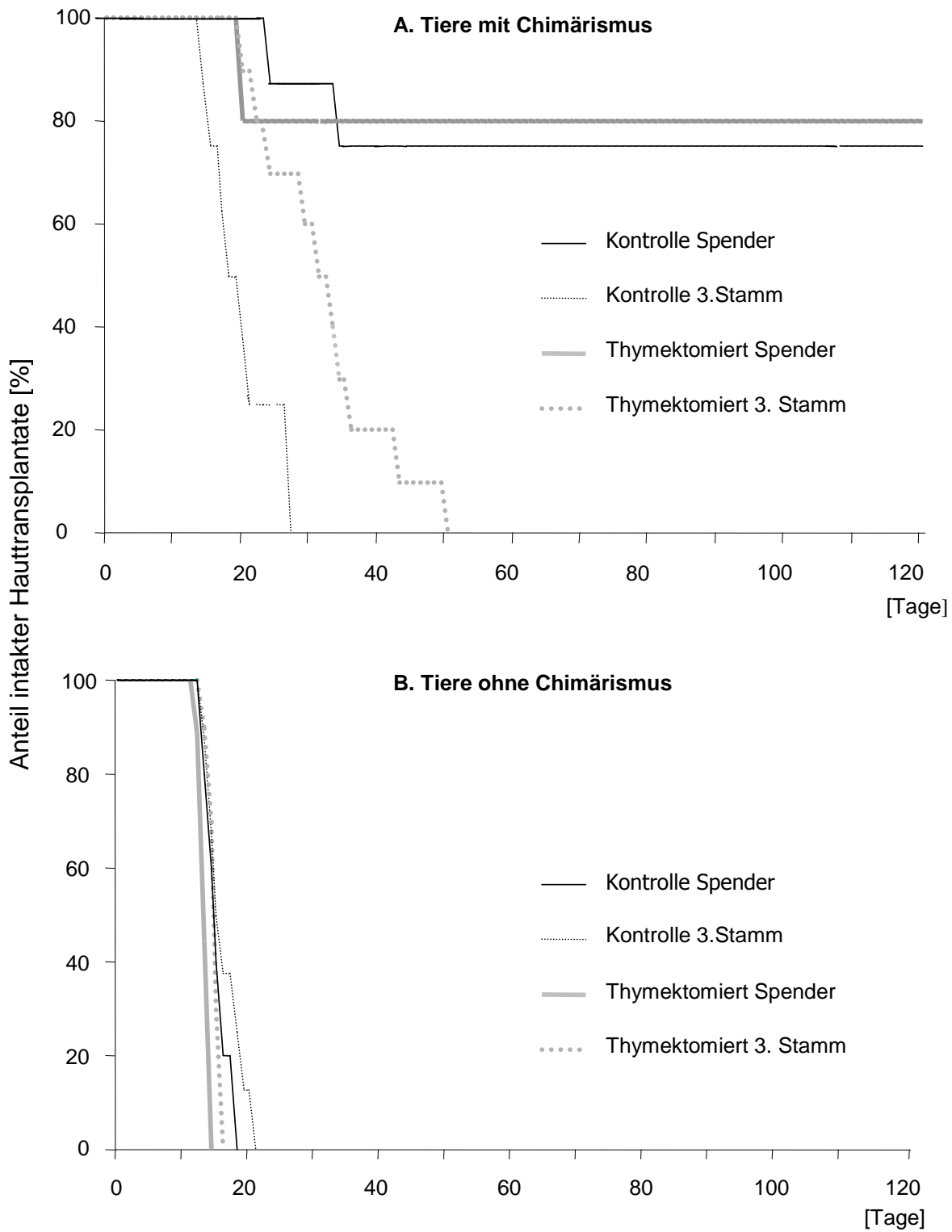


Abbildung 4.14: Verlauf der Hauttransplantation der unterschiedlichen Tiergruppen in Tagen

5. Diskussion

5.1 Der Einfluss der Thymektomie auf die hämatopoetische Rekonstitution

Zunächst fiel in den oben aufgezeigten Untersuchungen auf, dass es zwischen den thymektomierten Tieren und den nicht thymektomierten Kontrolltieren in der Anzahl der Leukozyten statistisch signifikante Unterschiede gab. Allerdings gab es auch einige Gemeinsamkeiten:

Sowohl thymektomierte Tiere, als auch die nicht-thymektomierten Kontrolltiere brauchten relativ lange Zeit, um im peripheren Blut Leukozytenzahlen zu erreichen, die mit denen unbehandelter C57BL/6 Empfänger bzw. C3H Spender vergleichbar waren. Bei beiden Gruppen waren sowohl in der Messung nach 4 und nach 8 Wochen die Leukozytenzahlen noch signifikant niedriger als in den unbehandelten Mäusen, und erst bei der Messung nach 16 bzw. 24 Wochen war das Ausgangsniveau erreicht oder sogar leicht überschritten. Allerdings wiesen alle Versuchsgruppen am Ende des Versuches (24 Wochen nach Transplantation) Leukozytenzahlen auf, die auf eine quantitativ ausreichende Rekonstitution des Immunsystems schließen ließen.

Dies spricht dafür, dass zumindest einige Aufgaben, die unter normalen Bedingungen durch den Thymus erfüllt werden, bei der hämatopoetischen Rekonstitution in Abwesenheit des Thymus durch andere Mechanismen kompensiert werden können und es so trotz fehlendem Thymus zu einer quantitativ suffizienten Wiederherstellung der Immunabwehr kommen kann.

Eine weitere Beobachtung, die diese These stützte, war die Tatsache, dass das transplantierte Knochenmark in den thymektomierten Mäusen anwuchs. Das Anwachsen des Knochenmarkes war zwar in der Tendenz in den thymektomierten Versuchstieren etwas schlechter, dieser Trend erreichte aber keine statistische Signifikanz. Diese Beobachtung zeigte sich sowohl bei der Betrachtung der Rate an Empfängermäusen, bei denen das Knochenmark generell anging (57% in Kontrolltieren vs. 32% in thymektomierten Mäusen, $p < 0,2$), als auch bei der Betrachtung des Anteils der Spenderzellen im Blut der Mäuse, bei denen das transplantierte Knochenmark angewachsen war. Bei dem prozentualen Anteil der

Spenderzellen zeigte sich der größte Unterschied mit $23,9 \pm 5\%$ in thymektomierten Tieren und $37,4 \pm 5,0\%$ in Kontrolltieren nach 16 Wochen ($p < 0,08$). Aber auch dieser statistisch nicht signifikante Unterschied war 24 Wochen nach Transplantation nicht mehr nachweisbar.

Auch das wies also darauf hin, dass es Mechanismen geben muss, die die Aufgaben des Thymus in dessen Abwesenheit kompensieren können.

Im Ergebnis lässt sich also sagen, dass die Versuchsergebnisse dafür sprechen, dass die quantitative hämatologische Rekonstitution der Mäuse nach Konditionierung und Knochenmarktransplantation auch in Abwesenheit eines funktionstüchtigen Thymus gegeben ist.

Dies geht mit der Tatsache einher, dass es auch im erwachsenen Menschen mit einem Thymus nach Involution möglich ist eine erfolgreiche Knochenmarktransplantation durchzuführen.

Betrachtet man allerdings die Qualität der Rekonstitution, so zeigt sich doch ein markanter Unterschied zwischen den beiden Versuchsgruppen:

Thymektomierte Tiere wiesen signifikant weniger T-Zellen auf als nicht-thymektomierte Kontrollen.

Es handelt sich bei den T-Zellen um diejenigen Zellen, die im Rahmen ihrer Entstehung auf den Thymus angewiesen sind. Der gängige Weg der T-Zell Entwicklung ist die Einwanderung von T-Zell Vorläuferzellen in den Thymus nach deren Entwicklung im Knochenmark. Dort finden sie sich zunächst als sogenannte doppelt-negative Zellen, da sie in diesem Stadium weder CD4 noch CD8 als T-Zell-Marker exprimieren (Rolink 2006). Im weiteren Verlauf wird zunächst CD4 und CD8 hochreguliert, so dass die Zellen nun ein doppelt-positives Stadium durchlaufen, bevor sie einen der beiden CD-Marker verlieren und als einfach positive Zellen in der Peripherie erscheinen (Laky 2006). Parallel dazu entwickelt sich bei den Zellen auch die Expression des T-Zell-Rezeptors, entweder in seiner $\alpha\beta$ -Struktur, oder alternativ in der $\gamma\delta$ -Struktur (Joachims 2006). Um diese Entwicklung zur reifen T-Zelle zu durchlaufen, unterliegen die T-Zellen dabei zwei selektionierenden Prozessen. Zunächst kommt die positive Selektion zum Tragen, bei der nur die Zellen für eine weitere Entwicklung ausgewählt werden, die das körpereigene MHC erkennen. Alle anderen Zellklone unterliegen einem programmierten Zelltod (Nedjic

2008). Anschließend kommt es zu einer negativen Selektion. Im Rahmen dieses Prozesses werden Zellen, die gegen körpereigene Antigene reagieren in die Apoptose getrieben (Chen 2004).

Diese für die Entwicklung der T-Zellen wesentlichen Schritte finden klassischer Weise im Thymus statt. In diesem Licht scheint es nur logisch, dass thymektomierte Tiere deutlich weniger T-Zellen aufweisen, als nicht-thymektomierte Kontrolltiere.

Auf der anderen Seite stellt sich allerdings die Frage, weshalb die thymektomierten Tiere überhaupt T-Zellen aufweisen. Hierfür gibt es verschiedene Erklärungsmöglichkeiten:

Zum einen werden durch die Konditionierungsbehandlung die Zellen im peripheren Blut der Tiere zwar drastisch reduziert, aber nicht alle werden komplett eliminiert, da es sich um ein partielles Konditionierungsverfahren handelt. Es könnte sich bei den vorhandenen T-Zellen also um Zellen handeln, die die Konditionierungsbehandlung überstanden haben und nun einer Expansion unterliegen. Zum anderen finden sich für T-Zellen Entwicklungswege außerhalb des Thymus, insbesondere in den Peyer Plaques des Darmes (Blais 2006; Guy-Grand 1978) sowie Hinweise bezüglich der Entwicklung von CD 8 exprimierenden Zellen innerhalb des Darmepithels (Ishikawa 2007).

5.2 Mögliche Mechanismen der Toleranzentwicklung durch hämatopoetischen Chimärismus

5.2.1 Induktion von Toleranz durch Deletion alloreaktiver Zellklone im Thymus

Obwohl die Mechanismen der Induktion spender-spezifischer Transplantationstoleranz durch gemischten hämatopoetischen Chimärismus bislang nicht bis ins Einzelne geklärt sind, so ist doch die gängigste Hypothese, dass diesem Phänomen eine zentrale Toleranz, also die Deletion alloreaktiver Zellen im Thymus zugrunde liegt (Tomita 1994; Manilay 1998; Eto et al.1999). Es spricht einiges dafür, dass dieser Mechanismus in Experimenten mit meist jungen Versuchstieren, welche über einen intakten Thymus verfügen, eine wesentliche Rolle spielt. Insbesondere die Gruppe um M. Sykes betonte lange die Bedeutung der zentralen Toleranz durch Deletion alloreaktiver Zellen im Thymus als führenden Mechanismus der

Toleranzinduktion durch gemischten hämatopoetischen Chimärismus. So konnten sie 1994 zeigen, dass das Repertoire der variablen β -Kette des T-Zell Rezeptors, das sogenannte $V\beta$ -Repertoire, in gemischten hämatopoetischen Chimären den Eigenschaften des Spenders angepasst wird. So wird in C57BL/10 Mäusen üblicher Weise das $V\beta 11$ nicht deletiert, da diese Mäuse das Superantigen, das zu dieser Deletion führt nicht exprimieren. Mäuse des Typus B10.A hingegen exprimieren das entsprechende Superantigen und so lässt sich nachweisen, dass bei C57BL/10 Mäusen mit Chimärismus für B10.A Knochenmark das $V\beta 11$ deletiert wird (Tomita 1994). Da Superantigene allerdings unter Umständen anders reagieren als klassische Transplantationsantigene, führte die Gruppe um Sykes später ähnliche Versuche mit transgenen Mäusen durch. Sie verwendeten 2C Mäuse mit den Haupthistokompatibilitätsantigenen b (H2b) und einem transgenen T-Zellrezeptor, der das Histokompatibilitätsantigen I-LD erkennt. Nach Induktion von einem gemischten Chimärismus mit Spendertieren, die I-LD als Antigen exprimieren, wurden die Zellen, die gegen I-LD gerichtet waren deletiert (Manilay 1998). Eine andere Gruppe zeigte ein Jahr später, dass auch bei intraperitonealer Injektion von Splenozyten des Mausstammes AKR in nicht konditionierte neonatale Mäuse des Stammes C57BL/6, bei Entwicklung eines Chimärismus, die auf Spenderantigene reaktiven $V\beta$ -Klone zunächst deletiert werden. Dieses führte an Tag 35 nach der Splenozytengabe zu einer fehlenden Reaktion in der gemischten Lymphozytenkultur (MLC). Allerdings hatte sich an Tag 84 nach Splenozytengabe die Reaktion in der gemischten Lymphozytenkultur erholt und auch Hauttransplantate von AKR-Mäusen, die 35 Tage nach Splenozytengabe leicht verlängert waren, wurden nun abgestoßen (Eto et al.1999).

Allerdings zeigen alle diese Experimente nur, dass in Gegenwart eines Chimärismus Deletion über den Thymus stattfindet und dass bei Verschwinden des Chimärismus die Deletion nicht mehr nachgewiesen werden kann. Ob es aber bei vorhandenem Chimärismus und mangelnder Deletion im Thymus (z.B. in erwachsenen Individuen mit einem Thymus nach Involution) ggf. über weitere Mechanismen immer noch zur Entwicklung einer Toleranz kommen kann, ist durch diese Experimente nicht geklärt. Die Tiere unserer Versuchsgruppe waren vollständig thymektomiert. Nur Tiere, bei denen die Extraktion des Thymus in einem Stück mit intakter Kapsel gelang, wurden in die Versuche eingeschlossen. Nach Abschluss der Versuche wurden histologische Schnitte von der Thymusregion entnommen, einer Hämatoxylin-Eosin Färbung

unterzogen und von einem Pathologen auf komplette Abwesenheit eines Thymus überprüft. Bei keinem der Tiere wurde ein Thymusrest nachgewiesen. Die T-Zell Zahlen in den thymektomierten Tieren waren stark verändert. Alle diese Tatsachen zusammen lassen uns annehmen, dass die Tiere über keinen funktionstüchtigen Thymus verfügten. Dennoch zeigte sich eine spender-spezifische Toleranz.

Neben der zentralen Toleranz, die im Thymus induziert wird, gibt es noch zahlreiche Mechanismen einer peripheren Toleranz. Die Ergebnisse stützten also die Hypothese, dass auch diese Mechanismen in Abwesenheit des Thymus ausreichen, um eine spender-spezifische Transplantationstoleranz zu induzieren. In der Folge werden einige Mechanismen aufgezeigt, die zu einer solchen Toleranz führen könnten.

5.2.2 Induktion von Toleranz durch extrathymale Deletion alloreaktiver Zellklone

Eine Deletion von alloreaktiven Zellen muss nicht zwingend im Thymus erfolgen. So fand gerade die Gruppe um Sykes, die peripheren Mechanismen der Toleranzinduktion im Rahmen eines hämatopoetischen Chimärismus eigentlich sehr kritisch gegenübersteht, dass in einem ihrer Modelle der Induktion von Chimärismus, nämlich dem Modell der Konditionierung mittels co-stimulatorischer Blockade, durchaus eine extrathymale Deletion alloreaktiver Zellklone stattfindet (Wekerle 1998). Die Autoren leiteten dies daraus ab, dass das V β - Repertoire bereits eine Woche nach Knochenmarktransplantation beginnt, sich zu verändern. Dies spricht insofern gegen eine komplett zentrale Deletion, da diese Zeit vermutlich nicht ausreicht, um genügend neue T-Zellen zu produzieren, die die vorhandenen reifen T-Zellen so stark verdünnen, dass dieser Effekt beobachtet werden könnte. So kommt es zu der Hypothese, dass die reifen T-Zellen auch extrathymal entsprechend deletiert werden. Darüber hinaus findet die Arbeitsgruppe eine Veränderung des V β -Repertoires in thymektomierten Tieren, was die These der extrathymalen Deletion weiter stärkt (Wekerle 1998). Auf welche Weise die Zellen in der Peripherie deletiert werden, ist allerdings nicht geklärt. Eine der Möglichkeiten wäre der sogenannte „activation induced cell death“ kurz AICD über eine Interaktion der Moleküle Fas und Fas-Ligand. Dieses scheint allerdings zumindest für das Modell der co-

stimulatorischen Blockade und Knochenmarktransplantation nicht der Fall zu sein (Kurtz 2003).

5.2.3 Induktion von Toleranz durch regulatorische Zellen

Auch andere Arbeitsgruppen erarbeiteten Hinweise darauf, dass andere Mechanismen als eine zentrale Toleranz bei einer Toleranzinduktion durch Knochenmarktransplantation bei der Toleranzinduktion durch gemischten hämatopoetischen Chimärismus entstehen können. So zeigte die Arbeitsgruppe um H. Waldmann schon 1989, dass bei einer Knochenmarkübertragung über Differenzen in minoren Histokompatibilitätsantigenen hinweg, unter Schutz von Anti-CD4 und Anti- CD8 Antikörpern, zumindest ein partieller hämatopoetischer Chimärismus erzeugt werden kann (Qin 1989). Dieser Chimärismus führte zu einem Ausbleiben der Reaktivität in der gemischten Lymphozytenkultur sowie zu einer dauerhaften Akzeptanz von spender-spezifischen Hauttransplantaten ohne die Deletion der entsprechenden V β -Klone. Das heißt, in diesem Modell fand keine zentrale Deletion statt, und die Autoren postulierten den Effekt einer klonalen Anergie (Qin 1989). Dieselbe Gruppe untersuchte dieses Phänomen später noch einmal eingehend und stellte fest, dass sie in ihrem Modell der Knochenmarktransplantation in Anhängigkeit von der Dosis sowohl eine zentrale Toleranz durch Deletion alloreaktiver Zellen im Thymus als auch eine Form der Toleranz ohne Deletion induzieren konnten (Bemermann 1998). Bei der Toleranz, die ohne Deletion, also durch periphere Mechanismen hervorgerufen wurde, konnten weitere ansonsten unmanipulierte Tiere des identischen Empfängerstammes für die selben Spenderantigene tolerogenisiert werden, indem Milzzellen vom toleranten Tier auf die unmanipulierten Tiere übertragen wurden (Bemermann 1998). Dieses Phänomen nennt sich „infektiöse Toleranz“ und ist von der Präsenz tolerogener CD4⁺ Zellen abhängig (Bemermann 1998). Nun existieren viele verschiedene Typen von regulatorischen Zellen. Bei dieser Population tolerogener CD4⁺ Zellen handelt es sich aber am ehesten um die sehr gut charakterisierten CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺ regulatorischen Zellen (Waldmann 2006), deren tolerogene Wirkung im Bereich der Transplantation bekannt ist (Kingsley 2002) und hier eine Abstoßung supprimieren sowie eine Toleranz in der Transplantation eines Allografts vermitteln (Xia 2009).

5.2.4 Anergie bei der Induktion von Toleranz durch hämatopoetischen Chimärismus

Eine weitere Untersuchung zu den Mechanismen der Toleranzentwicklung im Rahmen des hämatopoetischen Chimärismus stammt von Bigenzahn und Mitarbeitern (Bigenzahn 2005). Anlass zu den Untersuchungen gab die Tatsache, dass bei den hämatopoetischen Chimären, die mit dem in Kapitel 5.2.2. beschriebenen Modell der co-stimulatorischen Blockade induziert wurden, eine Toleranz für Hauttransplantate bereits besteht, bevor die Deletion der alloreaktiven Zellklone komplett ist. Auffallend war, dass in diesem Modell die Toleranz weder durch frühe noch durch spätere Gabe von IL-2 durchbrochen werden konnte. Bei einer klassischen Anergie handelt es sich um potentiell alloreaktive Zellklone, die trotz vorliegendem Antigen nicht reagieren. Diese Nichtreagibilität kann normalerweise durch IL-2 aufgehoben werden. Die von Bigenzahn durchgeführten Versuche sprechen also gegen das Vorliegen einer klassischen Anergie (Bigenzahn 2005). Hinzuzufügen wäre noch, dass eine Depletion von CD25⁺ Zellen in den Tieren kurz nach der Knochenmarktransplantation in diesem Modell die Induktion von Toleranz verhinderte, während sie später nach erfolgter Toleranzinduktion hier keine Rolle mehr spielte. Auch konnte beobachtet werden, dass der Co-Transfer von naiven CD4⁺ Zellen vom Empfängertyp mit CD4⁺ Zellen von Chimären kurz nach Knochenmarktransplantation in SCID Mäuse zu einer „infektiösen Toleranz“ führt, während der Co-Transfer von naiven CD4⁺ Zellen mit CD4⁺ Zellen von Chimären in späteren Stadien nach Toleranzinduktion nicht mehr zu einer Toleranzinduktion in den SCID-Mäusen führt (Bigenzahn 2005). Dieses stützt die mögliche Rolle von regulatorischen Zellen, die wie in Kapitel 5.2.2. schon von der Gruppe um Waldmann beschrieben wird.

5.2.5 Induktion von Toleranz durch Ignoranz

Der Vollständigkeit halber soll hier noch ein weiterer Mechanismus peripherer Toleranzentwicklung betrachtet werden, nämlich die Ignoranz. Bei der Ignoranz sind im Organismus reagible alloreaktive Zellklone vorhanden. Diese reagieren allerdings auf die im Organismus vorhandenen Antigene nicht. Dieser Prozess ist z.B. für Inselzelltransplantate beschrieben, bei denen die antigenpräsentierenden Zellen

depletiert worden waren. Nach dem Transfer dieser Transplantate in SCID Mäuse und Co-Transplantation von T-Zellvorläufern, zeigte sich, dass in der Abwesenheit von co-stimulatorischen Signalen diese Zellen weder aktiviert noch tolerogenisiert wurden. Es lag „Ignoranz“ vor (Coulombe 1996). Über die Rolle der Ignoranz im Zusammenhang mit Toleranzinduktion durch gemischten hämatopoetischen Chimärismus konnten keine Untersuchungen gefunden werden.

5.3 Kritische Betrachtung zum Modell der chirurgischen Thymektomie in C57BL/6 Mäusen

Thymektomien in Mäusen gehörten viele Jahre zu einer Standardtechnik immunologischer Untersuchungen zur Rolle des Thymus. Alternativ können Untersuchungen in athymen Nacktmäusen durchgeführt werden. Der Nachteil an dem Modell der Nacktmäuse besteht darin, dass offenbar aufgrund redundanter Mechanismen, die Mäuse mit zunehmendem Alter thymuskompensierende Mechanismen entwickeln, die nicht der „normalen“ Situation entsprechen (Committee on Immunologically Compromised Rodents 1989). Für diese Studie wurde deshalb das Modell der chirurgischen Thymektomie der Mäuse gewählt. In der Phase nach Abschluss der Experimente, während der Analyse der Ergebnisse, wurde bekannt, dass auch chirurgische Thymektomien in Mäusen in ihrer Bedeutung für die Rolle des Thymus differenziert betrachtet werden müssen. So konnten Terszowski et al. zeigen, dass Balb/c Mäuse neben dem thorakalen Thymus, der über die angewandte Technik entfernt wird, hinaus noch einen zweiten, zumindest in Teilen funktionellen Thymusanteil im Nacken besitzen, der durch die chirurgische Entfernung des thorakalen Thymus nicht beeinträchtigt wird (Terszowski 2006). Die Frequenz eines solchen zervikalen Thymusanteils ist in verschiedenen Mausstämmen nach Angabe der Autoren unterschiedlich. Während in den oben erwähnten Balb/c Mäusen die Frequenz bei ca. 90% liegt, ist sie in den von uns zur Thymektomie verwendeten C57BL/6 Mäusen bei vergleichbaren Untersuchungen auf 50% von der Frequenz der Balb/c- Mäuse reduziert, läge demzufolge also unter 50% (Terszowski 2006).

Es konnten in insgesamt 23 Kontrolltieren und 25 thymektomierten Tieren statistisch signifikante Unterschiede in der hämatopoetischen Rekonstitution nachgewiesen werden, vor allem bei der Qualität. Insbesondere in den unterschiedlichen Populationen von T-Zellen zeigten sich deutliche Unterschiede zwischen den

Kontrolltieren und den thymektomierten Versuchstieren. Die thymektomierten Tiere wiesen statistisch signifikant weniger Zellen auf, die positiv für den Pan T-Zellmarker CD3 waren, als Kontrollen ($p < 0,0001$).

Obwohl es theoretisch möglich ist, so ist es doch sehr unwahrscheinlich, dass alle 4 von den 5 thymektomierten Tieren einen funktionierenden Thymusrest aufweisen sollten. Es ist nahezu ebenfalls auszuschließen, dass alle 25 thymektomierten Tiere, die mit Knochenmark transplantiert und für die hämatologischen Untersuchungen verwendet wurden, einen zervikalen Thymus aufweisen sollten.

Die in dieser Arbeit beschriebenen Experimente geben, trotz der Bedenken, die sich aus der Möglichkeit eines zervikalen Thymusrestes ergeben, wertvolle Hinweise auf die Biologie der Toleranzinduktion mittels hämatopoetischen Chimärismus.

6. Zusammenfassung

In der Arbeit sollte der Einfluss einer Thymektomie auf die hämatopoetische Rekonstitution des Immunsystems nach Knochenmarktransplantation sowie auf die Entwicklung einer spender-spezifischen Transplantationstoleranz durch gemischten hämatopoetischen Chimärismus untersucht werden.

Es konnte gezeigt werden, dass thymektomierte Tiere eine quantitativ vollwertige hämatologische Rekonstitution aufweisen, das heißt, die Gesamt-Leukozytenzahlen der Tiere, die durch die Konditionierung und Knochenmarktransplantation drastisch reduziert waren, erholten sich im erwarteten Zeitfenster. Auch die Rate des Anwachsens von transplantiertem Knochenmark war statistisch nicht signifikant anders als bei nicht-thymektomierten Kontrolltieren. In der qualitativen Rekonstitution fielen die thymektomierten Tiere allerdings durch einen Mangel an T-Zellen auf. Dieser Effekt weist auf die zentrale Rolle des Thymus bei der T-Zell-Entwicklung hin und demonstriert den Einfluss der erfolgten Thymektomie auf das Immunsystem der Versuchstiere.

Trotz Thymektomie wurde bei den Versuchstieren eine spender-spezifische Toleranz induziert. Dass es sich hierbei nicht einfach um eine generelle Immunschwäche bei T-Zell-Mangel handelt, wird dadurch klar, dass Dritt-Stamm-Transplantate, wenn auch verzögert, so doch aber zuverlässig abgestoßen wurden.

Die erfolgten Experimente stützen die These, dass in Abwesenheit des Thymus eine spender-spezifische Transplantationstoleranz durch periphere Mechanismen der Toleranzinduktion entstehen kann.

7. Literaturverzeichnis

Bemelman, F., Honey, K., Adams, E., Cobbold, S., Waldmann, H.:

Bone marrow transplantation induces either clonal deletion or infectious tolerance depending on the dose.

J. Immunol. 160, 2645- 2648 (1998)

Billingham, R.E.; Medawar, P.B.:

The technique of free skin grafting in mammals

J. Exp. Biol. 28, 385- 402 (1951)

Billingham, R.B., Lamphin, H.G., Medawar, P.B., Williams, H.L.:

Tolerance of homografts: twin diagnosis and the freemartin conditions in cattle.

Heredity 6, 201 (1952)

Billingham, R.B., Brent, L., Medawar, P.B.:

Actively acquired tolerance of foreign cells

J. Immunol. 184, 5- 8 (2010)

Blais, M.E., Louis, I., Perreault, C.:

T-cell development: an extrathymic perspective.

Immunol. Rev. 209, 103-114 (2006)

Chen, W.:

The late stage of T cell development within mouse thymus.

Cell. Mol. Immunol. 1, 3- 11 (2004)

Colson, Y.L., Li, H., Boggs, S.S., Patrene, K.D., Johnson, P.C., Ildstad, S.T.:

Durable mixed allogenic chimerism and tolerance by a nonlethal radiation-based cytoreductive approach.

J. Immunol. 157, 2820- 2829 (1996)

Coulombe, M., Gill, R.G.:

T lymphocyte indifference to extrathymic islet allografts.

J. Immunol. 156, 1998- 2003 (1996)

Eto, M., Kong, Y.Y., Uozumi, J., Naito, S., Nomoto, K.:

Importance of intrathymic mixed chimerism for the maintenance of skin allograft tolerance across fully allogenic antigens in mice.

Immunology 96, 440- 446 (1999)

Exner, B.G., Colson, Y.L., Li, H., Ildstad, S.T.:

In vivo depletion of host CD4+ and CD8+ cells permits engraftment of bone marrow stem cells and tolerance induction with minimal conditioning.

Surgery 122, 221-227 (1997)

Fudaba, Y., Spitzer, T.R., Shaffer, J., Kawai, T., Fehr, T., Delmonico, F., Preffer, F., Tolloff- Rubin, N., Dey, B.R., Saidman, S.L., Kraus, A., Bonnefoix, T., McAfee, S., Power, K., Kattleman, K., Colvin, R.B., Sachs, D.H., Cosimi, A.B., Sykes, M.:

Myeloma Responses and Tolerance Following Combined Kidney and Nonmyeloablative Marrow Transplantation: In Vivo and In Vitro Analyses

Am. J. Transplant. 6, 2121–2133 (2006)

Fuchimoto, Y., Huang, C.A., Yamada, K., Shimizu, A., Kitamura, H., Colvin, R.B., Ferrara, V., Murphy, M.C., Sykes, M., White- Scharf, M., Nevillem, D.M., Jr., Sachs, D.H.:

Mixed chimerism and tolerance without whole body irradiation in a large animal model.

J. Clin. Invest. 105, 1779-1789 (2000)

Hundrieser, J., Hisanaga, M., Böker, K., Raddatz, G., Brederlau, A., Nashan, B., Pichlmayr, R., Schlitt, H.J.:

Long-term chimerism in liver transplantation: no evidence for immunological relevance but requirement for graft persistence.

Transplant Proc. 27, 216- 218 (1995)

Ildstad, S.T., Sachs, D.H.:

Reconstitution with syngeneic plus allogeneic or xenogeneic bone marrow leads to specific acceptance of allografts or xenografts.

Nature 307, 168- 170 (1984)

Ildstad, S.T., Wren, S.M., Bluestone, J.A., Barbieri, S.A., Sachs, D.H.:

Characterization of mixed allogeneic chimeras. Immunocompetence, in vitro reactivity, and genetic specificity of tolerance.

J. Exp. Med. 162, 231- 244 (1985)

Ishikawa, H., Naito, T., Iwanaga, T., Takahashi- Iwanaga, H., Suematsu, M., Hibi, T., Nanno, M.:

Curriculum vitae of intestinal intraepithelial T cells: their developmental and behavioral characteristics.

Immunol. Rev. 215,154- 165 (2007)

Jacquet, E.G., Schanie, C.L., Fugier- Vivier, I., Willer, S.S., Ildstad, S.T.:

Facilitating cells as a venue to establish mixed chimerism and tolerance.

Pediatr. Transplant 7, 348- 357 (2003)

Joachims, M.L., Chain, J.L., Hooker, S.W., Knott- Craig, C.J., Thompson, L.F.:

Human alpha beta and gamma delta thymocyte development: TCR gene rearrangements, intracellular TCR beta expression, and gamma delta developmental potential- differences between men and mice.

J. Immunol. 176, 1543- 1552 (2006)

Kingsley, C.I., Karim, M., Bushell, A.R., Wood, K.J.:

CD25+ CD4+ regulatory T cells prevent graft rejection: CTLA-4- and IL-10-dependent immunoregulation of alloresponses.

J. Immunol. 168, 1080- 1086 (2002)

Knobler, H.Y., Sagher, U., Peled, I.J., Wexler, M.R., Steiner, D., Rubinstein, N., Weshler, Z., Or, R., Slavin, S.:

Tolerance to donor- type skin in the recipient of a bone marrow allograft. Treatment of skin ulcers in chronic graft-versus-host disease with skin grafts from the bone marrow donor.

Transplantation 40, 223-225 (1985)

Kurtz, J., Lie, A., Griffith, M., Eysaman, S., Shaffer, J., Anosova, N., Turka, L., Benichou, G., Sykes, M.:

Lack of role for CsA- sensitive or Fas pathways in the tolerization of CD4 T cells via BMT and anti-CD40L.

Am. J. Transplant. 3, 804- 816 (2003)

Laky, K., Fleischacker, C., Fowlkes, B.J.:

TCR and Notch signalling in CD4 and CD8 T- cell development.

Immunol. Rev. 209, 274- 283 (2006)

Manilay, J.O., Pearson, D.A., Sergio, J.J., Swenson, K.G., Sykes, M.:

Intrathymic deletion of alloreactive T cells in mixed bone marrow chimeras prepared with a nonmyeloablative conditioning regimen.

Transplantation 66, 96- 102 (1998)

McLaren, A.J., Fuggle, S.V., Welsh, K.I., Gray, D.W., Morris, P.J.:

Chronic allograft failure in human renal transplantation: a multivariate risk factor analysis.

Ann. Surg. 232, 98- 103 (2000)

Nagano, H., Tilney, N.L.:

Chronic allograft failure: the clinical problem.

Am. J. Med. Sci. 313, 305- 309 (1997)

Nashan, B., Lück, R., Kliem, V., Brunkhorst, R., Schlitt, H.J., Klempnauer, J.:

CMV in kidney transplantation: a single center experience over 22 years.

Clin. Transpl. 181- 188 (1999)

Nedjic, J., Aichinger, M., Klein, L.:

Autophagy and T- cell education in the thymus: eat yourself to know yourself.

Cell Cycle. 7, 3625- 3628 (2008)

Owen, R.D.:

Immunogenetic consequences of vascular anastomoses between bovine twins.

Science 102, 400- 401 (1945)

Penn, I.:

Occurrence of cancers in immunosuppressed organ transplant recipients.

Clin. Transpl. 147- 158 (1998)

Qin, S.X., Cobbold, S., Benjamin, R., Waldmann, H.:

Induction of classical transplantation tolerance in the adult.

J. Exp. Med. 169, 779- 794 (1989)

Rao, S.S., Peters, S.O., Crittenden, R.B., Stewart, F.M., Ramshaw, H.S.,
Quesenberry, P.J.:

Stem cell transplantation in the normal nonmyeloablated host: relationship between
cell dose, schedule, and engraftment.

Exp. Hematol. 25, 114- 121 (1997)

Riley, R.S., Idowu, M., Chesney, A., Zhao, S., McCarty, J., Lamb, L.S., Ben- Ezra,
J.M.:

Hematologic aspects of myeloablative therapy and bone marrow transplantation.

J. Clin. Lab. Anal. 19, 47- 79 (2005)

Rodicio, J.L.:

Calcium antagonists and renal protection from cyclosporine nephrotoxicity: long-term
trial in renal transplantation patients.

J. Cardiovasc. Pharmacol. 35, 7-11 (2000)

Rolink, A.G., Massa, S., Balciunaite, G., Ceredig, R.:
Early lymphocyte development in bone marrow and thymus.
Swiss Med. Wkly 137 Suppl 155:20- 24 (2007)

Rossini, A.A., Greiner Dale, L., Mordes, J.P.:
Induction of Immunologic Tolerance for Transplantation.
Physiol. Rev. 79, 99- 141 (1999)

Sayegh, M.H., Fine, N.A., Smith, J.L., Rennke, H.G., Milford, E.L., Tilney, N.L.:
Immunologic tolerance to renal allografts after bone marrow transplants from the
same donors.
Ann. Intern. Med. 114, 954- 955 (1991)

Schlitt, H.J., Hundrieser, J., Ringe, B., Pichlmayr, R.:
Donor-type microchimerism associated with graft rejection eight years after liver
transplantation.
N. Engl. J. Med. 330, 646- 647 (1994)

Schlitt, H.J., Hundrieser, J., Hisanaga, M., Uthoff, K., Karck, M., Wahlers, T.,
Wonigeit, K., Pichlmayr, R.:
Patterns of donor- type microchimerism after heart transplantation.
Lancet 343, 1469- 1471 (1994)

Slavin, S., Aker, M., Shapira, M.Y., Resnick, I., Bitan, M., Or, R.:
Reduced- intensity conditioning for the treatment of malignant and life- threatening
non- malignant disorders.
Clin. Transpl. 275- 282 (2003)

Spitzer, T.R., Delmonico, F., Tolkoff- Rubin, N., McAfee, S., Sackstein, R., Saidman,
S., Colby, C., Sykes, M., Sachs, D.H., Cosimi, A.B.:
Combined histocompatibility leukocyte antigen- matched donor bone marrow and
renal transplantation for multiple myeloma with end stage renal disease: the induction
of allograft tolerance through mixed lymphohematopoetic chimerism.
Transplantation 68, 480- 484 (1999)

Starzl, T.E., Demetris, A.J., Trucco, M., Ramos, H., Zeevi, A., Rudert, W.A., Kocova, M., Ricordi, C., Ildstad, S., Murase, N.:

Systemic chimerism in human female recipients of male livers.

Lancet 340, 876- 877 (1992)

Starzl, T.E., Demetris, A.J., Trucco, M., Zeevi, A., Ramos, H., Terasaki, P., Rudert, W.A., Kocova, M., Ricordi, C., Ildstad, S.:

Chimerism and donor- specific nonreactivity 27 to 29 years after kidney allotransplantation.

Transplantation 55, 1272- 1277 (1993)

Terszowski, G., Müller, S.M., Bleul, C.C., Blum, C., Schirmbeck, R., Reimann, J., Pasquier, L.D., Amagai, T., Boehm, T., Rodewald, H.R.:

Evidence for a functional second thymus in mice.

Science 312, 284-287 (2006)

Tomita, Y., Khan, A., Sykes, M.:

Role of intrathymic clonal deletion and peripheral anergy in transplantation tolerance induced by bone marrow transplantation in mice conditioned with a nonmyeloablative regimen.

J. Immunol. 153, 1087-1098 (1994)

Wekerle, T., Sayegh, M.H., Hill, J., Zhao, Y., Chandraker, A., Swenson, K.G., Zhao, G., Sykes, M.:

Extrathymic T cell deletion and allogeneic stem cell engraftment induced with costimulatory blockade is followed by central T cell tolerance.

J. Exp. Med. 187,2037- 2044 (1998)

Wekerle, T., Kurtz, J., Ito, H., Ronquillo, J.V., Dong, V., Zhao, G., Shaffer, J., Sayegh, M.H., Sykes, M.:

Allogeneic bone marrow transplantation with co-stimulatory blockade induces macrochimerism and tolerance without cytoreductive host treatment.

Nat. Med. 6, 464- 469 (2000)

Wood, M.L., Monaco, A.P., Gozzo, J.J., Liegeois, A.:

Use of homozygous allogeneic bone marrow for induction of tolerance with antilymphocyte serum: dose and timing.

Transpl. Proc. 3, 676- 679 (1971)

Xia, G., Shah, M., Luo, X.:

Prevention of allograft rejection by amplification of Foxp3(+)CD4(+)CD25(+) regulatory T cells

Transl. Res. 153, 60-70 (2009)

Yamazaki M, Pearson T, Brehm MA, Miller DM, Mangada JA, Markees TG, Shultz, L.D., Mordes, J.P., Rossini, A.A., Greiner, D.L.:

Different mechanisms control peripheral and central tolerance in hematopoietic chimeric mice.

Am. J. Transplant. 7, 1710- 1721 (2007)

8. Danksagung

An dieser Stelle möchte ich all jenen meinen herzlichen Dank aussprechen, die diese Arbeit möglich gemacht und mich darin unterstützt haben.

Herrn Prof. Dr. med. B. Kremer, ehemaliger Direktor der Klinik für Allgemeine Chirurgie und Thoraxchirurgie der Christian- Albrechts- Universität zu Kiel, danke ich für die Bereitstellung des Labors und die damit verbundene Möglichkeit zur Forschung.

Mein ganz besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. med. F. Fändrich, jetzt Leiter der Klinik für Angewandte Zelltherapie, damals Oberarzt für die Klinik Allgemeine Chirurgie und Thoraxchirurgie der Christian- Albrechts- Universität zu Kiel, für die Überlassung des Dissertationsthemas sowie für die Unterstützung bei der schriftlichen Ausarbeitung der Arbeit.

Jederzeit beiseite stand mir Frau Dr. med. B. Exner. Ihre konstruktiven Ideen und Vorschläge haben mich fortwährend motiviert und weiter gebracht. Über diese Arbeit hinaus hat sie mir einen Einblick in die Chirurgie verschafft und meine Begeisterung für dieses Fach geweckt. Ich konnte mich jederzeit auf ihre professionelle Hilfe verlassen. Vielen herzlichen Dank für die lehrreiche Zeit, jegliche Mühen und die freundliche sowie, auch über Grenzen hinweg, sehr engagierte und geduldige Zusammenarbeit!

Weiterhin danke ich Herrn Prof. Dr. med. Dietrich Kabelitz, Direktor des Instituts für Immunologie, für die Nutzung der Räumlichkeiten sowie der Laborarbeitsplätze. Im gleichen Zuge möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. med. Jörg Steinmann, damals Oberarzt des Instituts für Immunologie der Christian- Albrechts- Universität zu Kiel für die reichhaltige Unterstützung bei der Ausarbeitung der durchflusszytometrischen Untersuchungen der Versuchsreihen in diesem Labor, bedanken.

Ein ganz besonderer Dank gilt auch K. Brötzmann sowie I. Berg, MTAs in der Klinik für Allgemeine Chirurgie und Thoraxchirurgie des Campus Kiel, für die Hilfe bei der Durchführung der labortechnischen und operativen Vorgänge und Durchflusszytometrie sowie der Unterstützung bei der Pflege und Versorgung der Versuchstiere bedanken.

An letzter, aber für mich wichtigster Stelle, möchte ich mich abschließend bei meinen Eltern bedanken. Ohne sie wären Studium und diese Arbeit nicht möglich gewesen.

9. Lebenslauf

Name: Alexander Melzer
 Anschrift: Plessenstr. 20, 24837 Schleswig

Geburtsdatum: 28.10.1975
 Geburtsort: Oldenburg/ Oldenburg, Niedersachsen
 Familienstand: ledig

Eltern: Jürgen und Siren Melzer, geb. Rosenberg (Norwegen)
 Geschwister: Bruder Andreas Melzer

Schulbildung: 1982 – 1986 Grundschule: Am Heidenberger Teich in Kiel
 1986 – 1995 Gymnasium: Bildungszentrum Mettenhof Kiel
 1995 Allgemeine Hochschulreife (Abitur)

Ersatzdienst: 1995 – 1996 Zivildienst in der Lubinusklinik in Kiel

Studium: 10/ 1996 – 11/ 2003
 Studium der Humanmedizin an der Christian- Albrechts-
 Universität zu Kiel

03/ 1999 Ärztliche Vorprüfung (Physikum)
 03/ 2000 Erster Abschnitt ärztliche Prüfung
 08/ 2002 Zweiter Abschnitt ärztliche Prüfung
 11/ 2003 Dritter Abschnitt ärztliche Prüfung

10/ 2002 bis 10/ 2003 Praktisches Jahr in den
 Fachgebieten Chirurgie (Kreiskrankenhaus Eckernförde),
 Innere Medizin (Westküsten Klinikum Heide),
 Anästhesie (Diakonissenkrankenhaus Flensburg)

Berufserfahrung:

1998

Hilfswissenschaftliche Tätigkeit im Institut für
Anatomie CAU zu Kiel (Prof. Dr. med. Tillmann)

01/ 2004 bis 07/ 2010

Arzt im Praktikum sowie Assistenzarzt
imland Klinik Eckernförde/ Rendsburg

Klinik für Allgemein Chirurgie

Chefarzt Prof. Dr. med. H. H. Dittrich

Klinik für Unfallchirurgie

Chefarzt Dr. med. A. Friedrich

06/ 2006 Hospitation plastische Chirurgie

Universitätsklinikum Haukeland, Bergen (N)

11/ 2009 Facharzt für Chirurgie

09/ 2010 Approbation und Facharztanerkennung

Dänemark

09/ 2010 Approbation Norwegen

07/ 2010 bis 12/ 2012

Klinik für Gefäßchirurgie

Chefarzt Dr. med. I. Djibey

10/2012 Schwerpunktbezeichnung Gefäßchirurgie

Seit 01/ 2013

Oberarzt, Abteilung für Gefäßchirurgie

Klinik für Allgemein-, Thorax- und Gefäßchirurgie,

Helios Klinikum Schleswig,

Chefarzt PD Dr. med. H. Shekarriz

- Dissertation: Beginn der Dissertation im August 2001 in der Klinik für Allgemeinchirurgie der Christian Albrechts Universität zu Kiel (Prof. Dr. med. B. Kremer)
Abschluss über die Klinik für angewandte Zelltherapie (Prof. Dr. med. F. Fändrich)
- Titel: Der Einfluss einer Thymektomie auf die hämatopoetische Rekonstitution und die Effektivität der Induktion spender-spezifischer Transplantationstoleranz in einem Mausmodell der Knochenmarktransplantation
- Publikationen: Exner, B.G.; Melzer, A.; Fändrich, F. 2002
Hämatopoetischer Chimärismus zur Induktion spenderspezifischer Transplantationstoleranz
Transplantation Link 31- 39 (2002)
- Vorträge: Exner, B.G.; Melzer, A.; Brötzmann, K.;
Zehle, G.; Fändrich, F.
Die Induktion der spender-spezifischen Toleranz mittels gemischtem hämatopoetischen Chimärismus ist vom Thymus unabhängig
13. Workshop für experimentelle und klinische Lebertransplantation und Hepatologie, Wilsede, 20.06.02 – 22.06.02
- Poster: Exner, B.G.; Stüber, E.; Melzer, A.; Zavazava, N.;
Fändrich, F.
Keine Verlängerung der Überlebenszeit allogener Hauttransplantate durch in vivo Blockade von OX40 (CD134) im Mausmodell
10. Tagung der Deutschen Transplantationsgesellschaft, Heidelberg, 22.-24.11.2001

Exner, B.G.; Melzer, A.; Brötzmann, K.; Zehle, G.; Kremer, B.; Fändrich, F.

The Thymus is not needed to induce donor specific tolerance with mixed hematopoetic chimerism

19. International Congress of the Transplantation Society, Miami, Florida, USA, 25. – 30. 08. 2002