

Aus der Klinik für Angewandte Zelltherapie

(Geschäftsführender Vorstand: Professor Dr. med F. Fändrich) im
Universitätsklinikum Schleswig- Holstein, Campus Kiel an der
Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

**In Vivo Untersuchung von in Vitro modifizierten Transplantat-
Akzeptanz- induzierenden- Zellen (TAICs) im Rattenmodell**

zur Erlangung der Würde eines Doktors der Zahnheilkunde der
Medizinischen Fakultät
der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

vorgelegt von

PHILIP ALBRECHT STEHLING aus EUTIN

Kiel 2016

1. Berichterstatter: Prof. Dr. med. Fred Fändrich, Klinik für angewandte Zelltherapie

2. Berichterstatter: Prof.Dr. med. Dietrich Kabelitz, Institut für Immunologie

Tag der mündlichen Prüfung: 26.04.2017

Zum Druck genehmigt, Kiel, den 26.04.2017

gez.:

(Vorsitzender der Prüfungskommission)

<u>Inhaltsverzeichnis</u>	<u>Seite</u>
1. <u>Einleitung</u>	1
1.1. TAIC (Transplant acceptance inducing cells).....	2
1.2. Entstehung einer Abstoßungsreaktion (Immunbiologie der Transplantatabstoßung).....	2
1.2.1. Haupthistokompatibilitätskomplex (MHC).....	3
1.2.2. Die CD- Nomenklatur.....	3
1.2.3. Zell- vermittelte Effektormechanismen.....	4
1.2.3.1. T- Lymphozyten.....	4
1.2.3.2. Effektorzellen der unspezifischen Immunantwort.....	5
1.2.4. Die spezifische Immunantwort.....	7
1.3. Die Transplantat- gegen- Wirt Erkrankung (GvHD).....	8
1.3.1. Einteilung der GvHD.....	9
1.4. Das FoxP3 Protein.....	9
 2. <u>Fragestellung</u>	 10
 3. <u>Material und Methoden</u>	
3.1. Reagenzien, Medien und Pufferlösungen.....	11
3.2. Versuchstiere, Tierhaltung und Zusammensetzung der Tiergruppen	
3.2.1. Versuchstiere.....	12
3.2.2. Diät.....	13
3.2.3. Haltung.....	13
3.2.4. Umwelteinflüsse.....	13
3.3. Gruppierung und Dosierung.....	14
3.4. Produktion der TAIC.....	14
3.5. Adhärente Zellen.....	15
3.6. Transplantation.....	16
3.7. Klinische Verlaufskontrolle.....	17
3.8. Evauation der Herzfunktion.....	17
3.9. Histologische Aufbereitung des Gewebes.....	17

3.9.1.	APAAP- Färbung (<u>A</u> lkalische <u>P</u> hosphatase <u>a</u> nti- <u>A</u> lkalische <u>P</u> hosphatase Färbung).....	18
3.9.2.	Die Van Gieson Färbung.....	19
3.10.	Statistik.....	19
4.	<u>Ergebnisse</u>	
4.1.	Allgemeine Konditionen.....	20
4.2.	Überlebenszeiten.....	20
4.3.	Histopathologische Untersuchungen.....	22
4.4.	Funktionalität des Transplantats.....	24
4.5.	Entwicklung des Körpergewichts.....	24
4.6.	Akzeptanz des Transplantats nach dem Durchlaufen von Abstoßungskrisen.....	25
4.7.	Expression von FoxP3 in peripheren Blut-Lymphozyten.....	26
5.	<u>Diskussion</u>	27
5.1.	Das Konzept der <i>infectious tolerance</i>	27
5.6.	Das Vorkommen von FoxP3 als Toleranzmarker.....	28
5.2.	Passenger Leukozyten.....	28
5.3.	Transplantatakzeptanz ist ein aktiver Prozess.....	29
5.4.	Einfluss der TAIC auf den Ablauf einer Abstoßungsreaktion.....	29
5.5.	Die Abhängigkeit vom Serum zur Herstellung der Zellkultur.....	30
6.	<u>Zusammenfassung</u>	31
7.	<u>Literaturverzeichnis</u>	33
8.	<u>Glossar verwendeter Begriffe und Abkürzungen</u>	40
9.	<u>Danksagung</u>	41
10.	<u>Lebenslauf</u>	42

1. Einleitung

In den vergangenen fünfzig Jahren wurden bahnbrechende Erfolge auf dem Gebiet der Transplantation von soliden Organen gefeiert. Immunsuppressiva wie zum Beispiel Cyclosporine oder auch Tacrolimus (FK 506) ließen die kurzzeitigen Erfolgsraten deutlich steigen, speziell bei Nierentransplantation, aber auch anderen soliden Organen.

Allerdings sind, neben den anspruchsvollen chirurgischen Anforderungen, mit der Immunsuppression auch weitere Herausforderungen an den Behandler, speziell aber an den Patienten gestellt, dessen umfassende Mitarbeit unabdingbar ist. Darüber hinaus sind die Risiken in den spezifischen Nebenwirkungen der Präparate zu sehen. Neben den zum Teil toxischen Wirkungen und der Anfälligkeit für opportunistische Erreger, zeigen sich bei Langzeitbehandlungen erhöhte Risiken für Lymphome, Plattenepithelkarzinome (Min und Monaco, 1991; Disney, 1992; Swinnen, 1993), sowie die Gefahr der Sepsis oder kardiovaskulärer Erkrankungen.

Auch brachten neuere Medikamente nicht den gewünschten Erfolg und hatten keinen gravierenden Einfluss auf die Langzeit- Transplantat- Überlebensrate. Mehr als die Hälfte aller Nierentransplantate wurde innerhalb von zehn Jahren abgestoßen, so dass der Patient ein neues Transplantat bekommen oder sich in eine Dialysebehandlung begeben musste, was für ihn belastend, teuer und zeitaufwendig ist.

Basierend auf den immunregulatorischen Fähigkeiten von Monozyten/ Makrophagen (Atwood & Munn, 1999; Gordon & Taylor, 2005), konnten bereits 2002 Fändrich *et. al.* mit dem Gebrauch von embryonalen Stammzellen in einem Tierversuch (Fändrich *et. al.*, 2002) einen bedingten „Chimärismus“ erzeugen. Dies führte zu einer Regulierung der für die Abstoßungsreaktion verantwortlichen Zellen.

Unter dem Begriff „Chimärismus“ versteht man das Vorhandensein von Zellen zweier Individuen mit entsprechenden spezifischen Zelloberflächenproteinen in einem Körper. Dies kann bei der Transplantation von allogenen oder xenogenen Geweben auftreten. In diesem Model zeigte sich der Chimärismus speziell bei Makrophagen und B-Zellen, die sich im Thymus oder anderen lymphatischen Organen ansammelten. Dies führte zu einer verminderten Reaktion von alloreaktiven T-Zellen und schließlich zu einer langzeitigen Akzeptanz von Spenderorganen.

Die immunologische Akzeptanz des Transplantats ohne die Zuführung von Immunsuppressiva wäre somit als Idealziel zu sehen. Die nachfolgende tierexperimentelle Versuchsreihe soll hierzu einen Beitrag leisten.

1.1. TAIC (Transplant acceptance inducing cells)

Basierend auf Untersuchungen von Fändrich *et al.* und Inoue *et al.* (Fändrich *et al.*, 2002; Inoue *et al.*, 2006), die mit embryonalen Stammzellen von Ratten im Tierversuch zeigen konnten, dass diese sich zum Abschwächen einer Abstoßungsreaktion eignen, entwickelte sich der Gedanke, auch auf andere körpereigene Zellen vom Spender zurückzugreifen. Transplantat- Akzeptanz- induzierende Zellen (sog. TAIC, transplant acceptance inducing cells) sind eine Art immunregulatorischer Zellen monozytären Ursprungs, die ebenfalls in der Lage sein sollen, Abstoßungsreaktionen abzuschwächen.

1.2. Entstehung einer Abstoßungsreaktion (Immunbiologie der Transplantatabstoßung)

Allotransplantation beschreibt den Vorgang, wenn Organe innerhalb einer Spezies zwischen genetisch unterschiedlichen Individuen übertragen werden. Wird dabei ein allogenes Transplantat an das Blutsystem des Organempfängers angeschlossen und von den Zellen des Immunsystems übereinstimmend als Körper-"fremd" klassifiziert, beginnen eine Vielzahl von immunologischen Prozessen. Diese können im schlimmsten Fall zur Abstoßung des Transplantats führen.

Grundsätzlich kann man beim menschlichen Immunsystem zwei unterschiedliche Pfade unterscheiden, die nur eingeschränkt modulierbar sind. Das spezifische/ adaptive System ist fähig, verschiedene Zelloberflächenmoleküle zu erkennen und vermag sich anzupassen bzw. zu „lernen“. Die sogenannten Oberflächenantigene (oder auch Transplantationsantigene) befähigen das Immunsystem, zwischen „körpereigen“ und „körperfremd“ zu unterscheiden. Beim Menschen werden diese Moleküle von verschiedenen Genabschnitten kodiert, welche auf dem kurzen Arm des Chromosoms 6, dem sogenannten Haupthistokompatibilitätskomplexes (engl.: major histocompatibility complex, MHC) liegen. Die Zellen der spezifischen Abwehr sind im Stande, mit diesen Antigenen direkt zu interagieren und können durch verschiedene

Mechanismen (z.B. Phagozytose) Fragmente auf der eigenen Zelloberfläche präsentieren (Müller-Ruchholtz, 1984; Roitt et. al., 1991).

1.2.1. Haupthistokompatibilitätskomplex (MHC)

Erstmals wurde dieser Genabschnitt 1958 von Dausset (Dausset, 1958) als humaner Leukozyten- Antigen Komplex (HLA) für den Menschen beschrieben. Vergleichbare Regionen sind ebenfalls für Rattenspezies bekannt, hier werden sie als RT1-Lokus bezeichnet.

Beim Menschen können sowohl funktionell als auch chemisch zwei verschiedene Molekülklassen unterschieden werden (MHC- Klasse 1 und MHC- Klasse 2). Sie werden nicht nur unterschiedlich differenziert, sondern sind auch auf verschiedenen Abschnitten des MHC's determiniert. Klasse- 1 Antigene sind auf fast allen kernhaltigen Zellen nachweisbar, lassen sich aber in gesunden humanen Geweben vor allem auf Gefäßendothel (Arterien, Venen, Kapillaren) und Lymphozyten nachweisen. Beim Menschen werden sie durch die HLA, -A, -B und -C- Region repräsentiert, bei der Ratte durch den RT1- A Lokus.

Auf B- Lymphozyten, Monozyten, Makrophagen, dendritischen Zellen und Epithelzellen sind die Klasse- 2 Antigene zu finden. Beim Menschen sind sie durch die HLA -D (DR, DQ, DP) Region repräsentiert, bei Rattenspezies durch RT1- B und -D Lokus (Colvin, 1995). Die Besonderheiten der MHC- Klassen -1 und -2 sind, dass sie sowohl körpereigene, als auch körperfremde Proteine binden und deren Fragmente exprimieren können. Diese Proteinfragmente werden wiederum durch Antigen- spezifische T-Lymphozyten erkannt.

Antigene, die auf Klasse -1 Moleküle gebunden sind, werden durch CD8⁺ zytotoxische T- Lymphozyten (engl. cytotoxic T lymphocytes, CTL) erkannt, wohingegen Klasse-II gebundene Antigene durch CD4⁺ Helfer T Zellen erkannt werden.

1.2.2. Die CD- Nomenklatur

Bei der CD- Nomenklatur (engl. cluster of differentiation) stehen die einzelnen Symbole (CD8⁺ zum Beispiel entspricht zytotoxischen T- Lymphozyten) für Phänotypen der verschiedenen Lymphozytensubpopulationen. Diese werden durch unterschiedliche Membranproteine, überwiegend membrangebundene Glykoproteine, auf der Zelloberfläche klassifiziert. Neben T- Lymphozyten können auch Antikörperbindungs-

stellen diverser, von Plasmazellen sezernierter Immunglobuline als Reaktionspartner der individuell auf Zellmembranen exprimierten MHC- Klasse -1 und -2 Antigene funktionieren (Abbas et al., 1996). Anhand dieser Unterscheidungsmerkmale lassen sich Zellen funktionell und biochemisch ordnen. Die CDs zeigen eine große funktionelle Bandbreite. So haben einige die Funktion von Rezeptoren, andere enzymatische Aktivität, dritte wiederum sind in die intrazelluläre Kommunikation eingebunden.

1.2.3. Zell- vermittelte Effektormechanismen

Die wesentlichen zellulären Komponenten der Transplantatabstoßung sind antigen-präsentierende Zellen, vor allem dendritische Zellen und Makrophagen, T-Zellen und natürliche Killer- Zellen (Sabatine & Auchincloss, 1996)

1.2.3.1. T- Lymphozyten

Das morphologische Substrat des spezifischen Immunsystems sind die Lymphozyten. Sie stammen aus Stammzellen des Knochenmarkes und reifen in Organen des peripheren Immunsystems zu T-Zellen (Thymus) oder B-Zellen (Milz, Lymphknoten, Peyersche Plaques). Bei Vögeln reifen sie in der Bursa fabricii, die Säugetiere nicht besitzen, die aber für die Namensgebung aufgrund experimenteller Studien maßgeblich war. Reife Lymphozyten sind in der Lage mit partikulären sowie löslichen Antigenen zu reagieren, spezifische Abwehrmechanismen zu entwickeln und diese in einer Art Gedächtnis des Immunsystems aufzubewahren. Bei späteren neuerlichen Kontakten mit dem identischen Antigen stehen die Abwehrmechanismen dann sofort zur Verfügung. Gelingt es, bei dieser Sofortreaktion das Antigen zu vernichten, besteht Immunität.

T-Lymphozyten gelten nach wie vor als die primären Mediatoren der Abstoßung von Allotransplantaten. Dabei stellen die vom Haupthistokompatibilitätskomplex kodierte MHC-Antigene den stärksten Stimulus zur Aktivierung dieser Lymphozytensubpopulation dar. Sie werden entweder direkt auf allogenen Zielzellen erkannt (MHC-Klasse-I), oder nach Aufnahme und Prozessierung durch Antigen-präsentierende Zellen (APZ) auf deren Oberfläche präsentiert. Bei Kontakt reagieren die T-Lymphozyten mit sogenannter klonaler Expansion (Youngblood et. al., 2010), woraus Zellen hervorgehen, die die gleiche Oberflächenstruktur zeigen, wie die Ausgangszelle.

Unterteilen lassen sich die T-Lymphozyten in:

1. Die (CD4+) T- Helferzellen, die vorwiegend mit MHC- Klasse-II Antigenen reagieren. Ihnen kommt eine entscheidende Bedeutung zu, da sie nicht nur über die Stimulation von B-Lymphozyten die humorale Abwehr in Gang setzen, sondern auch durch die Interaktion mit zytotoxischen T-Zellen, natürlichen Killerzellen (NKz) und Makrophagen die Zerstörung allogener Zielzellen steigern können. Darüber hinaus sind sie neben den eigentlichen Effektormechanismen auf die beteiligten Zellen auch in der Lage Mediatorstoffe freizusetzen. Diese Mediatoren (Zytokine) sind kleine Proteine, deren Expression und Sekretion durch die Antigen- vermittelte Lymphozytenaktivierung ausgelöst werden. Untergruppen der Zytokine sind Hämatopoetine (z.B. Interleukine), Interferone (INF), Tumor-Nekrose-Faktoren (TNF) und andere Chemokine (Paul & Sender, 1994).

2. Die (CD8+) zytotoxischen T-Zellen (engl. cytotoxic T-lymphocytes, CTL) sind eine weitere Untereinheit der T-Lymphozyten. Nach Aktivierung und Proliferation (hervorgerufen durch Interleukin 2, IL2) sind sie in der Lage, sich über den MHC- Klasse-I Komplex an die Zielzellen anzulagern und sie über zwei Wege zu zerstören. Der eine Weg der Lysierung der Zielzelle besteht aus dem Freisetzen von lytischen Enzymen aus zelleigenen Granula, was eine Porenbildung in der Zellmembran der zu zerstörenden Zellen zur Folge hat. Daraus resultiert ein osmotischer Gradient, was schließlich zum Platzen der Zelle führt. Ein zweiter Weg besteht in der Aktivierung DNS- abbauender Enzyme, was die Zielzelle in Apoptose (Zelltod) treibt.

Des Weiteren sind sog. T-Suppressor- Zellen in der Lage, die Immunantwort gegen ein spezielles Antigen zu unterdrücken, z.B. durch die Freisetzung von Interleukin 10 (IL10). Daraus resultiert eine Immuntoleranz durch Hemmung der Aktivität von T- und B- Lymphozyten. Dadurch kann eine überschießende Immunantwort verhindert werden (Karczewski et. al., 2010)

1.2.3.2 Effektorzellen der unspezifischen Immunantwort

Die Effektorzellen der unspezifischen Antwort unterscheiden sich wesentlich von denen der spezifischen Antwort, denn sie werden aktiv, ohne vorherigen Erkennungs-

oder Aktivierungsmechanismen zu unterliegen. Diese Zellen sind in erster Linie Makrophagen und NK-Zellen. Während die Immunantwort von T- und B- Lymphozyten erst nach Tagen im Anschluss an einen sensibilisierenden Erstkontakt und nach klonaler Expansion zum Tragen kommt, können Zellen der unspezifischen Immunantwort bereits unmittelbar nach Anschluss des Transplantates an der Blutversorgung des Empfängers aktiv werden.

Ein weiterer Baustein der unspezifischen Abwehr sind Makrophagen. Sie haben ihren Ursprung in Vorstufen aus dem Knochenmark, einer Ziellinie, die sich über Blutmonozyten in ortsständige Gewebsmakrophagen entwickelt. Durch ihre Fähigkeit, Antigene durch Phagozytose aufzunehmen und zu eliminieren, sind sie selbst direkt an der unspezifischen Abwehr beteiligt. Exogen aufgenommene Antigene können andererseits prozessiert werden, was zur Formation antigener Peptide führt, die zusammen mit MHC- Klasse 2 Molekülen auf der Zelloberfläche präsentiert werden. Durch die Ausschüttung eigener Mediatorenstoffe (IL-2, INF gamma, IL-12) rekrutieren Makrophagen zusätzlich unspezifische Entzündungszellen wie Granulozyten und verstärken die über T-Zellen vermittelte Immunantwort (Te Velde, 1994). Im Modell der Transplantatabstoßung lassen sich Makrophagen bereits nach kurzer Zeit im Transplantat nachweisen (Mc Whinnie, 1986; Hell 1990; Azuma, 1994).

Natürliche Killerzellen (NKz) sind mononukleäre Zellen, die ohne vorherige Stimulation verschiedene Zelltypen, darunter vor allem Tumor- und virusinfizierte Zellen, lysieren. Körper eigene Zellen werden durch spezielle Rezeptoren (engl.: Killer cells inhibitory receptors) auf der Zelloberfläche vor der Auflösung durch NK-Zellen geschützt. Histologisch unterscheiden sie sich von anderen Zellen durch ihre zahlreichen zytoplasmatischen Granula als große granulozytäre Lymphozyten (engl.: large granular lymphocytes, LGL) (Trinchieri, 1989). Zwar sind die natürlichen Killerzellen in der Lage, ohne vorherige Aktivierung vermeindlich pathogene Erreger zu identifizieren und zu lysieren, doch haben auch sie einen aktivierenden Einfluss auf T-Lymphozyten (Villard, 2011).

Darüber hinaus sind bei der Transplantation natürliche Killerzellen von großem Interesse, da zum Einen die Effektivität der verschiedenen Immunsuppressiva auf die NKs zur Zeit noch unklar ist, sie zum Anderen keiner Prägung unterliegen, wodurch

auf sie im Zuge einer Konditionierung kein Einfluss genommen werden kann. Dass sie aber Einfluss auf die Organabstoßung haben, konnten Nemlander et. al. bereits 1983 für die Nierentransplantation zeigen. Neuere Erkenntnisse unterstützen die Vermutung, dass es zwischen NK-Zellen und zytotoxischen T-Zellen als Effektorzellen der Immunantwort eine enge Verknüpfung gibt, die sich in einer gemeinsamen Endstrecke der Transplantatabstoßung nach allogener Transplantation manifestiert (Bolton et. al., 1989; Fändrich, 1996 a). So erkennen NK-Zellen körperfremde MHC-Proteinkomplexe nur kurz nach der Reperfusion des transplantierten Organs. Folgen sind neben der Lyse der Zielzellen auch die Ausschüttung verschiedener Zytokine, die die Immunantwort durch spezifische T- Zellen verstärken.

1.2.4. Die spezifische Immunabwehr

Die spezifische Immunantwort ist ebenfalls von Geburt an aktiv, setzt in ihrer Wirksamkeit erst nach der Unspezifischen ein, nimmt aber im Laufe des Lebens an Effektivität enorm zu. Sie besteht aus einem zellvermittelten und einem humoralen Anteil. Der zellvermittelte Teil besteht in erster Linie aus spezialisierten T- Lymphozyten und der humorale Anteil aus von B- Lymphozyten sezernierten Antikörpern.

Zunächst bedarf es einer Erkennung, Aufnahme und Prozessierung von körperfremden MHC-Antigenen durch dendritische Zellen oder Makrophagen. Sie können in diesem Zusammenhang als akzessorische Zellen der spezifischen Immunantwort verstanden werden. Die körperfremden MHC- Antigene werden an der Oberfläche der phagozytierenden Zellen CD4⁺ T-Helferzellen präsentiert. Die sich anschließende Zellinteraktion zwischen T- Helfer- Lymphozyten und B- Zellen, beinhaltet, neben verschiedenen Kopplungsmechanismen über Adhäsionsmoleküle, auch die Sekretion eines bestimmten Zytokinprofils. Dadurch werden die B-Lyphozyten zur klonalen Expansion und Proliferation angeregt. Ferner differenzieren sich die B-Lymphozyten zu Antikörper- produzierenden Plasmazellen aus, sezernieren die aus Glykoproteinen bestehenden Antikörper ins Blut und leiten so die humorale Antwort ein (Campbell & Halloran, 1996). Die Antikörper binden nun an das Antigen und locken damit wiederum Phagozyten oder lymphozytäre Killerzellen an, die schließlich für die Vernichtung des Antigens sorgen. Allerdings kann auch die einfache Bindung eines Antikörpers an ein Antigen dieses unschädlich machen.

Bei der primären Transplantatabstoßung und unsensibilisierten Empfängern lassen tierexperimentelle Untersuchungen vermuten, dass die humorale Antwort nur eine geringe Rolle spielt. Unter gewissen Umständen scheint sie das Überleben des Transplantats sogar zu verlängern (Carpenter et.al., 1976; Winn, 1992). Eine Beteiligung allospezifischer Antikörper im Rahmen der chronischen Abstoßungsreaktion, bei der es langfristig zur Schädigung der Gefäßendothelien innerhalb des Transplantates kommt, gilt jedoch als wahrscheinlich. (Joyce et. al., 1988)

1.3. Die Transplantat- gegen- Wirt Erkrankung (GvHD)

Bei der Transplantat- gegen- Wirt-Erkrankung handelt es sich um eine komplex ablaufenden Interaktion zwischen immunkompetenten Zellen des Transplantats und des Empfängers. Dabei reagieren Spender- T-Lymphozyten gegen die Alloantigene des Empfängers, die von speziellen antigenpräsentierenden Zellen (APZs) immuno- gen auf den Oberflächen präsentiert werden. Zunächst beschrieben Lorenz *et. al.* 1951 die GvHD bei Mäusen als sogenannte „zweite Krankheit“ nach der Strahlen- krankheit und Rettung der Blutbildung durch Transplantation von allogenen Kno- chenmark und allogenen Milzzellen. Theobald postulierte 1995, dass sich der Anteil der Spender- T-Zellen im transferierten Knochenmark, sowie der Umfang der MHC- Unterschiede zwischen Spender und Empfänger negativ auf die Stärke der Manifes- tation und auch auf die Letalität des Rezipienten auswirken würde (Theobald, 1995). Auf der Basis tierexperimenteller Studien stellten Billingham *et. al.* fest, es müssen insgesamt drei Bedingungen erfüllt sein, damit es zur Entwicklung einer GvHD kom- men kann (Billingham et.al., 1966):

1. Es müssen immunkompetente Zellen im Transplantat enthalten sein
2. Histoinkompatibilität zwischen Empfänger und Spender
3. Unfähigkeit des Empfängers, die transplantierten Zellen zumindest vor- übergehend zu zerstören, bis diese selbst die Möglichkeit haben, eine immunogene Reaktion im Empfänger auszulösen

Mit der Entdeckung des Major- Histokompatibilitäts-Komplexes (MHC) und der Hu- man Leukocyte Antigene (HLA) kann heutzutage eine geeignete Spender Auswahl getroffen werden (Fritzsche et. al., 2010). Allerdings besteht auch bei kompletter

Gleichheit der HLA- Merkmale von Spender und Empfänger unter gleichzeitiger prophylaktischer Immunsuppression die Gefahr einer GvHD.

1.3.1. Einteilung der GvHD

Grundsätzlich werden zwei Formen unterschieden. Die akute "graft- versus- host disease" (GvHD) tritt bis Tag 100 nach hämatopoetischer Knochenmark- und Stammzelltransplantation auf und ist durch die Zerstörung epithelialer Zellen des Empfängers durch T-Zellen des Spenders nach einer entzündlichen Kaskade gekennzeichnet.

Ungefähr 35- 50% der Empfänger hämatopoetischer Stammzelltransplantate entwickeln eine akute GvHD (Jacobsohn et. al., 2007).

Ab Tag 100 spricht man schließlich von einer chronischen Form. Sie induziert pathologische Veränderungen an Leber, Haut und/ oder Gastrointestinaltrakt entweder im Anschluss an eine akute GvHD, oder wenn nach 100 Tagen erstmals Symptome auftreten. In 2005 wurde diese Einteilung von dem National Institute of Health (NIH) erweitert und mit klinisch messbaren Anhaltspunkten versehen. Grund dafür sind die vielfältigen Formen des Auftretens der GvHD. So können vor Tag 100 bereits chronische Symptome bestehen oder die akute Form weit über Tag 100 hinaus ohne klinische Zeichen einer chronischen GvHD bestehen (Filipovich et. al., 2005)

1.4. Das FoxP3 Protein

Bei dem Forkhead- Box- Protein P3 (FoxP3) handelt es sich um einen im Zellkern vorkommenden Transskriptionsfaktor. Dieser bindet an die DNA und stimuliert damit die Expression von Proteinen, die für regulatorische (CD4⁺/CD25⁺) T-Lymphozyten spezifisch sind und sie damit auch nachweisbar macht. Ferner wird angenommen, dass FoxP3 bei der Transformation von naiven CD4⁺ T-Zellen hin zu Suppressorzellen oder regulatorischen Zellen unter Stimulans spezieller Peptid- Agonisten eine Rolle spielt (Kretschmer *et al.*, 2005).

2. Fragestellung

In der vorliegenden tierexperimentellen Arbeit wurde der Einfluss von *transplant acceptance inducing cells* (Transplantat- Akzeptanz induzierende Zellen) auf die Abläufe von Abstoßungsreaktionen nach Transplantation von soliden Organen bei Ratten untersucht. Dabei sollte auch die Optimierung des Gewinnungsprozesses von TAIC eine Rolle spielen. Im Einzelnen wurden folgende Fragen beleuchtet:

1. Haben TAIC einen immunmodulatorischen Einfluss auf eine Abstoßungsreaktion?
2. Werden mögliche Abstoßungsreaktionen im Sinne einer Impfung verstärkt?
3. Gibt es mögliche Serumoptima, die auf die regulatorischen Eigenschaften der TAICs Einfluss nehmen?
4. Unterscheidet sich die Anzahl an FoxP3⁺ T-Zellen im peripheren Blut zwischen der Kontrolle und mit TAICs behandelten Tieren?

Material und Methoden

3.1. Reagenzien, Medien und Pufferlösung

Im folgenden Abschnitt werden alle für diese Arbeit benötigten Reagenzien, Medien und Pufferlösungen in alphabetischer Reihenfolge aufgelistet. Die dabei verwendeten Abkürzungen finden sich entsprechend im weiteren Text der Arbeit.

- 4% Chlorwasserstoff zu Narkose
- Einbettungsmedium für Gefrierschnitte, Embedding® (Reichert - Jung, Nußloch)
- Ethanol 100% (Hof- Apotheke, Kiel)
- Fötale Kälberserum, inaktiviert bei 56°C über 30 min (Conco Lab., Wiesbaden)
- H₂O, destilliert
- Maus M-CSF, rekombinanter Mäuse Makrophagen stimulierender Faktor (Sigma- Aldrich, München)
- Ratten IFN- α , rekombinantes Ratten Interferon alpha (Biotech GmbH, Aidenbach)
- Ficoll- Hypaque (Sigma- Aldrich, München)
- RPMI 1640 Zellkulturmedium ohne L- glutamine und phenol rot (Cambrex Bio Science, Verviers, Belgien)
- PBS = Phosphat- gepufferte, physiologische Kochsalzlösung (engl.: phosphat- buffered Saline) (Cambrex, Baltimore, USA)
- Xylol (Merck KGaA, Darmstadt)
- Eukitt™ *Mounting* Medium (Science Services, München)
- Aceton (Merck KGaA, Darmstadt)
- TBS Puffer = Tris-gepufferte Salzmischung (Pulver) (engl.: Tris- buffered Saline)
 - 9g Tris- Base (sigma- Aldrich, München)
 - 68,5g Tris- HCl (sigma- Aldrich, München)
 - 86,8g NaCl (Darmstadt, München)
 - pH: 7,4- 7,6

Wässriges normales Rattenserum zur Blockade immunhistochemischer Vorgänge (DAKO A/S, Glostrup, Dänemark) anti Ratten RECA-1 von Mäusen (engl.: Anti- Endothelial Cell Antibody) (Serotec GmbH, Düsseldorf)

- anti- Maus Immunglobuline von Kaninchen (DAKO A/S, Glostrup, Denmark)
- APAAP (Alkalische-Phosphatase-Anti-Alkalische-Phosphatase-Komplex) monoklonal von Mäusen (DAKO A/S, Glostrup, Dänemark)
- Zytomed AP- Red Substrate Kit (Zymed Immunodetection, San Francisco, USA)
- 1 Tropfen der Reagenz A und 1 Tropfen der Reagenz B werden zusammen in ein Teströhrchen gegeben und für 2 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert
- 2 mL destilliertes Wasser wurde hinzugefügt
- 2 Tropfen der Reagenz C wurden hinzugegeben
- Kaiser´s Glycerin Gelatine (Merck KGaA, Darmstadt)

3.2. Versuchstiere, Tierhaltung und Zusammensetzung der Tiergruppen

3.2.1. Versuchstiere

Für die Versuche wurden ausschließlich männliche Ratten verschiedener Inzuchtstämme verwendet. Die Spendertiere stammten vom LEW/ HanHsd und die Empfängertiere vom DA/ OlaHsd Stamm. Sie wurden bei der Firma Harlan Winkelmann GmbH, Borcheln erworben oder entstammten der zentralen Einrichtung für Forschungstiere des Universitätsklinikums Schleswig- Holstein.

Alle an den Versuchstieren vorgenommenen Manipulationen waren zuvor durch das Ministerium für „Umwelt und Natur“ des Landes Schleswig- Holsteins auf Basis eines Tierversuchsantrags genehmigt worden (V 742-72241.121-7(64-7/03)).

Das Gewicht der DA- Tiere, die für die Versuchsreihe ausgewählt wurden, betrug zwischen 197g und 319g an Tag „0“. Das Gewicht der LEW- Ratten, die ausgewählt wurden, lag zum Lieferzeitpunkt zwischen 160g und 250g.

Tab. 3-1 Übersicht über eingesetzte Rattenstämme und die zugehörigen MHC- Haplotypen

Inzuchtstamm	MHC- Haplotyp (A, B/D, C- Lokus):
Lewis (LEW)	RT1. ¹
DA	RT1. ^{av1}

3.2.2. Diät

An die Ratten wurde spezielles Futter mit dem Namen „ssniff R/M- H, 10mm“ („Complete diet for rats“) von der Firma ssniff Spezialitäten GmbH, Soest, Deutschland ad libitum verfüttert. Ebenfalls ad libitum erhielten die Tiere Wasser vom Hahn nach Trinkwasserqualität. Es wurde keine gesonderte Kontrolle der Nahrungsaufnahme durchgeführt.

3.2.3. Haltung

Die Haltung der Versuchstiere erfolgte jeweils paarweise unter standardisierten Bedingungen in Makrolonkäfigen des Typs 3, bei einer relativen Luftfeuchtigkeit von 55- 65%, einer Raumtemperatur von 22 (plus/ minus 2) Grad Celsius und einem 12h Hell- Dunkel Zyklus (hell von 07:00 bis 19:00 Uhr, dunkel von 19:00 bis 07:00 Uhr).

3.2.4. Umwelteinflüsse

Aufgrund der standardisierten Haltung und des Vorgehens können äußere Einflüsse auf die Studie ausgeschlossen werden.

3.3. Gruppierung und Dosierung

Gruppe	Anzahl der Tiere pro Gruppe	Dosis von TAIC pro Tier	Serum	Kontroll-monozyten
1	6	---	---	---
2	5	5.0×10^6	---	5×10^6 Kontrollzellen nach 1h Adhärenz
3	5	5.0×10^6	FCS	---
4	7	10.0×10^6	FCS	---
allogene Kontrolle	12	5.0×10^6	Rattenserum (Ratten IFN- α , Biotech)	---
syngene Kontrolle	5	5.0×10^6	syngenes Rattenserum (Harlan)	---

Die Dosierung wurde anhand vorangegangener Tests gewählt (diese Daten werden hier nicht gezeigt) und die Tiere randomisiert auf die Gruppen verteilt.

Gruppe 1 LEW auf DA (ohne Zelinjektion)

Gruppe 2-5 Spezifitätskontrolle (spezifisch programmierte Monozyten (TAIC))

Gruppe 6 syngene Kontrolle

3.4. Produktion der TAIC

Zur Gewinnung der TAICs wurden Milzzellen von den LEW Spender- Ratten entnommen. Unter normalen Umständen sind für die Produktion von 5.0×10^6 TAIC 7-8 Milze notwendig.

Zur Zerkleinerung der Milz wurde diese durch einen Filter gepresst und dabei auch vom verbindenden Gewebe getrennt. Die resultierende Suspension wurde auf ein Lymphozyten-Separations-Medium (Ficoll-Hypaque: Histopaque 1077 by Sigma-Aldrich, München, Deutschland) in 50mL Zentrifugationsröhrchen (Becton Dickinson, Heidelberg, Deutschland) gegeben. Zu 15mL des Separationsmediums wurden 20mL der Zelllösung hinzugefügt und bei 400g für 20 Minuten bei Raumtemperatur ohne Pause zentrifugiert. Die gewonnenen Zellen wurden zweifach in RPMI-1640 ohne Phenol rot (Chambrex Bioscience Verviers, Verviers, Belgien) für 6 Minuten bei 300g beziehungsweise 200g gewaschen.

Zur weiteren Vermehrung wurden die Zellen im Anschluss für 5 Tage in RPMI-1640 ohne Phenol rot (Chambrex Bioscience Verviers, Verviers, Belgien) kultiviert. Ergänzt wurde die Lösung mit 5ng/ml rekombiniertem Mäuse M-CSF (Sigma Aldrich, München, Deutschland), 100 U/ml Penizellin (Chambrex Bioscience Verviers, Verviers, Belgien), 100 µg/ml Streptomycin (Chambrex Bioscience Verviers, Verviers, Belgien), 2 mM Glutamin (Chambrex Bioscience Verviers, Verviers, Belgien) und 10% Serum unterschiedlichen Ursprungs entsprechend der jeweiligen Gruppe. Um eine Anreicherung von Monozyten in der Zelllösung zu erreichen wurden nicht adhärenente Zellen im Rahmen des Wechsels der Lösung nach 1, 24 und 72 Stunden entfernt. Nach insgesamt 4 Tagen entwickelten die Zellen phenotypische Charakteristika zu dem jeweiligen Nährmedium. Die resultierende, dendritischen Zellen ähnelnde Erscheinung wurde wieder aufgehoben, nachdem die Zellen mit rekombiniertem Ratten- IFN- γ (PAN Biotech GmbH, Aidenbach, Deutschland) für weitere 24 Stunden stimuliert wurden.

Die letztendliche Gewinnung der Zellen begann mit dem Entfernen nicht adhärenenter Zellen, die durch vorsichtiges Pipetieren mit RPMI- 1640 abgewaschen wurden. Anschließend wurden die adhärenenten Zellen abgelöst und die Petrischalen mit 4°C kalter PBS Lösung abgespült. Die gewonnenen Zellen wurden ebenfalls zweifach in der PBS Lösung gewaschen, bevor sie anhand ihrer Größe und Granularität mit Hilfe einer Zählkammer (ABX Micros 60, Axon Lab AG, Reichenbach, Deutschland) als Lymphozyt, Monozyt und Granulozyt klassifiziert wurden.

Schlussendlich wurden die gewonnenen Zellen innerhalb von zwei Stunden den Empfängertieren intravenös in die laterale Schwanzvene injiziert.

3.5. Adhärenente Zellen

Die Produktion der adhärenenten Zellen für die Kontrollgruppe startete nach dem oben beschriebenen Vorgehen mit dem Zerkleinern der Milz der Spendertiere. Die Tiere der Kontrollgruppe erhielten adhärenente Splenozyten, die nach einer Stunde Inkubationszeit in Petrischalen auf normalen Nährmedien (RPMI ohne die Zugabe von M-CSF) kultiviert wurden. Der Prozess der Gewinnung entspricht dem der TAIC.

Eine Woche nach Zellinjektion wurde eine heterotope Herztransplantation durchgeführt (Tag 0).

3.6. Die Herz- Transplantation

Vor den geplanten operativen Eingriffen wurden die zu operierenden Tiere einheitlich für 24 Stunden nüchtern gesetzt. Die Transplantation erfolgte in Inhalationsnarkose mit 4% Chlorwasserstoff (1ml pro 100g Ratte) unter entsprechender Berücksichtigung der für Wirbeltiere geltenden rechtlichen Verordnungen.

Instrumente, Hände, Tiere und Arbeitsplätze wurden desinfiziert, so dass die Operationen unter aseptischen, aber nicht sterilen Bedingungen stattfanden. Das gewählte Operationsverfahren wurde erstmal ausführlich von Ono & Linsey in 1996 (Ono & Linsey, 1996) beschrieben.

Nachdem sichergestellt wurde, dass die Spendertiere vollständig betäubt wurden, erfolgte deren Heparinisierung. Anschließend bluteten die Tiere nach der Durchtrennung der großen abdominalen Gefäße vollständig aus. Die anteriore Brustwand wurde entfernt und die Aorta, sowie die pulmonalen Gefäße durchtrennt. Alle kardialen Gefäße wurden mit 8-0 Ligaturen (Braun- Dexon, Melsungen, Deutschland) abgebunden, und das Herztransplantat wurde entnommen. Um nur eine kurze Ischämiephase zu gewährleisten, wurde das Verfahren, unmittelbar bevor das Empfängertier zur Aufnahme bereit war, durchgeführt.

Die Implantation fand ebenfalls unter Betäubung mit Chlorwasserstoff statt. Nach einer Mittellinien- Laparotomie wurden die abdominalen Gefäße von retroperitonealem Gewebe befreit und abgeklemmt. Es wurde eine schmale longitudinale Aortotomie durchgeführt, und die Aorta des Transplantates wurde mit Hilfe mikrovaskulärer Technik und 8-0 Prolene (Ethicon, Hamburg, Deutschland) an die infrarenale abdominale Aorta des Empfängertiers angeschlossen. Um den venösen Abfluss sicherzustellen, wurde die Vena cava inferior abgeklemmt und inzidiert. Anschließend wurde die Pulmonararterie des Transplantats an die Vena cava inferior ebenfalls mit mikrovaskulärer Technik anastomosiert. Nachdem alle Klemmen entfernt wurden und sichergestellt werden konnte, dass alle Blutungen zum Stillstand gekommen waren, wurde das Abdomen mit einer einfachen fortlaufenden Naht verschlossen.

Tiere, die während der Operation oder innerhalb von 24 Stunden danach verstarben, wurden als technische Fehler gewertet und in der Evaluation nicht berücksichtigt.

3.7. Klinische Verlaufskontrolle

Bei allen Versuchstieren erfolgte eine tägliche Gewichtsbestimmung anhand ausführlicher Untersuchungen und einer Waage (Mettler, Giessen, Deutschland), die eine Genauigkeit von $\pm 0,1\text{g}$ aufwies. Es wurden äußere Aspekte, Verhalten und klinisch sichtbare Auffälligkeiten beurteilt.

Die Erstdiagnose der *Host versus Graft reaction* wurde nach dem Auftreten einer deutlichen Verhärtung des Transplantats gestellt. (siehe hierzu 3.8.)

3.8. Evaluation der Herzfunktion

Während der täglichen Verlaufskontrollen wurde auch besondere Rücksicht auf das Transplantat gelegt. Dieses wurde auspalpiert, und es wurden Funktion und Kondition kontrolliert. Hinsichtlich der Funktion wurden die Parameter Frequenz, Intensität und Regelmäßigkeit des Herzschlags beobachtet und notiert. Bezüglich der Kondition wurden Schwellungen und/oder Verhärtungen evaluiert.

Die Transplantate wurden anhand des folgenden Systems eingestuft:

- +++++ regelmäßiger und starker Herzschlag
- ++++ leichte Schwellung und/oder Verhärtung, Herzschlag regulär, aber leicht abgeschwächt
- +++ Transplantat geschwollen und verhärtet, Herzschlag zunehmend geschwächt
- ++ stark geschwollen und verhärtetes Transplantat, kaum Herzschlag
- + pulsierender Herzschlag (fortgeleiteter aortaler Puls)
- kein Herzschlag

3.9. Histologische Aufbereitung des Gewebes

Für die durchgeführte Immunhistologie wurden Schnitte verwendet, die vom Gewebe stammten, das in Flüssigstickstoff schockgefroren und bei -80°C gelagert wurde. Die Schnitte wiesen eine Dicke von $4\mu\text{m}$ auf und wurden auf Objektträger in Aceton 10 Minuten lang bei 4°C fixiert.

3.9.1. APAAP- Färbung (Alkalische Phosphatase anti- Alkalische Phosphatase Färbung)

Bei dieser Färbemethode werden charakteristische Zelloberflächenantigene mit speziellen monoklonalen Antikörpern (mAK) markiert und in weiteren Schritten sichtbar gemacht. Vor Anwendung des Primärantikörpers werden die jeweils einzusetzenden mAK zunächst einer Titerbestimmung unterworfen. Dabei wird die Antikörperverdünnung geometrisch erhöht und durch immunhistochemische Kontrollen Ausmaß und Intensität der gekennzeichneten Strukturen registriert. Nach einer Inkubationszeit mit dem primären spezifischen Antikörper für 30 Minuten folgte die Zugabe des sekundären AKs ebenfalls für 30 Minuten, bevor schließlich der Tertiärkomplex gebildet wurde.

Folgende Antikörper wurden verwendet: anti- Ratten CD4 (W3/25, Serotec, Düsseldorf, Deutschland); anti- Ratten CD8 (Ox8, Becton Dickinson, Heidelberg, Deutschland); anti- Ratten CD25 (Ox39, Serotec); anti- Ratten CD68 (ED1, Bahem, Weil am Rhein, Deutschland); anti- Ratten CD161 (10/78, Serotec); anti- Ratten CD163 (ED2, Bahem), Ki-67 und anti- Ratten Myeloperoxidase (RD4, HBT/Sanbio, Beutelsbach, Deutschland).

Beim verwendeten Färbeverfahren hydrolysiert das Enzym (alkalische Phosphatase), das als Substrat eingesetzte Naphtol AS- BI- Phosphat in seine Phosphat- und Phenolkomponenten. Die Phenole koppeln mit farblosen Diazoniumsalzen (Chromogene) und bilden so unlösliche Azofarbstoffe (Boenisch, 1989). In diesem Fall wurde als Chromogen „Fast- Red- Salz“ verwendet, was zu einer intensiven Rotfärbung der zu markierenden Strukturen geführt hat.

Folgende Schritte wurden im Einzelnen durchgeführt: Zunächst wurden 2mg Naphtol AS- Bi- Phosphat in 0,2mL N,N-Dimethylformamid (DMF) gelöst, dann 0,1M TRIS-HCL mit destilliertem Wasser auf pH 8,2 eingestellt und 9,8 mL dieser Lösung zum Ansatz gegeben. Die endogene alkalische Phosphatase wurde mit 0,01mL 1M Levamisol gehemmt. Im folgenden Schritt wurden 10 mg Fast Red TR als Kopplungssalz unmittelbar vor dem Färbeprozess im Inkubationsmedium gelöst und die gefilterte Lösung auf die Objektträger aufgetragen. Nach 10- 20 minütiger Inkubation folgte nochmals dreimaliges Waschen in PBS (phosphat buffered saline). Die Gegenfärbung erfolgte mit Hämalaun. Eingebettet wurden die Schnitte

schlussendlich in Kayser's- Glyceringelatine. Dieses Verfahren entspricht der von *Cordell et al.* 1984 vorgestellten Methode (Cordell et. al., 1984)

3.9.2. Die Van Gieson Färbung

Für die *Van Gieson Färbung* wurden deparafinisierte Schnitte mit Hilfe des „*The Elastica van Gieson staining kit*“ (Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland) eingefärbt. Diese Methode dient zur Darstellung von Bindegewebe und Muskulatur. Das Kit beinhaltet eine Kombination von *Resorcin- Fuchsin- Lösung* nach Weigert mit einer *Picrofuchsin Lösung* nach van Gieson, die zur Färbung elastischer Fasern genutzt wurden, wobei eine *Eisenhämatoxylin Lösung* nach Weigert zur Färbung der Nuclei diente.

Aufgrund der Färbemethode stellen sich die Nuclei braun-schwarz, das Zytoplasma gelb, Kollagenfasern rot und elastische Fasern blass gelb dar.

Zur Darstellung von Apoptose wurde Hoechst 33258 (Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland) den Herstellerangaben entsprechend verwendet.

3.10. Statistik

Die gesammelten Roh-Daten wurden manuell in Labor- Reporte aufgenommen. Die weitere Datenauswertung erfolgte mit Microsoft Excel (Microsoft Office 2003). Die Graphiken wurden ebenfalls mit Microsoft Excel angefertigt.

Die Überlebensraten der Tiere wurden nach Kaplan- Meier mit Hilfe eines Statistikprogramms in Graph Pad Prism® (Version 4.0 für Windows, San Diego, USA) errechnet und die Unterschiede zwischen den Versuchsgruppen mittels generalisiertem *log-rank* Test nach *Mantel-Cox* verglichen.

4. Ergebnisse

4.1. Allgemeine Konditionen

Alle mit Zellen behandelten Tiere zeigten während der gesamten Beobachtungsdauer keine nennenswerten klinischen Symptome oder auffälligen Nebenwirkungen. Ferner kann festgehalten werden, dass die Gabe von TAIC keine negativen Einflüsse auf die Tiere oder die Transplantate mit Blick auf eine akzelerierte Abstoßung hatte. Im Vergleich zur Kontrollgruppe (LEW > DA ohne Zellen) durchlitt keines der Tiere stärkere Abstoßungskrisen. Kein Transplantat wurde schneller abgestoßen, als eines aus der Tiergruppe ohne Konditionierung mit TAIC.

4.2. Überlebenszeiten

Allogene heterotope Herztransplantate, die von LEW Spendern stammten, wurden innerhalb von 12 Tagen abgestoßen. Die Injektion von 5×10^6 TAICs, hergestellt mit FCS, lies das durchschnittliche Überleben signifikant ansteigen. Eine Erhöhung der Dosis bewirkte dabei keinen Anstieg der durchschnittlichen Überlebensrate. Interessanterweise hatten TAICs, die in unterschiedlichen Seren produziert wurden, auch unterschiedliche tolerogene Eigenschaften und damit unterschiedlichen Einfluss auf die Transplantatakzeptanz. So führte die Kultivierung mit FCS zwar zu einer signifikanten Transplantatverlängerung, ihr Erfolg war jedoch dosisabhängig. Höhere Dosen 10×10^6 TAIC wirkten weniger Transplantat- verlängernd als die Hälfte dieser Zelldosis. Den besten Transplantat- verlängernden Effekt hatte die Kultivierung der isolierten Monozyten mit syngemem LEW-Rattenserum der Firma Harlan. In dieser Versuchsgruppe überlebten 5 von 5 Herztransplantate über 100 Tage.

Gruppe	Tiergruppe	Überlebenszeiten (Anzahl x Tag)	Mittlere ÜLZ
1	Kontrollgruppe, keine Zellinjektion (n= 6)	1x1d*; 2x6d; 1x8d; 2x12d	7,5
2	5x10 ⁶ Kontrollzellen nach 1h Adhärenz (n=5)	1x1d*; 1x6d; 2x12d; 1x13d	8,8
3	5x10 ⁶ TAICs, FCS (n=5)	1x12d*; 1x15d; 1x21d; 1x48d; 1x67d	32,6
4	10x10 ⁶ TAICs, FCS (n=7)	1x1d*; 1x8d; 1x9d; 1x16d; 1x22d; 1x37d; 1x78	24,4
allogene Kontrolle	5x10 ⁶ TAICs, Rattenserum (Ratten Interferon α) (n=12)	2x1d*; 1x12d; 2x14d; 1x15d; 1x17d; 1x18d; 1x20d; 2x21d	12,8
syngene Kontrolle	5x10 ⁶ syngenes Rattenserum Harlan (n=5)	5x >100d	>100

Tab. 4-1: Dargestellt sind die beobachteten Überlebenszeiten der Versuchsgruppen in der LEW RT1.¹ > DA RT1. ^{av1} Ratteninzuchtstammkombination

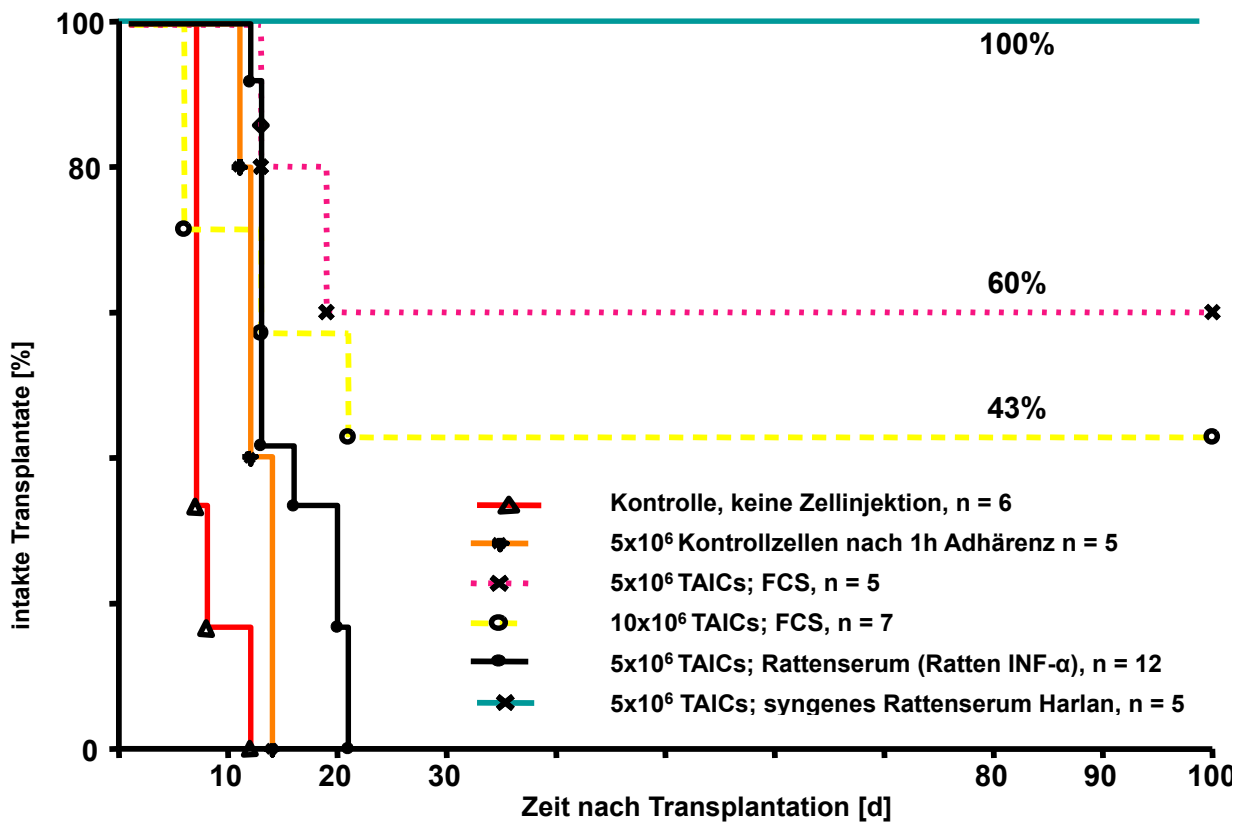


Abb. 4-1: Dargestellt sind die Überlebenskurven nach Herztransplantation mit und ohne Behandlung mit TAICs. *Tiere mit 1- Tag Überlebenszeit müssen als technische Versager gewertet werden, da sie ausnahmslos freies abdominales Blut bei Obduktion zeigten.

4.3. Histopathologische Untersuchungen

Zum Zeitpunkt der Abstoßungskrisen konnten zelluläre Infiltrate in den Transplantaten ausfindig gemacht werden. Diese wurden mit Hilfe von CD4, CD8 und CD25 Färbungen in histopathologischen Schnitten am Tag 7 nach der Transplantation als Lymphozyten beschrieben. Die Häufigkeit des Vorkommens und die Aktivität war sowohl in den angenommenen-, als auch den abgestoßenen Transplantaten gleich.

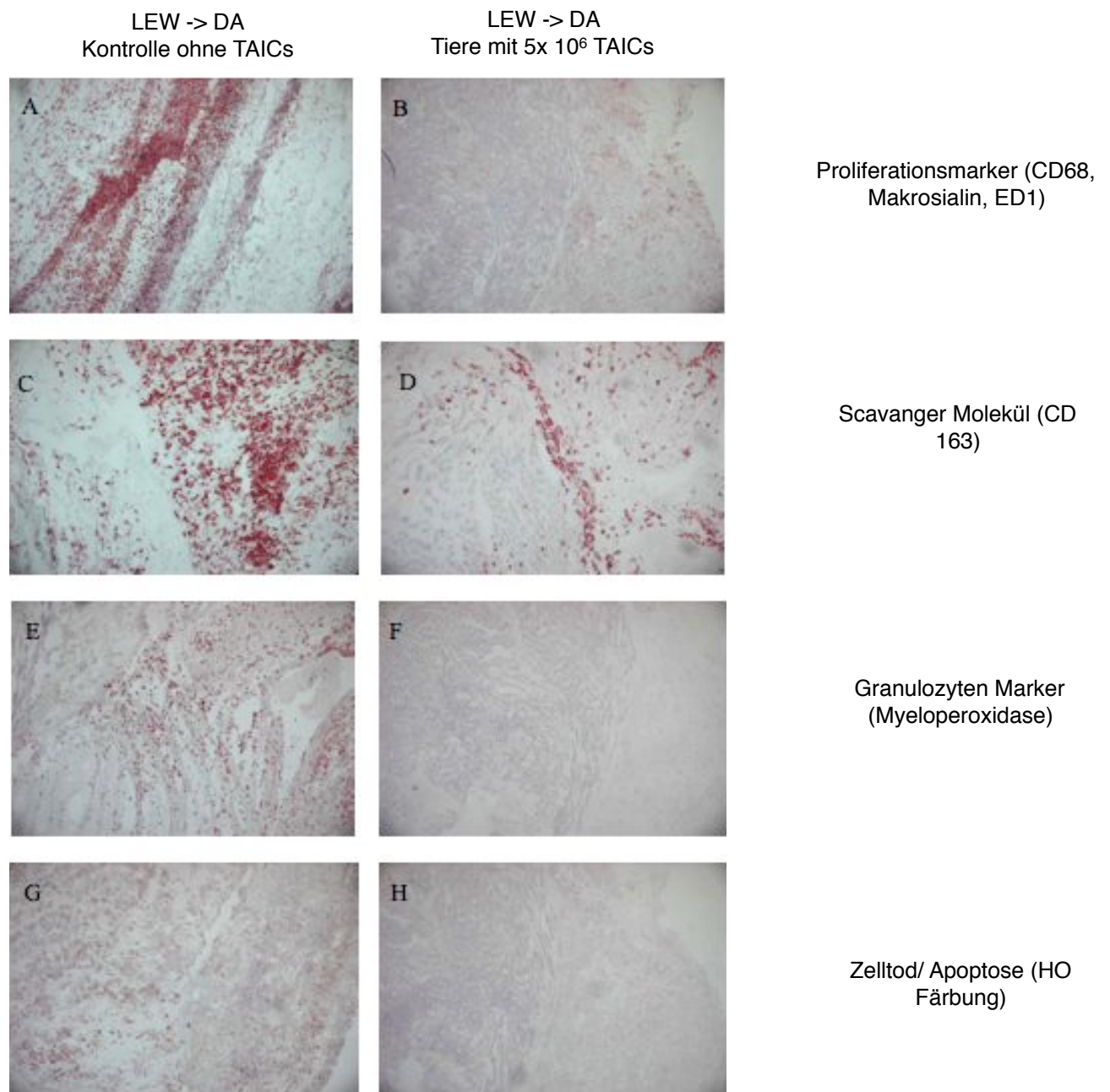


Abb. 4-2: Gegenübergestellt sind verschiedene Färbeverfahren

Interessanterweise wurde CD68, welches auf den Oberflächen von Makrophagen und Monozyten exprimiert wird, fast ausschließlich in Transplantaten nachgewiesen, die abgestoßen wurden und kaum auf solchen, die mit TAIC behandelt wurden. Der für die Färbung von CD68 verwendete ED1 Antikörper besitzt eine gewisse Selektivität für Monozyten und Makrophagen, so dass es möglich ist auch Subpopulationen immunologischer Effektorzellen zu detektieren (Dijkstra *et al.*, 1985).

Ferner konnte eine hohe Zahl an CD163⁺ Zellen in den abgestoßenen Transplantaten nachgewiesen werden, wohingegen sie fast vollständig bei denen fehlten, die akzeptiert wurden. CD163⁺ ist ein Marker, der mehrheitlich auf ausgereiften Makrophagen und weniger auf Monozyten zu finden ist (Polliet *et al.*, 2006). Granulozyten, die mit Hilfe von Myeloperoxidase beurteilt wurden, waren ebenfalls kaum in den Infiltraten der mit TAIC behandelten Transplantate nachweisbar. Diese deutlichen Unterschiede der Zellqualität in den Infiltraten erklärt, warum signifikant weniger Gewebedestruktion, gemessen an dem Vorhandensein apoptotischer Zellen bei den mit TAIC behandelten Tieren, als bei den unbehandelten zu finden ist. Dies entspricht den histologischen Untersuchungen, die an Tag 100 nach der Transplantation durchgeführt wurden.

Die Van Gieson Färbung eines gesunden Herzens zeigt intaktes Herzmuskelgewebe und wenig Bindegewebe, wohingegen die Färbung eines abgestoßenen Herzens von Tag 7, histologisch untersucht an Tag 30, massive Zerstörungen in der physiologischen Muskelstruktur zeigt.

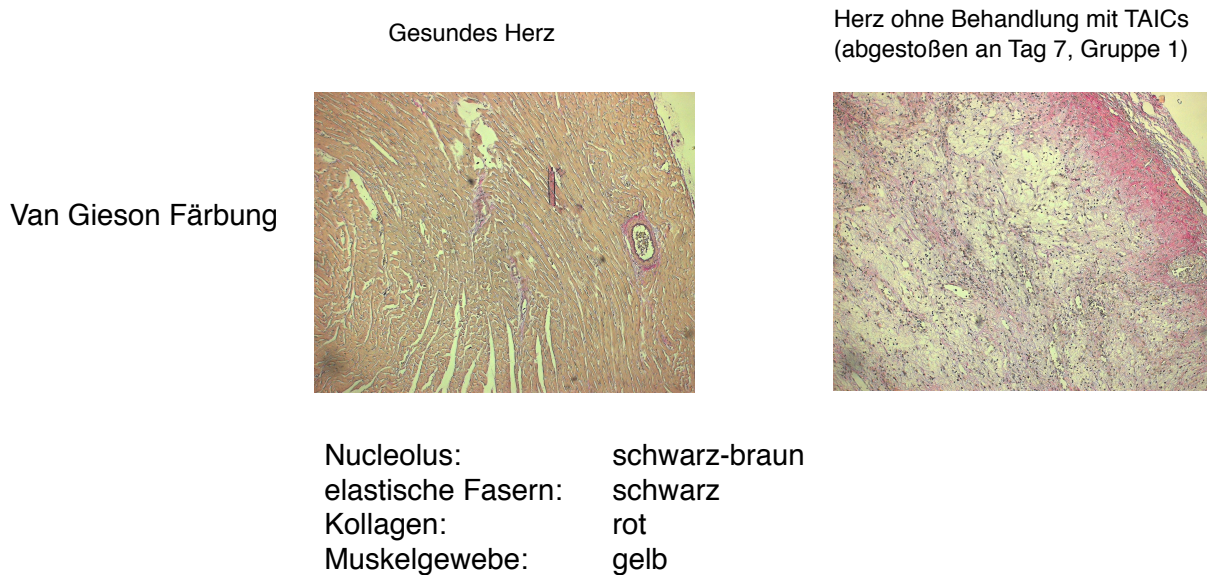


Abb. 4-3: Van Gieson Färbung für Bindegewebe und Muskulatur zur Darstellung der Zellinfiltration im abgestoßenem Präparat

4.4. Funktionalität des Transplantats

Ohne jedwede vorangegangene Behandlung vor der Transplantation konnten die erste klinische Beeinträchtigungen im Durchschnitt nach 8,8 Tagen beobachtet werden. Diese Disfunktionen manifestierten sich durch beginnende Verlangsamung der Herzfrequenz und durch Verhärtung des Gewebes.

In den Gruppen, in denen die Tiere mit unterschiedlichen Dosen TAIC konditioniert wurden, konnten dieselben Effekte nach 7,5 und 9,2 Tag notiert werden. Somit konnten diesbezüglich keine signifikanten Unterschiede bezüglich der Herzfunktion zu diesen frühen Zeitpunkten festgestellt werden.

4.5. Entwicklung des Körpergewichts

Zur Beurteilung des klinischen Studienverlaufs erfolgte täglich die Bestimmung der Gewichte aller Versuchstiere. Da allerdings die Einzelgewichte der Tiere innerhalb und zwischen den Gruppen stark variierten, besaßen diese Werte nur wenig Aussagekraft. Aus diesem Grund wurde das relative Körpergewicht festgelegt, welches die Tiere am Tag (Tx) der Transplantation hatten.

Alle Tiere in jeder der Gruppen konnten über den Beobachtungszeitraum (bis zu 100 Tagen) an Gewicht zulegen, ohne dass hierbei signifikante Unterschiede zu dokumentieren waren. Insofern ist hier bemerkenswert, dass die Kontrolle keine Unterschiede zur syngenen Kontrolle ohne Transplantatabstoßung zeigte.

4.6. Akzeptanz des Transplantats nach dem Durchlaufen von Abstoßungskrisen

Wie zuvor dargestellt, wurde eine Methode entwickelt, die eine Bewertung der Qualität der Transplantatakzeptanz nicht allein nur anhand des vorhandenen Herzschlags erlaubt. Mit ihrer Hilfe konnte festgestellt werden, dass alle Transplantate eine funktionell Krise durchliefen, bevor sie angenommen wurden. Beim Vergleich der jeweiligen Zeitpunkte, zu denen die funktionellen Krisen einsetzen, ergab sich kein signifikanter Unterschied zwischen toleranten und abstoßenden Tieren.

Die funktionellen Krisen dauerten im Schnitt 15-20 Tage. Während dieser Zeit sank die Qualität des Herzschlags zum Teil dramatisch ab, manchmal von ++++ auf + nach dem angewendeten Bewertungssystem. Sobald die Krisen überwunden waren, fanden die Transplantate ohne weiteres Eingreifen zu ihrer ursprünglichen Funktionalität zurück.

Zwar konnten auch weitere Abstoßungskrisen beobachtet werden, die aber keine signifikanten Unterschiede zum Ausgangsbefund aufwiesen.

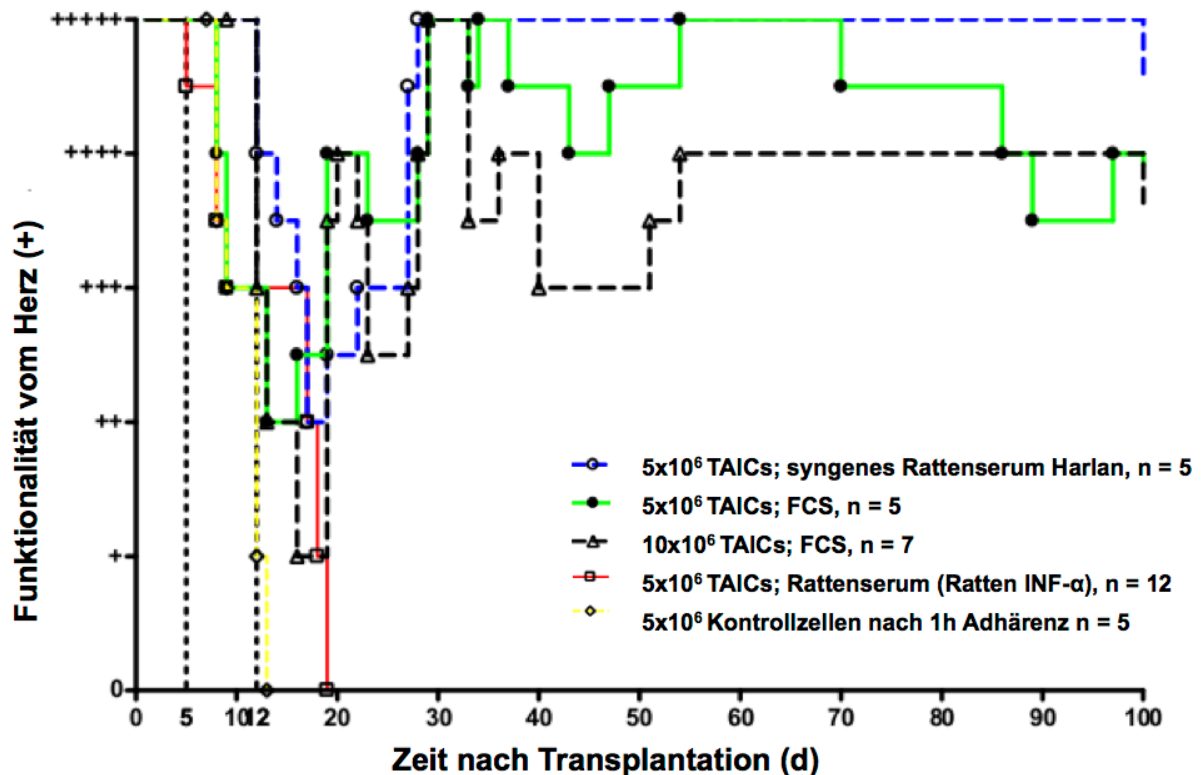


Abb. 4-4: Dargestellt ist die Funktionalität der Herztransplantate anhand des beschriebenen Bewertungssystems (ohne syngene Kontrollgruppe).

4.7. Expression von FoxP3 in peripheren Blut-Lymphozyten

Auf der Suche nach einem non-invasiven Maß für die mögliche Akzeptanz oder Abstoßung des Transplantats, wurde der prozentuale Anteil an regulatorischen Zellen im peripheren Blut der Tiere bestimmt. Hier konnte ein statistisch signifikanter Unterschied im durchschnittlichen Vorkommen regulatorischer Zellen zwischen den Kontrolltieren, die ihre Transplantate abstießen, und den Tieren, die mit TAIC behandelt wurden, gefunden werden ($p=0,0021$). Auch ergab sich ein Unterschied beim Vergleich von Tieren der Kontrollgruppe und jenen, die trotz TAIC Behandlung ebenfalls ihr Transplantat nicht annahmen ($p=0,0387$).

Dem gegenüber konnten keine statistisch signifikanten Unterschiede bei dem Vergleich zwischen TAICs behandelten Tieren mit Abstoßung zu TAICs behandelten Tieren ohne Tx- Abstoßung festgestellt werden ($p=0,7050$).

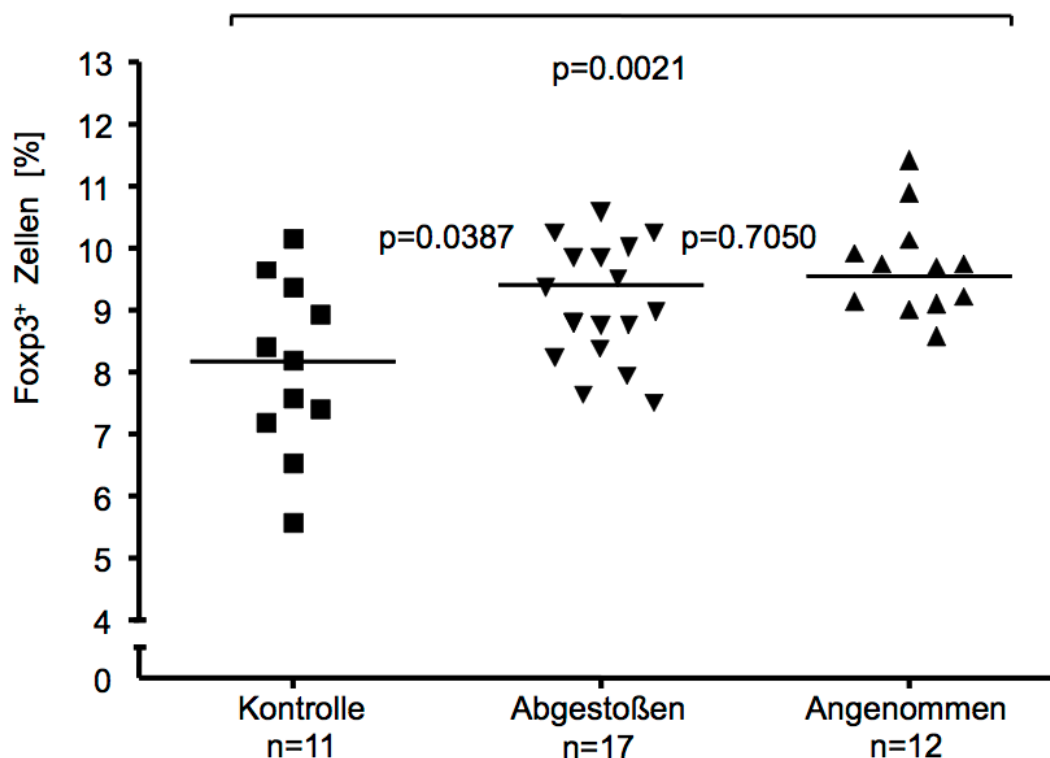


Abb. 4-5: Dargestellt ist der prozentuale Anteil der Fox P3⁺ Zellen in Lymphozyten im peripheren Blut

5. Diskussion

Die vollständige klinische Akzeptanz eines Organs ist nach wie vor das entscheidende Ziel bei zu transplantierenden Patienten mit Organversagen. Die ablaufenden Prozesse nach dem Anschluss des Organs an das Blutssystem des Empfängers konnten dabei noch nicht vollständig entschlüsselt werden. Die Erfolge bei Untersuchungen im Labor sind mehrheitlich nicht auf den Menschen übertragbar. Dennoch gibt es eine Zunahme an klinischen Untersuchungen, die funktionell stabile Transplantate ohne die Gabe von Immunsuppressiva dokumentieren konnten. Dies wird mittlerweile als „clinical operational tolerance“ (COT) bezeichnet und beschreibt den Zeitraum von einem Jahr, in dem keine Immunsuppressiva zugeführt werden müssen und keine histologischen Zeichen einer Abstoßung bestehen.

Unter normalen Umständen aber wird nach der Vaskularisierung des Spenderorgans die immunologische Abwehr aus angeborenem (u.a. Makrophagen, neutrophile Granulozyten und eosinophile Granulozyten) und erworbenem (u.a. T- und B- Zellen) Immunsystem des Empfängers aktiv. Speziell die T- Lymphozyten spielen bei der Abstoßungsreaktion eine zentrale Rolle.

5.1. Das Konzept der *infectious tolerance*

Der Begriff der *infectious tolerance* wurde erstmals von Hermann Waldmann beschrieben. Es handelt sich um das Phänomen, dass T- Zellen von einem toleranten Tier nach der Transplantation im Empfängertier naive T- Lymphozyten deaktivieren. In verschiedenen Tier- Studien wurden gezielt die Rezeptoren der CD4 und CD8 Antikörper blockiert. Als Resultat wurde festgestellt, dass für die Suppression maßgeblich CD4⁺/FoxP3⁺ T-Zellen verantwortlich sind.

Qin *et.al.* konnten ferner nachweisen, dass auf den Stimulus des Transplantats hin anerge CD4 T-Zellen aktiviert werden (Qin *et.al.*, 1989). Sie dokumentierten, dass sich die Toleranz nicht auf einmal für alle CD4⁺ T-Zellen einstellt, sondern sich über verschiedene Generationen regulatorischer T-Zellen ausbreitet (Qin *et.al.*, 1993). Diese immunmodulatorische Konditionierung von T-Zellen konnte beobachtet werden, solange das Spender- Antigen im System des Empfängers nachweisbar war. Dieser Prozess wird auch als *adoptive transfer* bezeichnet.

5.2. Das Vorkommen von Fox P3 als Toleranzmarker

Die Resultate von Foxp3⁺ Zellen im peripheren Blut können in einem ähnlichen Kontext gesehen werden, wie die der "passenger Leukozyten" (s.u.). Da ein signifikant höherer Anstieg von Foxp3⁺ Zellen bei Tieren mit Behandlung von TAIC zu verzeichnen ist, ergibt sich hier ein deutlicher Hinweis auf die regulatorischen Fähigkeiten von TAICs.

Dies allein dürfte allerdings kaum ausreichen, um eine Transplantatakzeptanz zu induzieren oder valide vorauszusagen.

Auf der Suche nach verlässlichen Indikatoren zeigten Viklicky *et.al.* (Viklicky *et. al.*, 2013), dass der Unterschied im FoxP3 zu 1,2-Mannosidase Expressionsprofil als Marker dient, da hier ein signifikanter Unterschied bei operativer Toleranz und chronischer Abstoßung beobachtet werden konnte. Ebenso stieg das Expressionsmuster vom Toag-1- Gen (tolerance-associated-gene-1) bei Patienten ohne Abstoßung beständig an.

5.3. Passenger Leukozyten

Der Begriff der „Passenger Leukocytes“ (Passagier Leukozyten) wurde 1968 von Jeffery *et. al.* geprägt, die nachwies, dass Leukozyten, die aus dem Spender stammen, eine Immunantwort des Empfängers auslösen können (Jeffery *et. al.*, 1976). Diese Zellen werden während der Operation vom Spender quasi als Passagiere auf den Empfänger übertragen, verringern dann zwar ihren Anteil, können aber im Blut oder in lymphatischen Organen noch nach Jahren nachgewiesen werden.

Ko *et al.* unterstrichen in einem Versuch die Wichtigkeit dieser Zellen, in dem sie die Transplantatakzeptanz durch das Entfernen von CD45⁺ passenger Leukozyten im Transplantat an Tag 0 aufhoben (Ko *et al.*, 1999).

In dieser Studie konnten deutliche Unterschiede in den Infiltraten zwischen den Transplantaten mit Behandlung von TAIC im Vergleich zur Kontrollgruppe festgestellt werden. Dies lässt den Rückschluss zu, dass es sich bei der Transplantatakzeptanz um einen aktiven Prozess handelt, der aus einer Balance zwischen dem Immunsystem des Empfängers und den Antigenen und passenger Leukozyten hervorgeht, die durch das Transplantat übertragen werden.

5.4. Transplantatakzeptanz ist ein aktiver Prozess

Bemerkenswert in der Versuchsreihe ist das Durchwandern von klinischen Abstoßungskrisen, die die Tiere durchlebten, bevor das Transplantat schlussendlich angenommen wird. An Tag 7 nach Transplantation zeigten sich sowohl in der Kontrollgruppe als auch bei allen anderen Tieren umfangreiche Infiltrate in den Transplantaten. Während diese Infiltrate bei der Kontrollgruppe zur massiven Zerstörung des Gewebes und schließlich zum Verlust des Transplantats führten, wurden bei den mit TAIC konditionierten Tieren die Infiltrate aufgelöst, die Krisen überwunden und die Transplantate final angenommen.

Das Phänomen der Abstoßungskrisen ist bereits aus anderen Nagetierversuchen bekannt. Ähnlich wie bei Tieren, die mit TAIC behandelt wurden, durchlebten die Tiere mit Lebertransplantaten verschiedene Abstoßungskrisen, bevor es zur spontanen Akzeptanz des Transplantats kam (Dresske et al., 2002). In dem Model der spontanen Akzeptanz konnte gezeigt werden, dass regulierende Prozesse von regulatorisch-aktiven Zellen getriggert wurden und damit in dem Konzept eine wichtige Rolle einnahmen, da Lebertransplantate von Inzuchtstämmen, die zuvor spontane Akzeptanz zeigten, sofort abgestoßen wurden, wenn man diese zu Beginn mit CD25 Antikörpern behandelte. Basierend auf den Kenntnissen TAICs haben die Fähigkeit Gewebe in Kulturmedien mit CD4⁺ und CD25⁺ anzureichern (Brem-Exner, 2008), gehen wir davon aus TAICs besitzen die Fähigkeit die Zellsituation im Transplantat in eine positive Richtung zu beeinflussen.

5.5. Einfluss der TAIC auf den Ablauf einer Abstoßungsreaktion

Im Rahmen dieser tierexperimentellen Untersuchung konnte gezeigt werden, dass Transplantatakzeptanz-induzierende Zellen einen positiven Einfluss auf die Langzeitüberlebensrate von soliden Transplantaten haben. Die Ergebnisse zeigten ein Dosisoptimum bei $5,0 \times 10^6$ TAIC/ Tier. Bei dieser Dosis konnten die längsten Transplantat-Überlebensrate bei gleichzeitig geringstem Körpergewichtsverlust verzeichnet werden. Im Rahmen der Versuchsreihe von *Hutchinson et al.* aktivierten derart modifizierte Monozyten aus dem Blut des Spenders bei prä- oder postoperativer Gabe T-Zellen im Blut des Empfängers in einer Weise, dass es zur Induktion von Transplantatakzeptanz kam.

5.6. Die Abhängigkeit vom Serum zur Herstellung der Zellkultur

Nach Ablauf der Versuchsreihen bleibt anhand dieser Experimente festzuhalten, dass eine große Abhängigkeit von der Qualität der verwendeten biologischen Materialien besteht. Besonders hervorzuheben sind hierbei die Seren, die bei der Reproduzierbarkeit der Zellen eingesetzt werden. Obwohl die Verwendung von Rattenserum initial gute Ergebnisse zeigte, liessen sie sich mit unterschiedlichen Mengen von unterschiedlichen Herstellern nicht bestätigen. Über die Gründe dazu lässt sich derzeit nur spekulieren.

Eine Hypothese ist, dass das Rattenserum verschiedene Zytokine und messenger Substanzen enthält, die für den Prozess der Bildung der TAICs unerlässlich ist. Diese Substanzen könnten für jede Spezies unterschiedlich sein. Allerdings kann der Effekt der Spezies- Spezifität aufgrund des möglichen Vorkommens dieser Substanzen im fetalen Kälberserum, welches in der Versuchsreihe eingesetzt wurde, auch in Frage gestellt werden. Eine andere mögliche Erklärung für die gravierenden Unterschiede der Ergebnisse der Experimente mit unterschiedlichen Mengen an Seren ist, dass in den unterschiedlichen Seren verschiedene Anteile oder Zusammensetzungen von Antikörpern vorhanden sein könnten. Ein bekanntes Phänomen belegt die Fähigkeit von Komplexen aus Antigenen und Antikörpern mit den $Fc\gamma$ - Rezeptor an Antigen-präsentierenden Zellen zu interagieren. Es ist ebenfalls belegt, dass verschiedene $Fc\gamma$ - Rezeptoren aktivierende ($Fc\gamma I$, III und IV) oder inhibitorische ($Fc\gamma R II$, spez. $Fc\gamma R II B$) Effekte haben (Boruchov, 2005), was die immunregulatorischen Möglichkeiten von Antigen- Antikörper- Komplexen aufzeigt. Daher wäre es nachvollziehbar, wenn verschiedene Mixturen von Antikörpern, die in den unterschiedlichen Seren enthalten sind, eine Bedeutung für den Ausgang der Experimente hätten.

6. Zusammenfassung

Die Transplantation von soliden Organen wurde Dank der Entwicklung hochwirksamer Immunsuppressiva im Laufe der letzten Jahre deutlich verbessert und ist sicherer geworden.

Dennoch zeigen sich vielfältige Probleme im Zusammenhang mit der Unterdrückung des Immunsystems, die geeignet sind, die Lebenserwartung des Empfängers zu reduzieren.

Zahlreiche tierexperimentelle und klinische Versuchsreihen zielen aus diesem Grund darauf ab, neue Methoden und Substanzen zu entwickeln, die zu einer Transplantatverlängerung und einer höheren Lebenserwartung des Empfängers beitragen können. Ziel ist es, einen Zustand der Nichtreaktivität gegenüber dem Transplantat zu erreichen, ohne dass dabei die Fähigkeit des Organismus beeinträchtigt wird, auf potentielle pathogene Mikroorganismen oder die maligne Transformation eigener Zellreihen immunologisch zu reagieren.

Gleichwohl sind noch nicht alle immunbiologischen Mechanismen abschließend verstanden, die bei der Übertragung von Fremdgewebe ablaufen.

Die vorliegende Arbeit untersucht die Wirksamkeit von Transplantatakzeptanz induzierenden Zellen (TAIC) monozytären Ursprungs im Rahmen der Abstoßungsreaktion nach heterotoper Herztransplantation im allogenen Rattenmodell.

Es konnte im Hinblick auf die pathomorphologischen und histopathologischen Veränderungen der Versuchstiere festgestellt werden, dass TAIC keinen negativen Einfluss im Sinne einer akzelerierten Abstoßung auf die Transplantate hatten.

Ferner zeigte sich ein Dosisoptimum bei $5,0 \times 10^6$ TAIC/ Tier, welche in fötalem Kälberserum (FCS) kultiviert wurden. Festgehalten werden konnte auch, dass TAICs, die in unterschiedlichen Seren produziert wurden, auch unterschiedliche tolerogene Eigenschaften zeigten.

Im Sinne der klinischen Herzfunktionsprüfung durchlebten alle Tiere Abstoßungskrisen, die sich im histopathologischen Bild durch die Invasion von Lymphozyten und natürlichen Killerzellen darstellten. Allerdings konnten signifikant mehr Makrophagen und Monozyten in abgestoßenen Transplantaten nachgewiesen werden, als in

solchen, die mit TAICs behandelt und toleriert wurden. Zusätzlich fanden sich auch weniger Granulozyten in mit TAICs behandelten Transplantaten.

Somit kann festgehalten werden, dass TAICs einen positiven Einfluss auf die Transplantatverlängerung ausüben können. Als möglicher Mechanismus kann die Induktion regulatorischer T- Zellen angenommen werden, die im peripheren Blut toleranter Tiere im Vergleich zur Kontrollgruppe signifikant erhöht war.

Literaturverzeichnis

Attwood J.T. und **Munn D.H.:** Macrophage suppression of T cell activation: a potential mechanism of peripheral tolerance. *Int Rev Immunol.* 1999; 18(5-6):515-25.

Azuma T., Sarnacki S., Revillon Y., Calise D. Goulet O., Brousse N. und Ceref-Bensussan N.: Study of graft Infiltrating cells in a rejection model of small bowel transplantation in rats. *Transplant Proc.* 1994; 26(3):1523-1524.

Billingham R.E.: The biology of graft-versus-host reactions. *Harvey Lect.* 1966-1967;62:21-78.

Bolton E.M., Gracie J.A., Briggs J.D., Kampinga J., und Bradley J.A.: Cellular requirements for renal allograft rejection in the athymic nude rat. *J Exp Med* 1989; 169:1931-1946.

Boruchov A.M., Heller G., Veri M.C., Bonvini E., Ravetch J.V. und Young J.W.: Activating and inhibitory IgG Fc receptors on human DCs mediate opposing functions. *J Clin Invest.* 2005; 115(10):2914-23

Brem-Exner B.G., Sattler C., Hutchinson J.A., Koehl G.E., Kronenberg K., Farkas S., Inoue S., Blank C., Knechtle S.J., Schlitt H.J., Fändrich F. und Geissler EK.: Macrophages driven to a novel state of activation have anti-inflammatory properties in mice. *J Immunol.* 2008; 180(1):335-49.

Bunnag S, Allanach K, Jhangr GS, Sis B, Einecke G, Mengel M, Mueller TF und Halloran PF: FOXP3 expression in human kidney transplant biopsies is associated with rejection and time post transplant but not with favorable outcomes. *Am J Transplant.* 2008; 8(7):1423-33.

Campbell P.M. und Halloran P.F.: Antibody mediated rejection. In: *Solid Organ Transplant rejection.* Solez K., Racusen L.C. Billingham M.E. (Hrsg.). Dekker (Edetion), New York, Basel, Hong Kong, 1996

Carpenter G.B., d`Apice A.J. und Abbas A.K.: The role of antibodies in the rejection and enhancement of organ allografts. *Adv Immunol* 1976; 22:1-65

Colvin R.B.: General features of the allograft response. In Colvin, R.B. (Hrsg.): *Diagnostic Immunopathology*. Raven Press, New York 1995

Cordell J.L., Falini B., Erber W.N., Gosh A.K., Abdulaziz Z., Mac Donald S., Pulford K.A.F. Stein H. und Mason D.Y.: Immunoenzymatic labeling of monoclonal antibodies using immune complexes of alkaline phosphatase and monoclal anti-alkaline phosphatase (APAAP complexes). *J Histochem Cytochem* 1984; 32:219-229

Dausset J.: Iso- leuco- anticorps, *Acta Haemat*, 1958; 20: 156-166.

De Breuin R.W.F., Heinemann E. und Marquet R.L.: Small bowel Transplantation: an overview. *Transplant Int* 1994; 7:47-61

Deltz E.: Die allogene Dünndarmtransplantation. Bd. 1., 1. Aufl. Zuckerschwerdt, München, S.1 (1981)

Dijkstra C.D., Döpp E.A., Joling P. und Kraal G.: The heterogeneity of mononuclear phagocytes in lymphoid organs: distinct macrophage subpopulations in the rat recognized by monoclonal antibodies ED1, ED2 and ED3. *Immunology*. 1985; 54(3): 589-99

Disney A.P.: Complications of immunosuppressive therapy. 1: Neoplasia and infection. *Med J Aust*. 1992; 157: 262-264.

Dresske B., Lin X., Huang D.S., Zhou X. und Fändrich F.: Spontaneous tolerance: experience with the rat liver transplant model. *Hum Immunol*. 2002; 63(10):853-61.

Fändrich F., Lin X., Chai G.X., Schulze M., Ganten D., Bader M., Holle J., Huang D.S., Parwaresch R., Zavazava N. und Binas B.: Preimplantation-stage stem cells induce long-term allogeneic graft acceptance without supplementary host conditioning. *Nat Med.* 2002; 8(2):171-8.

Fändrich F.: Zur immunregulatorischen Bedeutung natürlicher Killerzellen bei der Transplantat-gegen-Wirt Erkrankung (GvHD). Habilitationsschrift, Kiel (1996a)

Filipovich A.H., Weisdorf D., Pavletic S., Socie G., Wingars J.R., Lee S.J., Martin P., Chien J., Przepiorka D., Couriel D., Cowen E.W., Dinndorf P., Farrell A., Hartzman R., Henslee-Downey J., Jacobsohn D., McDonald G., Mittleman B., Rizzo J.D., Robinson M., Schubert M., Schultz K., Shulman H., Turner M., Vogelsang G. und Flowers M.E.D.: National Institutes of Health Consensus Development Project on Criteria for Clinical Trials in Chronic Graft-versus-Host Disease: I. Diagnosis and Staging Working Group Report. *Biology of Blood and Marrow Transplantation*, 2005; 11:945-955

Fritsch S. und Ledderose G.: Extrakorporale Photopherese als Therapie der akuten steroidrefraktären Graft-versus-Host Disease nach allogener hämatopoetischer Zelltransplantation, München, Univ., Diss., 2010

Gordon S. und Taylor P.R.: Monocyte and macrophage heterogeneity. *Nat Rev Immunol.* 2005; 5(12):953-64.

Hell K., Gundlach M., Schmidt P., Hansmann M.L., Schroeder P. und Deltz E.: Immunohistochemical analysis of immunocompetent cells involved in small-bowel rejection in the rat. *Transplant Proc* 1990; 22(1):76-77.

Hutchinson J.A., Brem-Exner B.G., Riquelme P., Roelen D., Schulze M., Ivens K., Grabensee B., Witzke O., Philipp T., Renders L., Humpe A., Sotnikova A., Matthäi M., Heumann A., Gövert F., Schulte T., Kabelitz D., Claas F.H., Geissler E.K., Kundendorf U. und Fändrich F.: A Cell based approach to the Minimisation of Immunosuppression in Kidney Transplantation. *Transpl Int.* 2008; 21(8):742-54.

Hutchinson J.A., Riquelme P., Brem-Exner B.G., Schulze M., Matthäi M., Renders L., Kunzendorf U., Geissler E.K. und Fändrich F.: Transplant Acceptance-inducing Cells as an Immune-conditioning Therapy in Renal Transplantation. *Transpl Int.* 2008; 21(8):728-41.

Inoue F., Nagayoshi S., Ota S., Islam M.E., Tonou-Fujimori N., Odaira Y., Kawakami K. und Yamasu K.: Genomic organization, alternative splicing, and multiple regulatory regions of the zebrafish *fgf8* gene. *Dev. Growth Differ.* 2006 48(7): 447-462

Jacobsohn D.A. und Vogelsang G.B.: Acute graft versus host disease. *Orphanet J Rare Dis.* 2007; 2: 35

Jeffery JR, Guttman RD und Charpentier B: In vitro monitoring of cadaver kidney donor pretreatment by lymphocyte culture, *Clin Exp Immunol.* 1976; 25(3): 437–441.

Kang SM., Tang Q. und Bluestone JA.: CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells in transplantation: progress, challenges and prospects. *Am J Transplant.* 2007; 7(6): 1457-63

Karczewski J, Karczewski M und Wiktorowicz K: Possible defect of T suppressor cell subpopulation in patients with kidney acute rejection. *Transplant Proc.* 2010; 42(10):4538-9.

Ko S., Deiwick A., Jäger M.D., Dinkel A., Rohde F., Fischer R., Tsui T.Y., Rittmann K.L., Wonigeit K. und Schlitt H.J.: The functional relevance of passenger leukocytes and microchimerism for heart allograft acceptance in the rat. *Nat Med.* 1999; 5(11):1292-7

Kretschmer, K, Apostolou I, Hawiner D, Khazaie K, Nussenzweig MC und von Boehmer H: Inducing and expanding regulatory T cell populations by foreign antigen, *Nat Immunol.* 2005; 6(12): 1219-27.

Langrehr J.M., Banner B., Lee K.K.W. und Schraut W.H.: Clinical course, morphology and treatment of chronically rejecting small bowel allografts. Transplantation 1993; 55(2):241- 250

Lorenz E., Uphoff D., Reid T.R. und Shelton E.: Modification of irradiation injury in mice and guinea pigs by bone marrow injection. J Natl Cancer Inst. 1951;12(1): 197-201

Mc Whinnie D.L., Thompson J.F., Taylor H.M., Chapman J.R., Bolton E.M., Carter N.P., Wood R.F.M. und Morris P.J.: Morphometric analysis of cellular infiltration assessed by monoclonal antibody labeling in sequential human renal allograft biopsies. Transplantation 1986; 42(4):352-358.

Min D.I. und Monaco A.P.: Complications associated with immunosuppressive therapy and their management. Pharmacology. 1991; 11: 119-125.

Müller- Ruchholtz W.: Grundlagen der Immunbiologie. In Lehrbuch der medizinischen Mikrobiologie, 5.Aufl. H.J. Otte und H. Brandis (Hrsg.). G.- Fischer Verlag, Stuttgart: S40.77, 1984

Nemlander A., Saksela E. und Häyry P.: Are „natural killer“ cells involved in allograft rejection? Eur J Immunol 1983; 13(4):348-50

Ono K und Lindsey ES.: Improved technique of heart transplantation in rats. J Thorac Cardiovasc Surg. (1969) 57: 225-229

Paul E.W. und Seder R.A.: Lymphocyte responses and cytokines. Cell 76, 1994; 241-251.

Polfliet M.M., Fabriek B.O., Daniëls W.P., Dijkstra C.D. und van den Berg T.K.: The rat macrophage scavenger receptor CD163: expression, regulation and role in inflammatory mediator production. Immunobiology. 2006; 211(6-8):419-25

Qin S., Cobbold S.P., Benjamin R. und Waldmann H.: Induction of classical transplantation tolerance in the adult. *J Exp Med.* 1989; 169(3):779

Qin S., Cobbold S.P., Pope H., Elliot J., Kioussis D., Davies J. und Waldmann H.: „Infectious“ transplantation tolerance. *Science* 1993; 259(5097):974

Roitt I., Male D. und Brostoff J.: *Immunology.* Mosby- Year Book, 5. Aufl., S.1, 1998

Sabatine M.S. und Auchincloss H.: Cell- mediated rejection. In: *Solid Organ Transplantat Rejection.* Solez K., Racusen L.C. Billingham M.E. (Hrsg.). Dekker (Edition), New York, Basel, Hong Kong, 1996

Swinnen L.J.: Transplant immunosuppression- related malignant lymphomas. *Cancer treat Res.* 1993; 66: 95-110.

Te Velde A.: Interactions between cytokines and monocyte/ macrophages. In: *Bruojnzeel- Koomen, Hoefsmit (Hrsg.): The Handbook of Immunopharmacology.* Academic Press Londo, 1994

Theobald, M.: Predicting graft- versus- host disease. *Curr Opin Immunol* 7, 1995a; 649-655

Theobald, M.: Allorecognition and graft- versus- host disease. *Bone Marrow Transplant* 15, 1995b; 489-498

Thompson A.W. und Robbins P.D.: Tolerogenic dendritic cells for autoimmune disease and transplantation. *Ann Rheum Dis.* 2008; 67 Suppl 3:iii90-6

Trienchieri G.: Biology of natural killer cells. *Adv Immunol* 1989; 47:187-376

Viklicky O., Krystufkova E., Brabcova I., Sekerova A., Wohlfahrt P., Hribova P., Wohlfahrtova M., Sawitzki B., Slatinska J, Stritz I.,Volk H-D. und Reinke P.: B-

cell-Related Biomarkers of Tolerance are Up-Regulated in Rejection-Free Kidney Transplant Recipients. *Transplantation* 2013; 95: 148Y154

Villard J.: The Role of Natural Killer Cells in Human Solid Organ and Tissue Transplantation. *J Innate Immun.* 2011; 3(4):395-402

Van Bekkum D.W. und **de Fries M.J.:** Radiation Chimaeras. London: Logo Press; 1967.

Youngblood B, Davis CW und **Ahmed R:** Making memories that last a lifetime: heritable functions of self-renewing memory CD8 T cells. *Int Immunol.* 2010; 22(10): 797-803.

8. Glossar verwendeter Begriffe und Abkürzungen

APAAP	= Alkalische Phosphatase anti- Alkalische Phosphatase
APZ	= Antigen präsentierende Zelle(n)
B-Zelle	= B-Lymphozyten
CD	= Membranproteine der Lymphozytenoberfläche (engl.: cluster of differentiation)
FCS	= fötales kälber Serum (engl.: fetal calf serum)
Fox- P3	= Forhead- Box- Protein P3
GvHD	= Transplantat gegen Wirt Erkrankung (engl.: graft versus host disease)
H.E.	= Hämatoxillin Eosin (Paraffinfärbung)
HLA	= humaner Leukozyten Antigen Komplex (= MHC)
IL	= Interleukin
INF	= Interferon
MHC	= Haupthistokompatibilitätskomplex (engl.: major histocompatibility complex)
NKZ	= natürliche Killerzelle(n)
RT1	= Haupthistokompatibilitätskomplex der Ratte
TAIC	= Transplantataktzeptanz induzierende Zelle(n) (engl.: transplant acceptance inducing cells)
TNF	= Tumor Nekrose Faktor
Treg	= regulatorische T- Zelle(n)
T-Zelle	= T- Lyphozyt (engl.: CTL = cytotoxic T-lymphocyte)
ÜLZ	= Überlebenszeit

9. Danksagung

Für die Überlassung des Themas und das Anleiten zum wissenschaftlichen Arbeiten danke ich besonders Herrn Professor Dr. med. F. Fändrich. Des Weiteren möchte ich mich für das freundschaftliche Zusammenarbeiten, die ständigen Inspirationen und die Unterstützung herzlich bedanken.

Herrn Dr. H. Lange und den Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern der Klinik für angewandte Zelltherapie der Christian Albrechts Universität zu Kiel danke ich für deren unermüdlichen Einsatz im Rahmen der tierexperimentellen Versuche.

Herrn Dr. P. Roudeniklis und meinem Vater T.B. Stehling möchte ich für die kritische Durchsicht und die wertvollen Anregungen bei dieser Arbeit danken.

Ein ganz persönlicher Dank gilt meiner Familie. Allen voran meiner Schwester Cecilia Stehling und meiner Tante Dr. Julia Witthöft. Als große Stützen meines Lebens haben sie auch an der Umsetzung dieser Arbeit maßgeblichen Anteil.

10. Lebenslauf

Persönliche Daten

Name: Philip Albrecht Stehling
Familienstand: ledig
Staatsangehörigkeit: Deutsch
Geburtsdatum: 13.09.1982 in Eutin
Mutter: Anne- Dore Stehling, *29.11.1952 †22.08.2011
Vater: Thomas Bernd Stehling, *05.09.1950
Schwester: Cecilia Christina Stehling, *11.05.1981

SCHULISCHER LEBENS LAUF

1989 - 1993 Grundsschule Aumühle
1993 - 1996 Gymnasium Wentorf
1996 - 1999 Realschule Aumühle

2003 - 2004 Fachoberschule
2004 - 2005 Berufsoberschule

Schulabschluss

Juni 1999 Realschulabschluss
Juni 2005 allgemeine Hochschulreife

Studium

Oktober 2005 – April 2007 Studium der Zahnmedizin an der Universität Hamburg
April 2007 - Dezember 2011 Studium der Zahnmedizin an der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel