

Aus der Herzchirurgischen Klinik und Poliklinik
Campus Großhadern, Klinikum der Universität München
Direktor: Prof. Dr. med. Christian M. Hagl
und der
Universitätsklinik für Viszeral-, Transplantations- und Thoraxchirurgie
der Medizinischen Universität Innsbruck
Direktor (bis 2014): Prof. Dr. med. Johann Pratschke

**Einfluss und potentielle Wirkmechanismen einer Spendersplenozyten-Gabe
auf die akute Abstoßung im heterotopen, cervikalen
Herztransplantationsmodell der Maus**

Dissertation
zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin
an der Medizinischen Fakultät der
Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von
Dr. med. univ. Moritz von Scheidt genannt Weschpfennig

aus
Augsburg

2016

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter: Prof. Dr. med. Christian Hagl

Mitberichterstatter: Priv. Doz. Dr. med. Joachim Andrassy

Priv. Doz. Dr. med. Andreas Bauer

Priv. Doz. Dr. med. Gerald Schmid

Dekan: Prof. Dr. med. dent. Reinhard HICKEL

Tag der mündlichen Prüfung: 27.10.2016

Inhaltsverzeichnis

1. Abkürzungsverzeichnis	5
2. Einleitung.....	7
2.1 Organtransplantation	7
2.2 Immunsystem	8
2.3 Abstoßung	9
2.4 Immunsuppressive Therapie bei Herztransplantation.....	13
2.5 Toleranzinduktion.....	15
2.6 Zentrale und periphere Toleranzinduktion	17
2.7 Bedeutung an der Abstoßung beteiligter Mediatoren.....	17
3. Fragestellung	22
4. Material und Methoden	23
4.1 Verwendete Tiere.....	23
4.2 Heterotopes Herztransplantationsmodell der Maus	23
4.3 Transplantationsmodell.....	26
4.3.1 Narkose und Analgesie	27
4.3.2 Heterotope cervikale Herztransplantation – Empfängervorbereitung	27
4.3.3 Heterotope cervikale Herztransplantation – Transplantatexplantation.....	29
4.3.4 Heterotope cervikale Herztransplantation – Transplantatanschluss.....	30
4.4 Isolierung der Spendersplenozyten.....	31
4.4.1 Entnahme der Spendermilz.....	31
4.4.2 Herstellung der Zellsuspension	31
4.4.3 Aktivierung und Inkubation	33
4.4.4 Herstellung des DST-Applikats	33
4.4.5 Zellzählung und Vitalitätstest	34
4.4.6 Durchflusszytometrie und Gatingstrategie	34
4.5 Gruppenübersicht.....	35
4.6 Untersuchungszeitpunkt	35

4.7 Histologische Aufarbeitung	36
4.8 Real-Time-quantitative-PCR	37
4.8.1 mRNA-Aufbereitung	38
4.8.2 Quantitative RNA-Bestimmung	39
4.8.3 cDNA-Synthese	40
5. Statistische Auswertung	41
6. Ergebnisse.....	42
6.1 Prozedurale Ergebnisse des heterotopen Herztransplantationsmodell	42
6.2 Zellzahl und Vitalität der Spendersplenozyten.....	42
6.3 FACS-Analyse	43
6.4 Transplantatüberleben.....	44
6.5 Histologie.....	45
6.6 Quantitative q-PCR-Ergebnisse	47
7. Diskussion.....	61
7.1 Prozedurale Ergebnisse des heterotopen Herztransplantationsmodell	61
7.2 Zellzahl und Vitalität der Spendersplenozyten.....	61
7.3 FACS-Analyse	61
7.4 Transplantatüberleben.....	69
7.5 Histologie.....	70
7.6 Mediatoren.....	70
8. Zusammenfassung.....	73
9. Literaturverzeichnis.....	75
Danksagung	81
Lebenslauf	Fehler! Textmarke nicht definiert.
Eidesstattliche Versicherung	82

1. Abkürzungsverzeichnis

*	signifikant ($p < 0.05$)
**	sehr signifikant ($p < 0.01$)
***	hoch signifikant ($p < 0.001$)
A.	Arteria
AA	Aminosäure
Aa.	Arteriae
AP-1	Activator-Protein-1
APC	Antigenpräsentierende Zelle
ATGAM	Anti-Thymozyten-Globulin
Bach1	BTB and CNC homology 1
ConA	ConcanavalinA
CoPP	Cobalt-Proto-Porphyrin
CTL	Cytotoxic-Lymphocyte
CTRL	Kontrolle
CXCL	Chemokinligand
CXCR	Chemokinrezeptor
DC	Dendritische Zelle
DSO	Deutsche Stiftung für Organtransplantation
DST	Donor-Specific-Transfusion
FCS	Fetal-Calf-Serum
Flt3	FMS-related-tyrosine-kinase-3
FoxP3	Forkhead-Box-Protein-P3
HLA	Human-Leucocyte-Antigen
HO-1	Hämoxygenase-1
HSP	Heat-Shock-Protein
IDO	Indolamin-2,3-Dioxygenase
IFN γ	Interferon-Gamma
IL	Interleukin
ISCH	Ischämie

ISHLT	International-Society-of-Heart-and-Lung-Transplantation
KO	Knockout
Kyn	Kynurenin
MAPK	Mitogen-Activated-Protein-Kinase
MDB	Membrane-Desalting-Buffer
mIL-6R	membrangebundener-Interleukin-6-Rezeptor
MHC	Major-Histocompatibility-Complex
MMF	Mycophenolat-Mofetil
mTOR	mammalian-Target-Of-Rapamycin
N.	Nervus
NF-κB	Nuclear-Factor-Kappa-B
Nrf2	Nuclear-factor-E2-related-factor-2
OKT3	Muromonab-CD3
p38-MAPK	p38-Mitogen-Activated-Protein-Kinase
PAF	Platelet-Activating-Factor
PI3K	Phosphatidyl-Inositid-3-Kinase
pTreg	peripheral regulatory T-Cell
RESV	Resveratrol
rpm	round per minute
sIL-6R	löslicher-Interleukin-6-Rezeptor
Smad	mothers against decapentaplegic homolog
STAT	Signal-Transducer-and-Activator-of-Transcription
TGFβ	Tumor-Growth-Factor-Beta
TGFβ-R	Tumor-Growth-Factor-Beta-Receptor
TLR4	Toll-Like-Receptor-4
TNFα	Tumor-Necrosis-Factor-Alpha
TNFR	Tumor-Necrosis-Factor-Receptor
Treg	regulatory T-Cell
tTreg	thymical regulatory T-Cell
V.	Vena
Vv.	Venae

2. Einleitung

2.1 Organtransplantation

Die Organtransplantation ist heutzutage Goldstandard, um den Funktionsverlust lebensnotwendiger Organe zu kompensieren. In Deutschland werden im Durchschnitt täglich zwölf Organe transplantiert. Der Jahresbericht der „Deutschen Stiftung für Organtransplantation“ (DSO) berichtet für das Jahr 2012 von insgesamt 4555 transplantierten Organen an deutschen Transplantationszentren. Es handelte sich dabei um 2586 Nieren, 1097 Lebern, 359 Lungen, 346 Herzen, 161 Pankreas-, sowie sechs Dünndarmtransplantate. Der Bedarf an Spenderorganen für derzeit rund 12.000 gelistete Patienten kann nicht gedeckt werden. Die Vergabe erfolgt, entsprechend den gültigen Transplantationsgesetz-Richtlinien, nach Dringlichkeit und Aussicht auf Erfolg (DSO Jahresbericht 2012).

Die Transplantationsmedizin hat besonders in der zweiten Hälfte des 20. Jahrhunderts wichtige chirurgische und immunologische Fortschritte am Menschen erzielen können. 1967 führte Christian Barnard erstmalig eine erfolgreiche Herztransplantation am Menschen durch (vgl. Abb. 1).

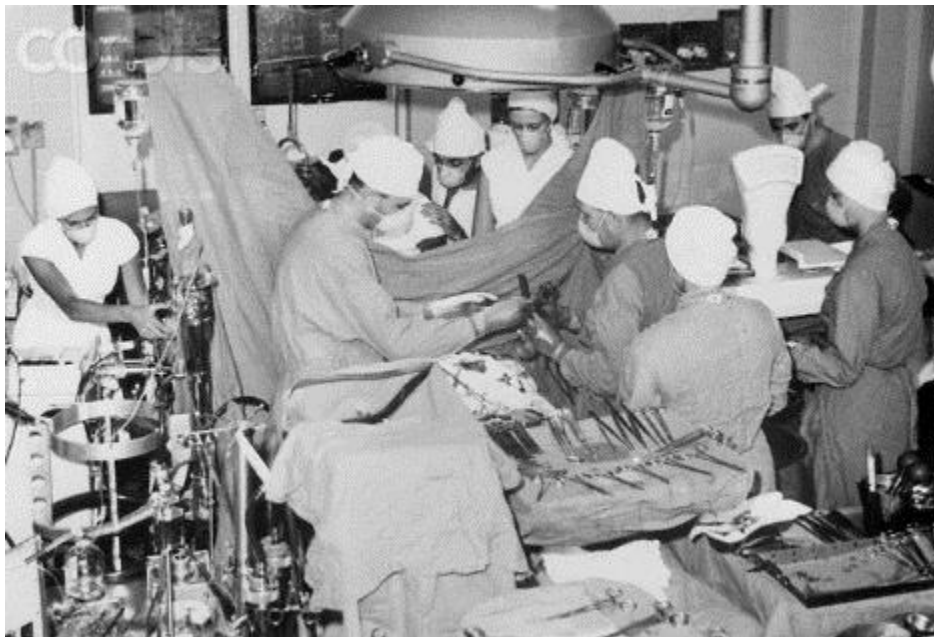


Abbildung 1: Offene Herztransplantation am Menschen im Dezember 1967 - Cape Town, Südafrika. Das Bild zeigt das chirurgische Team um Dr. Barnard im Moment des Einbringens des Spenderherzens (www.corbisimages.com).

Das postoperative Überleben war jedoch nicht zufriedenstellend. Louis Washkansky erlag 18 Tage nach seiner Herztransplantation einer Pneumonie (Barnard 1967). Abstoßungsreaktionen, notwendige Immunsuppression und Infektionen sind bis heute die limitierenden Probleme der Transplantationsmedizin geblieben.

2.2 Immunsystem

Das Immunsystem des Menschen stellt ein hoch komplexes, eng ineinander greifendes Netzwerk unterschiedlicher Komponenten dar (Parkin and Cohen 2001). Ziel ist es, eine Schutzfunktion gegenüber körperfremden Strukturen für den gesamten Organismus zu gewährleisten. Das Immunsystem kann in ein angeborenes (innate) und ein adaptives (acquired) Immunsystem unterteilt werden. Während das angeborene Immunsystem von einer unspezifischen, dafür aber unmittelbaren Immunantwort gekennzeichnet ist, zeigt das adaptive Immunsystem bei Erstkontakt eine langsam ablaufende Immunantwort. Diese jedoch ist spezifisch und ermöglicht einmal erkannte Pathogene zukünftig umgehend zu bekämpfen.

Das angeborene Immunsystem bildet die Basis der Abwehrmechanismen. Dazu zählen neutrophile, basophile und eosinophile Granulozyten, dendritische Zellen, Mastzellen, Makrophagen, Natürliche-Killer-Zellen sowie die Komplementfaktoren. Das adaptive Immunsystem kann in eine T- und eine B-Zell vermittelte Immunantwort unterteilt werden. B-Lymphozyten sind Teil der „humoral immunity“. Dazu gehören B-Zell-Aktivierung, Antikörperbildung, Zytokinausschüttung und die Bildung von B-Gedächtniszellen. T-Lymphozyten gehören mit ihren verschiedenen Untergruppen der „cell-mediated immunity“ an. Sie beinhaltet die Aktivierung von antigenpräsentierenden Phagozyten, antigenspezifischen zytotoxischen T-Zellen, sowie die Freisetzung verschiedener Zytokine (Dranoff 2004).

Immunreaktionen werden vor allem in den lymphatischen Organen initiiert. Ob eine zelluläre oder humorale Immunantwort überwiegt, ist vom Zytokin-Milieu abhängig. Je nach Zytokinstimulation differenzieren sich naive T-Helferzellen und fördern vermehrt zellvermittelte oder humorale Immunreaktion. Erfolgt eine Stimulation mit Interleukin 12 (IL-12), so entwickeln sich naive T-Helferzellen zu Th1-Zellen. Th1-Zellen sezernieren anschließend Interferon-Gamma (IFN γ), fördern eine zellvermittelte Immunreaktion und führen zur akuten zellulären Abstoßung von Transplantaten. Eine von IL-4 stimulierte naive T-Helfer-Zelle differenziert sich zur Th2-Zelle. Th2-Zellen sezernieren anschließend IL-10. Dies führt zur humoralen Antwort des Immunsystems – der antikörpervermittelten B-Zell-Antwort. Während IFN γ die zellvermittelte Th1-Antwort fördert, wird die Th2-Antwort gehemmt. IL-10 hemmt hingegen die Differenzierung von Th1-Zellen und fördert die humorale Th2-Antwort (vgl. Abb. 2) (Holzknecht and Platt 2000).

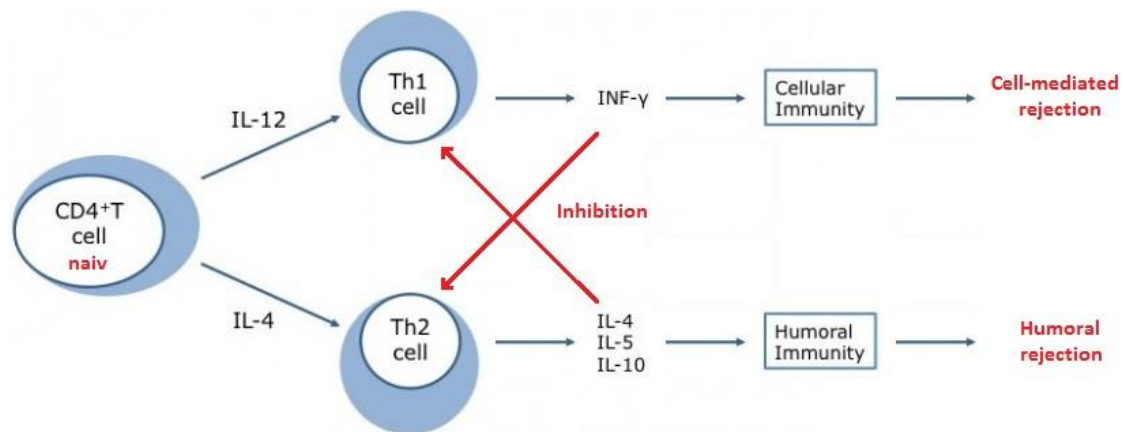


Abbildung 2: Differenzierung naiver T-Helferzellen: IL-12 und $IFN\gamma$ fördern die zellvermittelte Abstoßung (Th1-abhängig). IL-4 und IL-10 fördern die humorale Abstoßung (Th2-vermittelt). $IFN\gamma$ und z.B. IL-10 sind befähigt hemmend auf die Differenzierung von T-Helferzellen des jeweilig anderen Weges der Immunantwort zu wirken. Modifiziert nach Holzknacht und Platt (Holzknacht and Platt 2000).

Initial kommt es bei der Transplantatabstoßung meist zu einer verstärkten Th1-Antwort. Unmittelbare Zytotoxizität durch Effektor-T-Zellen und Entzündungsprozesse schädigen das Transplantat. Nach einiger Zeit wird die Immunantwort durch immunregulatorische Zellen von Th1 zu Th2 verschoben, um durch überschießende Entzündungsreaktionen nicht den eigenen Organismus zu schädigen. Mit spenderspezifischen Antikörpern erfolgt anschließend eine gezielte Abstoßung (Moreau, Varey et al. 2013).

2.3 Abstoßung

Man unterteilt drei sich nach Zeitpunkt des Auftretens unterscheidende Formen der Abstoßung – hyperakute, akute und chronische Abstoßung. Die Mechanismen der Abstoßung sind komplex und daran beteiligte Faktoren vielfältig. T- und B-Zellen sind als Effektor-, Regulator- und Gedächtniszellen an der antigenspezifischen Abstoßung beteiligt. Endothelzellen, NK-Zellen, Makrophagen und Granulozyten sind Teil der unspezifischen Abwehr. Zusätzlich spielen Antikörper, Chemo- und Zytokine sowie verschiedene Komplementfaktoren bei Vorgängen der Abstoßung eine wichtige Rolle (Moreau, Varey et al. 2013). In dieser Arbeit ist die akute Abstoßung von zentraler Bedeutung, daher wird auf die hyperakute und chronische Abstoßung nicht näher eingegangen.

Die **akute Abstoßung** tritt sechs Tage bis drei Monate nach der Transplantation auf. Es wird dabei zwischen einem antigenspezifischen und einem antigen-unspezifischen (einem B- und einem T-Zell-vermittelten) Abstoßungsmechanismus unterschieden (der einzeln oder in Kombination auftreten kann). Das adaptierte Immunsystem agiert mit B-Lymphozyten auf humoralem Weg, indem antigenspezifische Antikörper produziert werden. Die zytotoxischen T-Lymphozyten infiltrieren das Transplantat und schädigen das vom Körper als fremd erkannte Gewebe auf zellulärer Ebene. Es

kommt dabei zu einer Entzündung des Endothels, des umgebenden Interstitium und parenchymalen Zellschäden (vgl. Abb. 3) (Chinen and Buckley 2010; Moreau, Varey et al. 2013). Parallel ist auch das angeborene Immunsystem aktiviert. Ob das angeborene Immunsystem dabei die akute Abstoßung verursacht, begünstigt oder lediglich ein Begleiteffekt ist, bleibt trotz Fortschritten im Verständnis der Signalwege des angeborenen Immunsystems bislang ungeklärt.

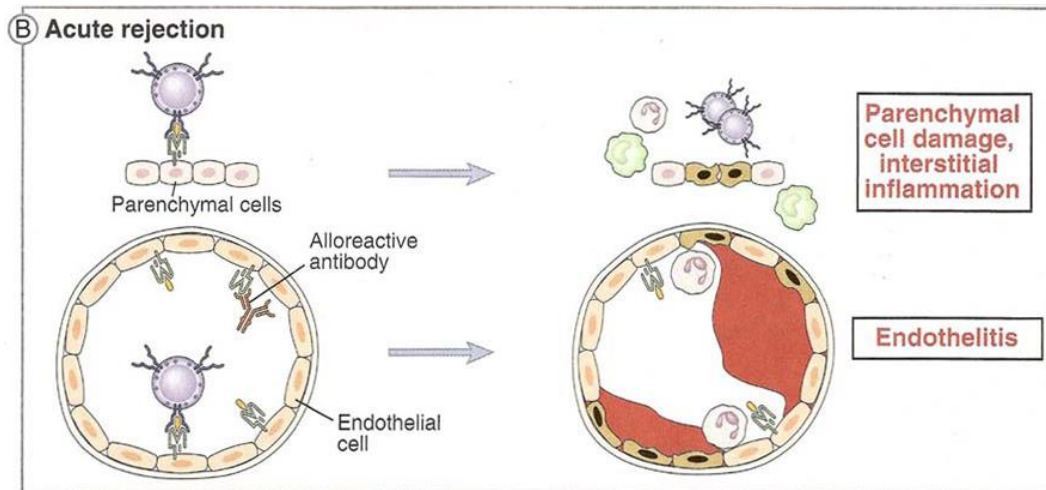


Abbildung 3: Akute Abstoßung - Antigenspezifische Antikörper und zytotoxische T-Lymphozyten schädigen einzeln oder gemeinsam das Transplantat, indem sie – direkt oder indirekt – Parenchymschäden und Entzündung an Interstitium und Endothel hervorrufen (www.imgkid.com/transplant-rejection-types.shtml).

Effektor T-Lymphozyten (CD4⁺- und CD8⁺-T-Zellen) und NK-Zellen sind bei der akuten Abstoßung aufgrund ihrer direkten zytotoxischen Wirkung gegenüber Spenderantigenen von großer Bedeutung. **Empfänger T-Lymphozyten** erkennen ein transplantiertes Organ anhand der als körperfremd erkannten Oberflächenmarker Major-Histocompatibility-Complex (MHC) und Minor-Histocompatibility-Complex (mHC). MHC-Moleküle lassen sich in MHC-Klasse-I- (HLA-A, HLA-B, HLA-C) und MHC-Klasse-II- (HLA-DR, HLA-DQ, HLA-DP) Moleküle unterteilen. Während MHC-I-Moleküle auf praktisch allen Zellen exprimiert werden, ist die MHC-II-Molekül-Expression unter anderem auf dendritische Zellen (DCs), Makrophagen und B-Lymphozyten beschränkt (Bradley, Bolton et al. 2002).

Die standardmäßige Durchführung der HLA-Testung ist daher heutzutage Standard vor Transplantation und gibt anhand der spezifischen HLA-Merkmale Aufschluss darüber, wie groß die Wahrscheinlichkeit einer Transplantatabstoßung ist (Barker and Markmann 2013).

Die **T-Zellaktivierung** erfolgt nach Transplantation via Antigen-präsentierende Zellen (APCs). Dabei binden naive CD4⁺ T-Zellen mit ihren T-Zell-Rezeptoren (TCR) an die als fremd erkannten Alloantigene des Transplantats (MHC-Klasse-I-Peptide), die von APCs via MHC-Klasse-II-Molekülen präsentiert werden. Zudem erfolgt eine CD80/86 und CD28 vermittelte Costimulation der T-Zellen. Es wird IL-2 ausgeschüttet und IL-2 vermittelte Signalwege aktiviert. Es kommt zur klonalen Expansion,

Aktivierung und Differenzierung von CD4⁺ T-Zellen, die die unspezifische Abstoßung fördern, indem proinflammatorische Zytokine exprimiert, sowie weitere Effektorzellen rekrutiert und aktiviert werden (vgl. Abb. 4) (Juvet, Whatcott et al. 2014).

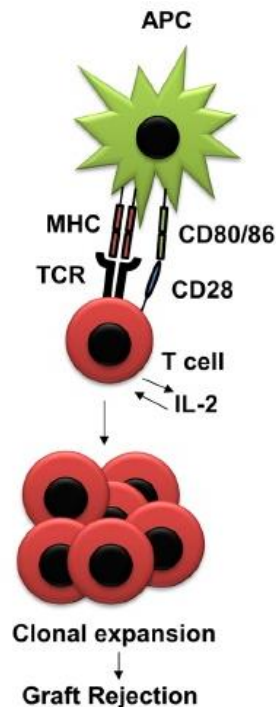


Abbildung 4: „Nicht modifizierte Alloreaktivität“: Antigenpräsentierende Zellen (APCs) aktivieren T-Effektorzellen. Dies geschieht über die Bindung des T-Zell-Rezeptors (TCR) an Alloantigene (MHC), die von APCs präsentiert werden. Eine Costimulation erfolgt durch Interaktion zwischen den Oberflächenmolekülen CD28 und CD80/86. Es kommt zur IL-2 Ausschüttung und IL-2 abhängige Signalkaskaden werden aktiviert. Aktivierte T-Zellen durchlaufen Proliferation (clonal expansion) und Differenzierung und stoßen das als fremd erkannte Transplantat ab (Juvet, Whatcott et al. 2014).

Naive CD8⁺-T-Zellen differenzieren nach MHC-I-Antigenkontakt zu zytotoxischen CD8⁺-T-Zellen. CD4⁺ Typ-I-T-Helferzellen (Th1) sind durch Interaktion ebenfalls in der Lage naive CD8⁺-T-Zellen zu aktivieren und in zytotoxische CD8⁺-T-Zellen umzuwandeln (Yamazaki, Kanamoto et al. 2013).

Die Abstoßung des Transplantats ist CD4⁺- und CD8⁺-T-Zell vermittelt. Dabei sind CD4⁺-T-Zellen auf das Erkennen von MHC-Klasse-II-Molekülen und CD8⁺-T-Zellen auf das Erkennen MHC-Klasse-I-Molekülen spezialisiert. Entsprechend erfolgt die Abstoßung fremder Antigene über Präsentation von MHC-II-Molekülen via CD4⁺- und von fremden MHC-I-Molekülen via CD8⁺-T-Zellen (vgl. Abb. 5).

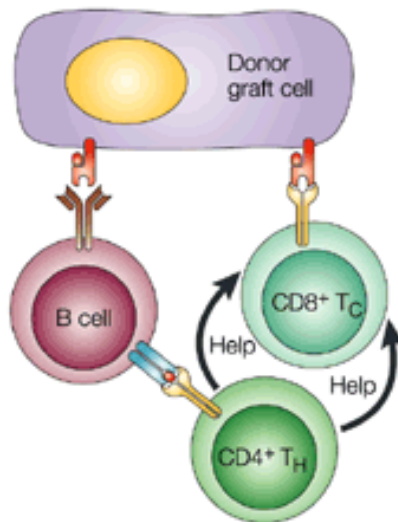


Abbildung 5: CD8⁺ zytotoxische T-Zell-Antwort. Durch Kooperation mit aktivierten CD4⁺ T-Helferzellen ist die zytotoxische T-Zelle fähig MHC-I-Moleküle des Transplantats mit ihrem T-Zell-Rezeptor als fremd zu erkennen und alloantigen besetzte Zellen direkt zu schädigen (Bradley, Bolton et al. 2002).

Um den jeweiligen Stellenwert von CD4⁺- und CD8⁺-T-Zellen an der Abstoßung eines Transplantats zu untersuchen, arbeiteten Youssef und Kollegen mit CD4- und CD8-Knockout-(KO)-Mäusen bei kompletten MHC-Mismatch. Sie konnten zeigen, dass in CD4-KO-Mäusen eine dauerhafte Transplantatakzeptanz bestand (>100d). CD8-KO-Mäuse hatten mit 9.0±0.4 Tagen gegenüber der Kontrollgruppe mit einem Transplantatüberleben von 6.5±0.2 Tagen ebenfalls einen deutlichen jedoch nicht vergleichbaren Einfluss auf die Abstoßung des kardialen Allografts. CD4⁺-T-Zellen scheinen eine zentrale Rolle in der Transplantatakzeptanz zu spielen (Youssef, Otley et al. 2004). Der Hauptmechanismus der Gewebeschädigung bei der Transplantatabstoßung erfolgt IFN γ vermittelt. Die Produktion von IFN γ wird dabei von antigenreaktiven T-Zellen gesteuert. Rosenblum und Kollegen haben den Einfluss unterschiedlicher Costimulationsmoleküle auf das Priming alloreaktiver T-Zellen untersucht. Sie konnten zeigen, dass die Chemokinliganden CXCL9 (Chemokinligand 9) und CXCL10 (Chemokinligand 10) antagonistische Wirkung am CXCR3 (Chemokinrezeptor 3) vermitteln. CXCL9 fördert dabei die Entwicklung IFN γ -produzierender zytotoxischer T-Zellen, während CXCL10 eine hemmende Wirkung auf die IFN γ -Produktion hat (Rosenblum, Shimoda et al. 2010).

Der Nachweis einer akuten Abstoßung erfolgt auf Basis einer gewebshistologischen Untersuchung. Derzeitig verfügbare immunsuppressive Medikamente machen die akute Abstoßung beherrschbar (Chinen and Buckley 2010; Moreau, Varey et al. 2013).

2.4 Immunsuppressive Therapie bei Herztransplantation

Es gibt keinen Goldstandard einer immunsuppressiven Strategie nach Herztransplantation. Sie unterscheidet sich von Zentrum zu Zentrum in der Anwendung oder Verzicht auf eine Induktionstherapie einerseits und der Auswahl der Kombinationspartner einer chronischen Immunsuppression andererseits (Lund, Edwards et al. 2013). Generell erfolgt jedoch eine initiale intensiverte Therapiephase, da das Risiko einer Transplantatabstoßung in den ersten drei bis sechs Monaten am höchsten ist. Im Laufe des ersten Jahres wird die Therapie in der Regel auf ein Maß reduziert, das eine Abstoßung bestmöglich verhindert und Nebenwirkungen minimiert (Stehlik, Edwards et al. 2010). Ziel einer medikamentösen Immunsuppression ist die ausreichende Kontrolle der Immunreaktion, um eine Abstoßung des Transplantats zu verhindern und seine Organfunktion bestmöglich zu schützen. Immunsuppressiva sind potente Medikamente mit zahlreichen Nebenwirkungen. Zu den potentiell lebensbedrohlichen Nebenwirkungen zählen ein erhöhtes Risiko für Infektionen, Organdysfunktion (z.B. Nephrotoxizität der Calcineurin-Inhibitoren) und maligne Neoplasien.

Bei der Induktionstherapie kommen verschiedene Antilymphozytenantikörper zum Einsatz, die spezifisch an Epitope auf B- und T-Lymphozyten binden. Sie helfen, die reaktive Immunantwort in den ersten Monaten einzudämmen und Glukokortikoide einzusparen (Cantarovich 2004; Cantarovich, Giannetti et al. 2004; Rosenberg, Vriesendorp et al. 2005; Teuteberg, Shullo et al. 2008; Yamani, Taylor et al. 2008). Die wichtigsten derzeit nach Herztransplantation zur Verfügung stehenden Antilymphozytenantikörper sind Interleukin-2-Rezeptorantagonisten (Basiliximab), polyklonale Anti-Thymozyten-Antikörper (ATGAM und Thymoglobulin), Muromonab-CD3 (OKT3) und, inzwischen Gegenstand klinischer Studien, Alemtuzumab (Campath-1H) (Bloom, Hu et al. 2006; Cahoon, Ensor et al. 2012).

Die immunsuppressive Erhaltungstherapie basiert in der Regel auf je einem Medikament nachfolgender Medikamentenklassen: Calcineurininhibitoren, Antimetabolite und Glucocortikoide. Der Einsatz von Mammalian-Target-of-Rapamycin-(mTOR)-Inhibitoren ist derzeit aufgrund schwerwiegender, potentieller Nebenwirkungen einer sehr engen Indikationsstellung vorbehalten.

Zu den Calcineurininhibitoren gehören Cyclosporin und Tacrolimus (Eisen, Hobbs et al. 2001). Tacrolimus ist derzeit der am häufigsten verwendete Calcineurininhibitor nach Herztransplantation. Die Vorteile von Tacrolimus gegenüber Cyclosporin sind eine Reduktion von bioptisch gesicherten Abstoßungsreaktionen (28% vs. 42%), verminderte Hypertonie (66% vs. 78%), verminderte Dyslipidämie (29% vs. 40%) und selteneres Auftreten von Transplantatvaskulopathie nach fünf und zehn Jahren (36% vs. 64% und 54% vs. 92%). Ein Nachteil ist das vermehrte Auftreten von Diabetes

mellitus (20% vs. 11%). Vergleicht man das Patientenüberleben zwischen Tacrolimus- und Cyclosporin-Gruppe 1, 5 und 10 Jahre nach Herztransplantation, so zeigt sich nach einem Jahr eine Überlegenheit, nach zehn Jahren eine deutliche Unterlegenheit in der Tacrolimusgruppe (97% vs. 90%, 80% vs. 83%, 67% vs. 80%) (Grimm 2006; Guethoff, Meiser et al. 2013).

Azathioprin (Imurek) und Mycophenolat Mofetil (MMF, Cellcept) gehören zur Gruppe der Antimetabolite. Sie hemmen die Proliferation von B- und T-Lymphozyten, indem sie in die Nucleinsäuresynthese eingreifen. Da Lymphozyten für die Synthese von RNA und DNA auf die Neusynthese von Guanin-Nucleotiden angewiesen sind, wird die Proliferation von B- und T-Lymphozyten auf diese Weise gehemmt. Randomisierte Multicenterstudien zeigten nach 12 Monaten die Überlegenheit von Mycophenolat Mofetil gegenüber Azathioprin in der Reduktion von Mortalität (6% vs. 11%) und behandlungsbedürftiger Abstoßung (66% vs. 74%). Für den kombinierten Endpunkt Retransplantation und Mortalität nach 36 Monaten zeigte sich Mycophenolat Mofetil gegenüber Azathioprin ebenfalls überlegen (11% vs. 18%) (Eisen, Kobashigawa et al. 2005; Kobashigawa, Miller et al. 1998).

Glucokortikoide haben vor allem in der frühen Phase nach Transplantation eine große Bedeutung. Die antiinflammatorische Wirkung wird durch unspezifische Interaktionen bei der Aktivierung des Immunsystems erreicht. So können Antigenpräsentation, Produktion von Zytokinen und Proliferation von Lymphozyten abgeschwächt, bzw. nahezu vollständig unterbunden werden. Initial hohe Dosen von Glucokortikoiden sollten bereits innerhalb der ersten Monate reduziert werden. Nach sechs bis zwölf Monaten sollte nur noch eine niedrig dosierte Therapie nach Bedarf erfolgen oder falls möglich vollständig auf den Einsatz von Glucokortikoiden verzichtet werden, um Langzeitnebenwirkungen und Komorbiditäten wie beispielsweise das Auftreten oder die Verschlechterung eines Diabetes mellitus, Hyperlipidämie, Hypertension oder Wassereinlagerungen zu vermeiden (Olivari, Jessen et al. 1995; Teuteberg, Shullo et al. 2008).

Aus der Klasse der mTOR-Inhibitoren werden nach Herztransplantation Sirolimus (Rapamune) und Everolimus (Zortress) verwendet. Sie unterscheiden sich in ihrer Halbwertszeit (60 vs. 30 Stunden). Ihre Wirkung beruht auf der Hemmung der Proteinkinase mTOR (mammalian Target Of Rapamycin). Das Einsatzspektrum von mTOR-Inhibitoren ist aufgrund gravierender Nebenwirkungen, wie Wundheilungsstörungen und erhöhter Mortalität, sehr eng. Indikationen für ihren Einsatz anstelle eines Calcineurininhibitors oder eines Antimetaboliten können Niereninsuffizienz, Transplantat-Vaskulopathie oder Malignome sein (Baur, Oroszlan et al. 2011; Eisen, Kobashigawa et al. 2013; Gonzalez-Vilchez, de Prada et al. 2008; Kuppahally, Al-Khaldi et al. 2006). Die Indikation für eine Aufnahme von Everolimus in die immunsuppressive Therapie erfolgt meist, um die Dosierung von Calcineurininhibitoren und somit deren nephrotoxisches Potential zu senken (Hirt, Bara et al. 2013).

Die nachfolgende Abbildung zeigt den prozentualen Anteil einzelner Wirkstoffe an der immunsuppressiven Therapie ein Jahr nach Herztransplantation, dargestellt als Trend über die Zeit. Bei den Calcineurininhibitoren zeigte sich seit dem Jahr 2000 ein deutlicher Trend von Cyclosporin zu Tacrolimus (81% im Jahr 2012). Der Einsatz von mTOR-Inhibitoren hat insgesamt zugenommen, stagniert jedoch (13% im Jahr 2012). Bei den Antimetaboliten hat Mycophenolat Mofetil (85% im Jahr 2012) das Azathioprin in der Therapie nahezu vollständig abgelöst. Der Glukokortikoidbedarf hat sich von über 90% im Jahr 2000 auf unter 70% im Jahre 2012 vermindert (vgl. Abb. 6) (Lund, Edwards et al. 2013).

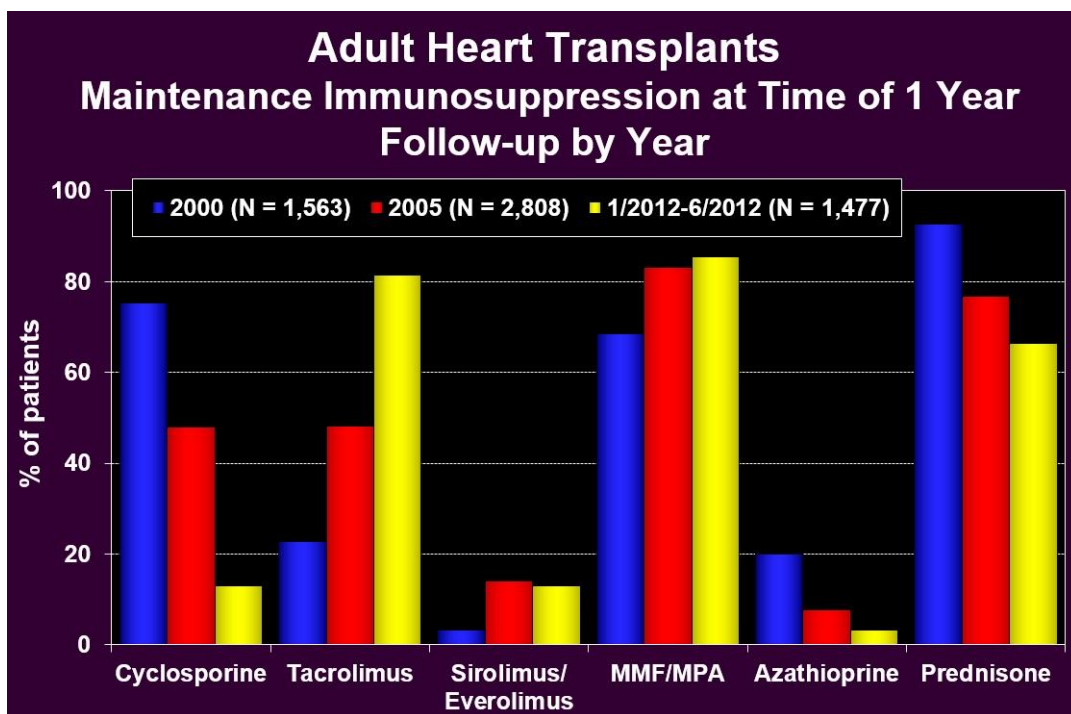


Abbildung 6: Immunsuppressive Erhaltungstherapie ein Jahr nach Herztransplantation bei Erwachsenen. Die einzelnen Farben stehen jeweils für das Jahr der erhobenen Daten. Die Grafik gibt Aufschluss über den prozentualen Anteil der einzelnen Wirkstoffe an der immunsuppressiven Therapie aller erfassten Herztransplantationspatienten (www.isHLT.org/registries/slides.asp?slides=heartLungRegistry).

2.5 Toleranzinduktion

Fernziel der modernen Transplantationsmedizin ist die Beseitigung von Abstoßungsreaktionen durch Induktion einer Toleranzentwicklung des Empfängers gegenüber dem Spenderorgan bei gleichzeitiger Erhaltung eines funktionellen Immunsystems. Dies würde den weitgehenden oder vollständigen Verzicht auf eine dauerhafte immunsuppressive Medikation und der mit ihr verbundenen, negativen Begleitaspekte wie beispielsweise Organdysfunktion, Neoplasien oder Infektionen bedeuten.

Zur Erreichung dieses Ziels gibt es unterschiedliche Ansätze, wie kompletten Austausch des Empfängerimmunsystems durch das Spenderimmunsystem, die partielle Koexistenz von Empfänger- und Spenderimmunsystem, sowie eine spezifische Regulation einzelner Biomarker oder Zellpopulationen. Kompletter Chimärismus (full chimerism) bedeutet die vollständige Übernahme der Lymphohämatopoese durch den Spender. Bei partiellem Chimärismus (mixed chimerism) liegt eine simultane Existenz von Empfänger- und Spender-Immunezellen vor. Im Tiermodell konnte bereits eine stabile Co-Existenz beider Immunsysteme erreicht werden.

Beim kompletten Chimärismus wird das gesamte lymphohämatopoetische System des Empfängers durch das Spendersystem ersetzt. Initial erfolgt eine myeloablative Therapie mit nachfolgender Organ- und Knochenmarktransplantation vom identen Spender. Kompletter lymphohämatopoetischer Chimärismus bedingt aufgrund fehlender Fremdantigene das anschließende Ausbleiben einer Immunantwort reaktiver Immunezellen gegen das Transplantat, sowie reaktiver T-Zellen des Spenders gegenüber dem Empfänger (Sachs 2011).

Nachteile der myeloablativen Konditionierung sind erhöhtes Morbiditäts- und Mortalitätsrisiko, ein eingeschränktes Patientenkollektiv, sowie große benötigte Vorlaufzeit. Für Herztransplantation am Menschen ist sie daher derzeit nicht geeignet. Eine Toleranzinduktion via myeloablativer Konditionierung und kompletten Chimärismus bei der Transplantation solider Organe wird beim Mensch bisher ausschließlich in der Nierentransplantation angewendet (Kawai and Sachs 2013; Leventhal, Abecassis et al. 2013; Leventhal, Mathew et al. 2013; Fuchs 2014).

Bei Patienten zur geplanten Herztransplantation scheint hingegen das Erlangen eines partiellen Chimärismus ohne myeloablative Konditionierung von größerer Relevanz zu sein. Diese Methode wäre gerade für Patienten mit terminaler Herzinsuffizienz besser geeignet, da sie die Nachteile einer myeloablativen Konditionierung umgeht, während sie sich der Vorteile des Chimärismus bedient (Pilat, Baranyi et al. 2010).

Bei diesem Verfahren werden ebenfalls Knochenmark und Spenderorgan vom identen Spender transplantiert. Um auf myeloablative und chemotherapeutische Konditionierung verzichten zu können, kommt meist eine T-Zelldepletion oder eine kurzzeitige Kostimulationsblockade, z.B. von Transmembranprotein CD 154, in Frage (Pilat, Baranyi et al. 2010).

In der vorliegenden Arbeit wurde eine Variante des partiellen Chimärismus angewendet. Anstelle von Knochenmark (naive lymphatische Vorläuferzellen) wurde DST (Donor specific transfusion, d.h. inkubierte, aktivierte Spendersplenozyten) appliziert, um via partiellen Chimärismus akute Abstoßung zu vermindern und Transplantattoleranz zu fördern.

2.6 Zentrale und periphere Toleranzinduktion

Das Erlangen von Toleranz gegenüber einem Spenderorgan kann in zentrale und periphere Toleranz unterteilt werden. Unter zentraler Toleranz versteht man die Selektion von T-Zellen während des Reifungsprozesses im Thymus durch negative und positive Selektion. Negative Selektion bedeutet die Zerstörung von T-Zellen mit hoher Reaktivität gegenüber körpereigenen MHC-Antigenen. T-Zellen, die nicht auf eigenes MHC reagieren gehen ebenfalls zu Grunde. Eine positive Selektion von T-Zellen erfolgt nur bei mittelgradiger Affinität gegenüber eigenen MHC-Antigenen. Positiv selektionierte T-Zellen dürfen den Reifungsprozess durchlaufen und werden anschließend bei Bedarf als funktionelle T-Zellen in die Peripherie entlassen (Sachs 2011).

Periphere Toleranz wird erreicht, indem zirkulierende, potentiell reaktive T-Zellen funktionsunfähig gemacht werden. Mögliche Mechanismen sind das Erreichen von Anergie, peripherer Deletion und Regulation. Anergie bedeutet das Ausbleiben der Immunantwort reaktiver T-Zellen trotz fremder Antigene. Die periphere Deletion ermöglicht die Elimination spenderreaktiver T-Zellen via aktivierungsinduziertem und passivem Zelltod. Regulation im Sinne einer Toleranz kann durch regulatorische T-Zellen (Tregs) erfolgen. Dies wurde in der vorliegenden Arbeit untersucht, da Tregs in der Lage sind, aktivierte T-Zellen in ihrer Funktion zu Hemmen (Golshayan, Jiang et al. 2007; Sachs, Kawai et al. 2014). Der zugrunde liegende Mechanismus wird noch nicht vollständig verstanden. Ein potentiell bedeutsamer Mediator ist das Treg spezifische FoxP3.

2.7 Bedeutung an der Abstoßung beteiligter Mediatoren

Forkhead-Box-Protein-3 (FoxP3) ist an der Regulation der Immunantwort beteiligt. FoxP3 ist spezifisch für regulatorische T-Zellen und hat eine Schlüsselfunktion in der Entwicklung von regulatorischen T-Zellen. Tregs regulieren die Immunantwort gegenüber Selbst-Antigenen, Allergenen und inhibieren überschießende Immunreaktionen. Die FoxP3-Signalkaskade in Tregs und ihre Mechanismen auf das Immunsystem werden noch nicht vollständig verstanden und bedürfen weiterer Forschung. FoxP3-Defizienz und damit einhergehendes Fehlen von regulatorischen T-Zellen ist verantwortlich für das Auftreten äußerst aggressiver, systemischer Entzündungsprozesse (Rudensky 2011; Ramsdell and Ziegler 2014). Die zur Expression von FoxP3 führende Signalkaskade in Tregs unterscheidet sich nach ihrem Entstehungsort. Es gibt thymical Tregs (tTregs, sie entwickeln sich pränatal im Thymus) und peripheral inducible Tregs (pTregs, sie werden peripher aktiviert). Während die Aufgabe von tTregs eher in der Kontrolle autoreaktiver, aktivierter T-Zellen liegt, müssen pTregs laufend adaptieren, um Pathogene zu bekämpfen und Entzündungsprozesse zu regulieren (Mahmud, Manlove et al. 2013; Povoleri, Scotta et al. 2013).

Hämoxygenase-1 (HO-1) gehört zu den Heat-Shock-Proteinen (HSP) und ist ein Enzym des Hämstoffwechsels. Das Enzym katalysiert den Abbau von Häm zu freiem Eisen (Fe^{++}), Kohlenstoffmonoxid (CO) und Biliverdin (Seroussi, Kedra et al. 1999; Durante 2010). Die Induktion von HO-1 hat eine protektive antioxidative, antiinflammatorische und antiapoptotische Wirkung. Des Weiteren scheint HO-1 immunmodulatorische Eigenschaften zu vermitteln, die unter anderem auf dem Abbau des proinflammatorisch wirkenden freien Häms, sowie auf der protektiven Wirkung des entstandenen Kohlenstoffmonoxids und Biliverdins basieren. CO, Biliverdin und dessen Abbauprodukt Bilirubin haben eine starke antiinflammatorische, antioxidative, antiapoptotische und antithrombotische Wirkung (Durante 2010). Hämoxygenase-1 kommt in nahezu allen Körperzellen vor. Seine immunmodulatorische Fähigkeit wurde in Zellen, die direkt an der Regulation der Immunreaktion beteiligt sind, beschrieben. Dazu zählen beispielsweise Makrophagen, Monozyten und Endothelzellen (Paine, Eiz-Vesper et al. 2010). In einem von Wu und Kollegen veröffentlichtem Review-Artikel wurde 2011 das Wissen um die Bedeutung der Hämoxygenase-1 an Entzündungsprozessen und kardiovaskulären Erkrankungen zusammengefasst (Wu, Ho et al. 2011). Die Protektion transplanteder Herzen durch hochregulierte Expression von HO-1 in Mäusen gilt als gesichert, allerdings sind mögliche Wirkmechanismen nicht abschließend geklärt (Wu, Ho et al. 2011; Yet, Tian et al. 2001).

Die Suche nach verträglichen und potenten HO-1-Induktoren ist Gegenstand der aktuellen Forschung (Barbagallo, Galvano et al. 2013). Beschriebene Induktoren sind Transkriptionsfaktoren, wie Nuclear-Factor-E2-related-factor-2 (Nrf2), Nuclear-Factor-kappa-B (NF- κ B), Activator-Protein-1 (AP-1), Transkriptionsrepressor BTB und CNC-homologue-1 (Bach1), sowie an den Signalkaskaden beteiligte, upstream-gelegene Kinasen, wie p38-Mitogen-Activated-Protein-Kinase (p38-MAPK) und Phosphatidyl-Inositid-3-Kinase (PI3K) (Ferrandiz and Devesa 2008; Paine, Eiz-Vesper et al. 2010). Die Toxizität potenter HO-1-Induktoren, wie Cobaltprotoporphyrin (CoPP), limitiert bzw. verbietet die Gabe in klinischen Studien (Schmidt 2007). Resveratrol ist ein potentieller nicht toxischer Induktor der HO-1-Expression (Son, Lee et al. 2013).

In dieser Arbeit wurde daher ein potentieller Einfluss von Resveratrol auf die Expression von HO-1 und die akute Abstoßung untersucht.

Interleukin-6 (IL-6) ist ein immunregulatorisches Zytokin. Es ist an Immunantwort, Akute-Phase-Reaktion und an Entzündungsprozessen beteiligt. Es wird unter anderem von T-Zellen, Makrophagen und gefäßständigen Smooth-Muscle-Cells sezerniert. IL-6 vermittelt seine Effekte über einen membranständigen (mIL-6R) und einen zirkulierenden, löslichen IL-6-Rezeptor (sIL-6R) (Mihara, Hashizume et al. 2012).

Der STAT-3- (Signal-Transducer-and-Activator-of-Transcription) Signalweg vermittelt eine immunsuppressive Wirkung, indem er die Expression von MHC-II-Molekülen auf Dendritischen Zellen (DCs) und somit die Aktivierung von CD4⁺-T-Zellen behindert (Alfonso, Han et al. 2001; Kitamura, Kamon et al. 2005). IL-6 steuert neben der Expression proinflammatorischer Chemokine und Adhäsionsmoleküle auch die Apoptose beteiligter Leukozyten. IL-6 hat eine große Bedeutung während des immunologischen Wechsels vom angeborenen auf das erworbene Immunsystem in Entzündungsprozessen und die Migration von T-Zellen (McLoughlin, Jenkins et al. 2005).

STAT1 ist an der Signaltransduktion von Toll-Like-Rezeptoren-(TLRs) und der Immunantwort beteiligt. Es ist Schnittstelle zwischen den atherosklerosefördernden IL-6, IFN γ und TLR4. IFN γ ist ein proinflammatorisches Zytokin. Es ist im angeborenen und erworbenen Immunsystem von Bedeutung und aktiviert die STAT1-Kaskade. STAT1 fördert die TLR4-vermittelte Expression weiterer proinflammatorischer und atherosklerosefördernder Mediatoren (Sikorski, Chmielewski et al. 2011; Sikorski, Czerwoniec et al. 2011; Luu, Greenhill et al. 2014).

IL-6 ist dementsprechend ein Immunmodulator, der je nach Kaskade hemmend oder fördernd auf immunologische Prozesse einwirken kann (STAT 3 protektiv, STAT 1 fördernd).

Interleukin-10 (IL-10) ist ein antiinflammatorisch wirkendes Zytokin. Es reguliert und limitiert proinflammatorische Reaktionen und kontrolliert die Immunantwort des angeborenen und erworbenen Immunsystems, um Gewebeschäden durch überschießende Immunreaktionen zu verhindern. IL-10 wird von T- und B-Lymphozyten, Makrophagen, NK-Zellen und Dendritischen Zellen exprimiert (Hofmann, Rosen-Wolff et al. 2012; MacKenzie, Pattison et al. 2014). IL-10 inhibiert die Expression proinflammatorischer Zytokine wie IL-12 oder TNF via Dendritische Zellen und Makrophagen, und reduziert die Expression von MHC-II, CD80- und CD86-Molekülen auf Antigen-Präsentierenden-Zellen. Daraus resultiert eine Hemmung der T-Zell-Aktivierung (Berg, Zhang et al. 2001). IL-10-Defizienz im Mausmodell geht mit einer überschießenden Th1-Zell-Antwort einher (Kuhn, Lohler et al. 1993).

Die IL-10-Expression in T-Zellen wird über unterschiedliche Signalkaskaden vermittelt und von verschiedenen Transkriptionsfaktoren reguliert (Apetoh, Quintana et al. 2010; Kubo and Motomura 2012; Motomura, Kitamura et al. 2011; Pot, Jin et al. 2009; Saraiva, Christensen et al. 2009, Shoemaker, Saraiva et al. 2006).

IL-10 ist ein entscheidender Modulator der komplexen Homöostase des Immunsystems. Es hemmt indirekt die Aktivierung von T-Lymphozyten und verschiebt die T-Lymphozytenantwort von Th1 zu Th2, indem es die Expression inflammatorischer Zytokine, speziell der Th1-Antwort, hemmt. Es wirkt positiv auf die Proliferation und die Antikörperproduktion von B-Lymphozyten. IL-10 und TGF β

nehmen zudem eine Schlüsselrolle in der Entwicklung der Immuntoleranz ein. Aufgrund der breiten Interaktion von IL-10 ist ein therapeutischer klinischer Ansatz schwierig (Ng, Britton et al. 2013).

Transforming-Growth-Factor- β (TGF β) ist ein essentielles Zytokin in der Regulation des Immunsystems. Es kommt in drei Isoformen vor. TGF β wird neben T-Zellen von einer Vielzahl weiterer Zellen gebildet und sorgt für eine ausgewogene Homöostase der Immunantwort, indem es Zellproliferation, Zelldifferenzierung und Apoptose beeinflusst (Fujii, Brissenden et al. 1986; Kang, Liu et al. 2009). In der klassischen Signalkaskade bindet aktiviertes TGF β an den TGF β -Rezeptor (TGF β -R). Dies initiiert die intrazelluläre Smad-Kaskade. Via Smad2 oder Smad3 und Smad4 wird die Transkription des TGF β -Gens gefördert. Smad7 reguliert die TGF β -Expression negativ, indem es die Interaktion von Smad2, Smad3 und Smad4 inhibiert (Shi and Massague 2003; Monteleone, Boirivant et al. 2008).

TGF β sorgt für die Aufrechterhaltung der Homöostase bei aktiviertem Immunsystem. Es steuert die Proliferation, Differenzierung und Apoptose von Lymphozyten. Zudem reguliert es inflammatorische Prozesse über Kontrolle von Chemotaxis, Aktivierung und Hemmung (speziell von T-Lymphozyten), sowie Apoptose in vielen Zellen des Immunsystems (Li, Suemaru et al. 2006; Travis and Sheppard 2014). TGF β reguliert entscheidend Toleranz- und Entzündungsprozesse, indem es Zellen des Immunsystems reguliert, antiinflammatorische Prozesse fördert und proinflammatorische Prozesse hemmt (Worthington, Fenton et al. 2012).

Tumor-Nekrose-Faktor-alpha (TNF α) ist ein immunmodulatorisches Zytokin. Es wird hauptsächlich von Makrophagen/Monozyten exprimiert. Lymphozyten, Endothel- sowie Mastzellen sind ebenfalls in der Lage TNF α zu bilden, spielen aber eine untergeordnete Rolle. Die Expression von TNF α wird über die beiden TNF α -Rezeptoren TNFR1 und TNFR2 vermittelt. TNFR1 ist auf den meisten Zellen zu finden, TNFR2 wird spezifisch auf immunregulatorischen Zellen exprimiert.

TNF α vermittelt unterschiedliche Effekte. Es ist ein hochpotentes proinflammatorisches Zytokin, das vor allem in der Frühphase der Entzündung von Bedeutung ist. Es fördert die Produktion proinflammatorisch wirkender Zytokine, Prostaglandine und des Platelet-Activating-Factors (PAFs). Es hat eine Schlüsselfunktion in der Aktivierung und Rekrutierung von Entzündungszellen – besonders von Makrophagen – und spielt bei der Entstehung chronisch-entzündlicher und autoimmuner Erkrankungen eine Rolle (Parameswaran and Patial 2010). TNF α reguliert in Makrophagen Proliferation, Differenzierung und Apoptose (Conte, Holcik et al. 2006; Munoz, Carlet et al. 1991).

Zusammengefasst sind die Effekte der Mediatoren, unterteilt in pro- und antiinflammatorische Wirksamkeit, in der nachfolgenden Abbildung dargestellt (vgl. Abb. 7).

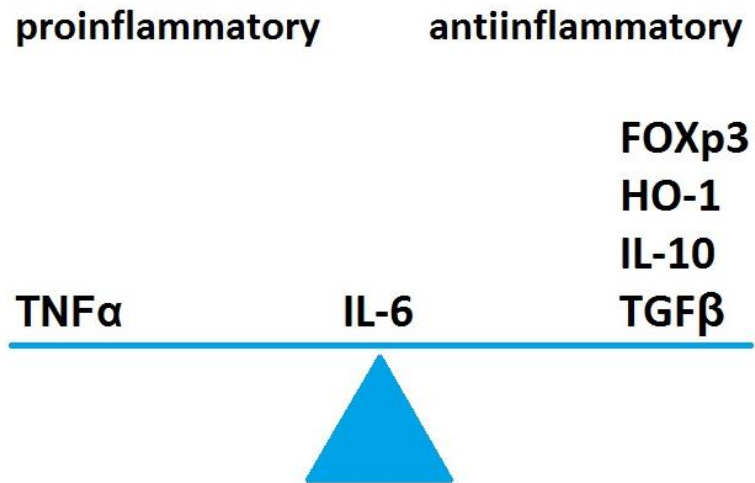


Abbildung 7: Vereinfachte Unterteilung der untersuchten Mediatoren nach ihrer Wirkung auf Inflammation. TNFα ist ein proinflammatorisch wirksames Zytokin. IL-6 vermittelt sowohl pro- als auch antiinflammatorische Effekte. FoxP3, HO-1, IL-10 und TGFβ vermitteln antiinflammatorische Prozesse.

3. Fragestellung

In der vorliegenden Arbeit wurde am Mausmodell anhand einer heterotopen, cervikalen Herztransplantation mit sechsstündiger Ischämiephase untersucht, ob via partiellem Chimärismus, durch Behandlung mit einer spenderspezifischen Splenozytentransfusion (DST) eine transiente Transplantattoleranz erreicht und die akute Abstoßungsreaktion des Empfängers vermindert werden kann. Dabei wurden vier zentrale Fragen untersucht.

1. Verlängert DST-Gabe das Graftsurvival?
2. Reduziert die Gabe von DST den histologischen Grad der Transplantatabstoßung?
3. Induziert DST die Expression zytoprotektiver Mediatoren bzw. inhibiert es die Expression an der Abstoßung beteiligter Mediatoren?
4. Bewirkt eine Kombination von DST und Resveratrol eine stärkere HO-1 Induktion?

Als Endpunkte dienen Transplantatüberlebenszeit (palpable Kontraktion) sowie die histologische Ausprägung der Transplantatabstoßung nach ISHLT-Score und kumulativem ISHLT-Score an Tag 5 nach Transplantation.

Da das Wirkprinzip einer spenderspezifischen Splenozytentransfusion derzeit noch nicht vollständig verstanden wird, wurden auf der Suche nach möglichen Wirkmechanismen die Expressionslevel von Forkhead-Box-Protein-P3 (FoxP3), Hämoxygenase-1 (HO-1), Interleukin-6 (IL-6), Interleukin-10 (IL-10), Tumor-Growth-Factor-Beta (TGF β) und Tumor-Nekrose-Faktor-Alpha (TNF α) mittels q-PCR in Spenderherz, Empfängerlymphknoten und Empfängermilz zu unterschiedlichen Zeitpunkten (Tag 1, 3 und 5, sowie Tag des Transplantatverlustes) nach Transplantation bestimmt.

4. Material und Methoden

4.1 Verwendete Tiere

In der vorliegenden Arbeit wurden ausschließlich Inzuchtstämme männlicher BALB/c- und C57BL6-Mäuse von Charles River (Sulzfeld, Deutschland) verwendet. Das Gewicht der Versuchstiere war auf 20-25 Gramm beschränkt. Dies entspricht einem Alter von sechs bis acht Wochen. Die BALB/c-Mäuse dienten als Spender- und die C57BL6-Mäuse als Empfängertiere. Die Tierversuche wurden durch das österreichische Bundesministerium für Wissenschaft und Forschung genehmigt (BMWf-66011/0142/II/10b/2012). Die Tierhaltung erfolgte nach den gültigen Prinzipien der Versuchstierhaltung (Baumans 2005).

4.2 Heterotopes Herztransplantationsmodell der Maus

Die heterotope Herztransplantation an Mäusen ist ein gut geeignetes und anerkanntes Modell, um immunologische Vorgänge der akuten und chronischen Abstoßung sowie Ischämie-Reperfusionsschäden näher betrachten zu können (Plenter, Zamora et al. 2013). Die Erstbeschreibung der heterotopen Herztransplantation bei Mäusen erfolgte 1973 durch Corry und Russell. Das Spenderherz wurde mit Aorta ascendens und Truncus pulmonalis End-zu-Seit abdominal auf gleicher Höhe an Aorta abdominalis und V. cava inferior angeschlossen. Die Anastomose wurde unter 25-facher Vergrößerung mittels monofilamentärem Ethilon 10-0 oder 9-0 genäht (Corry, Winn et al. 1973). Die Operationstechnik hat sich seit den 1970er Jahren weiterentwickelt und wurde mehrfach abgewandelt. Meilensteine in der Entwicklung der heterotopen Herztransplantation im Mausmodell werden in Tabelle 1 aufgeführt.

Modifications in forty years of mouse heart transplants		
Corry	1973	End-to-side adjacent anastomoses
Chen	1991	Cervical placement of the graft instead of abdominal placement
Matsuura	1991	Cervical placement Cuff technique instead of suture anastomoses
Niimi	2001	End-to-side staggered anastomoses
Witzke	2006	Donor IVC used instead of pulmonary artery
Li	2011	Cervical placement Splint tubing technique

Tabelle 1: Meilensteine im Herztransplantationsmodell der Maus in den letzten 40 Jahren (Modifiziert nach Plenter, Zamora et al. 2013) (Abbott, Lindsey et al. 1964; Corry, Winn et al. 1973; Lindsey et al. 1964; Ono and Lindsey 1969; Plenter, Zamora et al. 2013).

1991 transplantierte Chen erstmals ein Spenderherz End-zu-End cervical an A. carotis communis und V. jugularis externa. Seine Intention war die Vereinfachung des Transplantationsmodells mit Verzicht auf Abklemmen und somit der Unterbrechung der Blutversorgung der unteren Extremität (vgl. Abb. 8) (Chen 1991).

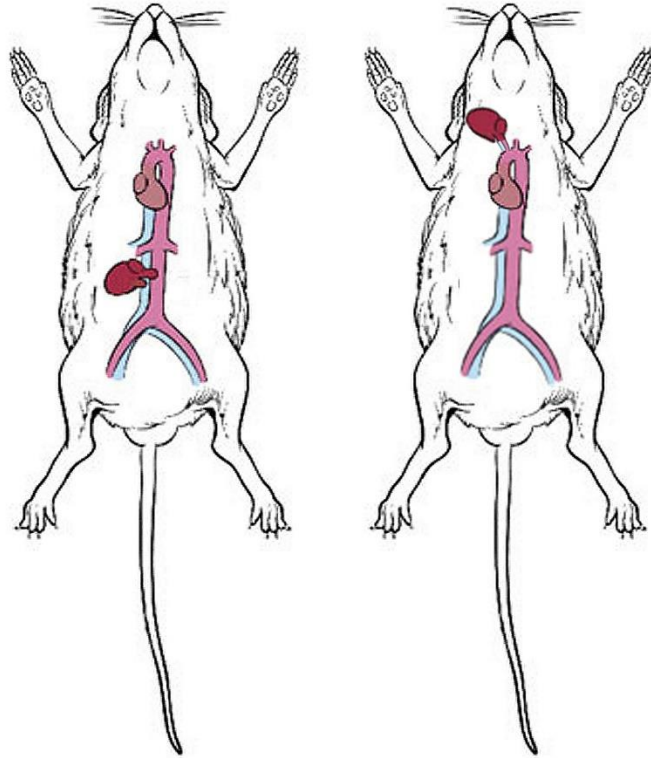


Abbildung 8: Heterotoper Herzanschluss abdominal und cervical (Abb. modifiziert nach Hasegawa, Visovatti et al. 2007)

(Hasegawa, Visovatti et al. 2007).

Nachteil dieser Methode war der anatomisch bedingte, eingeschränkte intraoperative Zugang zu den großen Halsgefäßen, sowie eine postoperative Torsion bzw. die Kompression der Gefäßanastomosen des Allografts. Probleme bereiteten zudem Größenunterschiede der Gefäße von Spender- und Empfängertieren. Matsuura löste diese Problematik noch im gleichen Jahr, indem er anstatt einer genähten Gefäßanastomose erstmals eine nahtlose Cuff-Technik im cervikalen Mausmodell anwendete. Die Cuffs wurden mittels Polypropylen 8-0 Ligatur an den Spendergefäßen angebracht und anschließend Aorta ascendens mit Carotis communis und Truncus pulmonalis mit V. jugularis externa verbunden. Der Cuff-Vorgang ist technisch anspruchsvoll und verlängert die Operationsdauer. Implantation und Gefäßanschluss werden hingegen erleichtert (vgl. Abb. 9) (Matsuura, Abe et al. 1991).

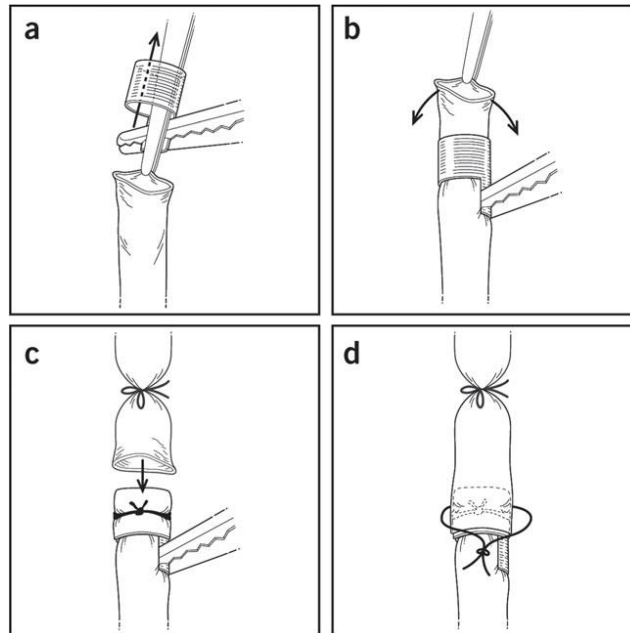


Abbildung 9: Prinzipien der Cuff-Technik bei mikrovaskulären Anastomosen: (a) Cuff über das Gefäß ziehen, (b) Cuff mit Gefäßklemme fixieren und Gefäßrand über den Cuff stülpen, (c) Gefäßrand mit Ligatur sichern und abgesetztes Gefäß über den vorbereiteten Cuff stülpen, (d) gecuffte, durchgängige Gefäßverbindung mit Ligatur auf Cuff sichern (Krupnick, Lin et al. 2009).

Li und Kollegen vereinfachten die cervikale Cuff-Technik mittels einer modifizierten „Splint-Tubing“-Technik. Dabei werden V. jugularis externa und Truncus pulmonalis mit einer venösen 24-Gauge Kanüle, sowie A. carotis communis und Aorta ascendens mit einer arteriellen 22-Gauge Kanüle miteinander verbunden.

Das Operationsverfahren der Splint-Tubing-Technik stellt eine prozedurale Vereinfachung gegenüber der Cuff-Methode dar und senkt die Operationsdauer von durchschnittlich 42 auf 35 Minuten (Li, Luo et al. 2011).

Das heterotop angeschlossene Herz erhält je nach Modell die Perfusion seiner Aortenwurzel aus der A. carotis communis oder Aorta abdominalis des Empfängertieres. Hiermit ist eine Koronarperfusion gewährleistet, die via Sinus coronarius in den rechten Vorhof drainiert wird und über den rechten Ventrikel und Truncus pulmonalis in die Vena jugularis externa oder V. cava inferior des Empfängers abströmt (vgl. Abb. 10). Es handelt sich in diesem Modell somit nicht um ein Herz mit physiologischer Auswurfleistung der Ventrikel.

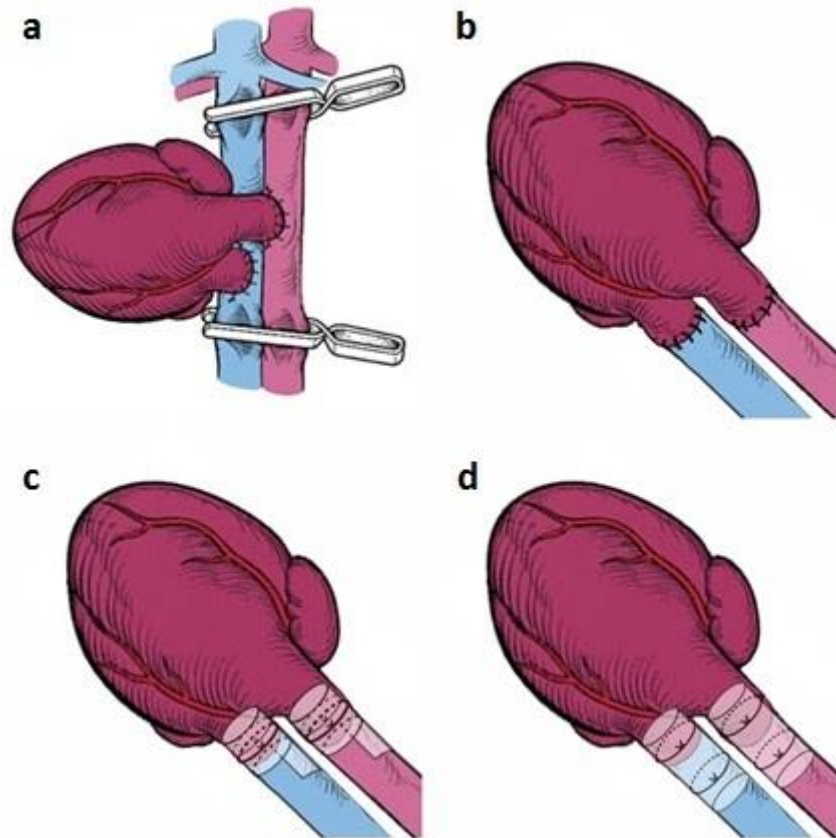


Abbildung 10: Übersicht über die verschiedenen Anastomosetechniken: (a) abdomineller Anschluss, Spenderseitig werden Aorta ascendens und Truncus Pulmonalis an Aorta abdominalis und V. cava inferior angeschlossen (Corry, Winn et al. 1973). (b) cervikaler Anschluss, Aorta ascendens wird per Gefäßnaht mit A. carotis communis und Truncus pulmonalis mit V. jugularis externa verbunden (Chen 1991). (c) Cuff-Technik bei identem Gefäßanschluss (Matsuura, Abe et al. 1991). (d) Splint-Tubing-Technik (Li, Luo et al. 2011) (Abb. modifiziert nach Hasegawa, Visvatti et al. 2007) (Hasegawa, Visovatti et al. 2007).

4.3 Transplantationsmodell

Im vorliegenden tierexperimentellen Modell wird das Herz einer BALB/c-Spendermaus heterotop, cervical in eine C57BL6-Maus transplantiert. Angeschlossen wird das Herz End-zu-End mittels einer modifizierten Cuff-Technik. Die operativen Schritte der Transplantation erfolgen unter einem Mikroskop (LEICA MZ 125) mit zusätzlicher externer Lichtquelle (LEICA CLS 150 X). Die Vergrößerung ist stufenlos einstellbar. Der verwendete Vergrößerungsbereich liegt in der Regel zwischen (4-)8-40-fach. Die Operationsdauer wurde in einem standardisiertem Zeitplan wie folgt festgelegt, um eine hohe operative Vergleichbarkeit zu schaffen: Empfängervorbereitung 35min, Explantation Spenderherz 15min, Implantation Spenderherz 10min, Klemmenöffnung (entspricht Beginn der Transplantatperfusion) 60min nach OP-Beginn, OP-Abschluss nach 65min. Bei den Ischämiegruppen Klemmenöffnung nach sechsstündiger kalter Ischämiephase.

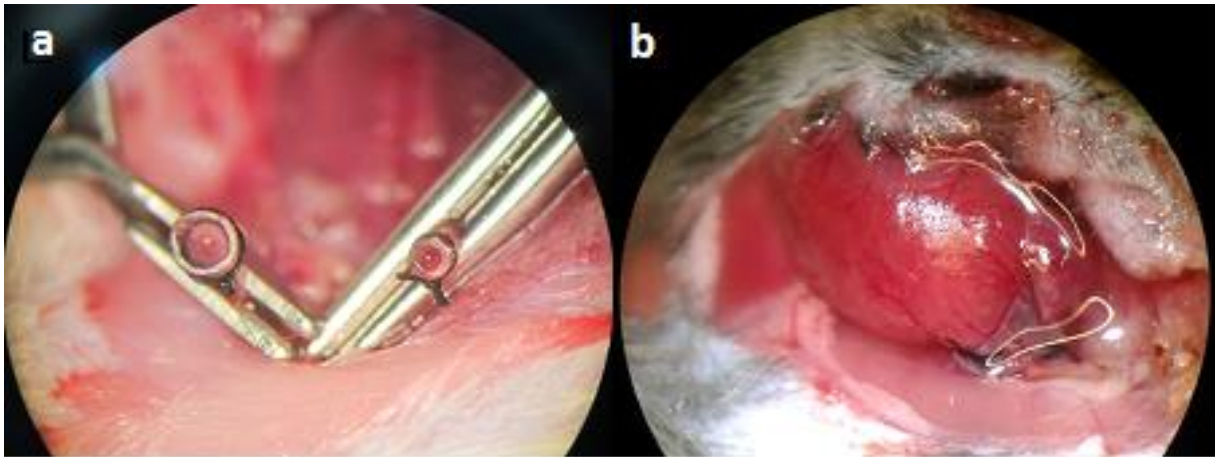


Abbildung 11: Auf der linken Seite der Abbildung (a) sieht man die abgeschlossene Empfängervorbereitung. Man erkennt jeweils die beiden gecufften Gefäßanschlüsse – links V. jugularis externa in einer venösen Klemme, rechts A. carotis communis versehen mit einer arteriellen Klemme. Das Gefäßlumen wurde jeweils durch den Kunststoffcuff geführt, nach außen über den Cuff gestülpt und abschließend mit einer Seidenligatur fixiert. Auf der rechten Seite (b) erkennt man die abgeschlossene Transplantation. Es wurden Aorta ascendens des Spenderherzens und A. carotis communis sowie Truncus pulmonalis und V. jugularis externa miteinander verbunden. Die Klemmen wurden bereits entfernt, die Koronararterien sind perfundiert und das transplantierte Herz schlägt bereits wieder.

4.3.1 Narkose und Analgesie

Sämtliche Versuchstiere erhielten ausschließlich eine intraperitoneal verabreichte Narkose. Diese setzte sich aus Ketazol (ANIMEDICA, Ketaminhydrochlorid – Anästhesie und Analgesie), Xylazol (ANIMEDICA, Xylazinhydrochlorid – Sedierung, Analgesie und Muskelrelaxation) und 0,9%iger Kochsalzlösung im Verhältnis 2:1:2 zusammen. Die einzelnen Bestandteile wurden steril aus den bei 4°C gelagerten (Dometic ML305C) Stechampullen in eine 1ml Spritze aufgezogen. Die so gewonnenen 400µl Ketazol, 200µl Xylazol und 400µl Kochsalzlösung wurden anschließend für 20 Sekunden auf dem Vortexmischer bei 2000 Umdrehungen pro Minute durchmischt. Die gebrauchsfertige Narkose wurde bis zur Applikation nach Möglichkeit gekühlt und lichtgeschützt aufbewahrt. Die zu verabreichende Narkosedosis ließ sich entsprechend dem Gewicht der Maus nach folgender Formel berechnen:

$$\frac{\text{Gewicht der Maus in Gramm}}{400} = \text{zu verabreichende Dosis in Millilitern}$$

Bei der Applikation war besonders auf die Unversehrtheit von Leber, Milz und Blase zu achten.

4.3.2 Heterotope cervikale Herztransplantation – Empfängervorbereitung

Das Empfängertier, eine C57BL6-Maus, erhielt die Narkose intraperitoneal in den rechten unteren Quadranten. Während der Injektion wurde das Tier in Rückenlage leicht kopfüber geneigt, um innere Organe nicht zu gefährden. Die Dosierung der Narkose erfolgte gewichtadaptiert in der bereits

aufgeführten Weise. Sobald das Empfängertier nicht mehr auf externe Stimuli reagierte, wurde das Operationsgebiet – rechts cervical – großzügig rasiert. Anschließend wurde die Maus in Rückenlage auf einem mit Arbeitsunterlage (Hartmann, MoliNea A) versehenem Korkbrett fixiert. Die Fixierung erfolgte an allen Extremitäten und der Schnauze des Tieres mit einem dünnen Streifen Klebeband. Zum Schutz wurden die Augen mit Siccaforte Augengel (AGEPHA) bestrichen, um Schäden durch Austrocknung zu vermeiden. Das Operationsgebiet wurde mit Skinsept Pur (Ecolab) desinfiziert. Der initiale Hautschnitt erfolgte am Oberrand des Sternums. Mit einer stumpfen Schere wurde zwischen Dermis und Subcutis in Richtung des rechten Ohransatzes der Maus präpariert. Durch zweimaliges Aufspreizen wurden die beiden Schichten großflächig voneinander getrennt und der Hautschnitt von der Inzisionsstelle bis zum Ohransatz erweitert. Das nun freiliegende Platysma sowie oberflächlich verlaufende Gefäße wurden mittels bipolarer Pinzette verödet und entfernt. Es folgte die umsichtige Darstellung der V. jugularis externa und ihrer zuführenden Gefäße, nachfolgend die Absetzung der rechtsseitig zuführenden Gefäße mittels Cauter und Mikroschere. Die Glandula submandibularis wurde nach cranial freipräpariert und möglichst nah zur Basis abgesetzt, ehe anschließend die linksseitig zuführenden Gefäße der V. jugularis externa in gleicher Weise durchtrennt wurden. Bei Mäusen der Kontrollgruppe wurde die V. jugularis externa mit einem Seidenfaden unterschlungen und cranial mit zwei Knoten ligiert. Mäusen, die eine donorspezifische Transfusion (DST) erhielten, wurde an dieser Stelle – vor dem Verknoten der Ligatur – die vorbereitete Spendersplenozytensuspension in die V. jugularis externa injiziert (300 µl über ca. 5 sec, 27 Gauge Nadel, 0,4mm Außendurchmesser). Die Blutung aus der Punktionsstelle wurde mit einem sterilen Wattestab gestillt. Die Vene wurde anschließend cranial der Ligatur mit der bipolaren Pinzette verödet und mit der Mikroschere abgesetzt. Über den kaudalen, mit der Ligatur versehenen Gefäßstumpf wurde ein venöser Cuff aus Kunststoff gestülpt und mit einer venösen Klemme von lateral möglichst weit kaudal fixiert, sodass der Gefäßstumpf mühelos bearbeitet werden konnte. Die V. jugularis externa wurde nun unterhalb der Ligatur mit der Mikroschere abgesetzt und mit einer (1:10 verdünnten) Heparinlösung beträufelt, um die Gefäßwand geschmeidig zu machen und vor dem Austrocknen zu schützen. Die Vene wurde behutsam über den venösen Cuff gestülpt und mit einem vorbereiteten Seidenloop mit insgesamt drei Knoten fixiert. Die Enden der überstehenden Seide wurden möglichst kurz durchtrennt. Beim Vorgang des Cuffens musste eine Rotation der Vene vermieden werden, um den späteren Abfluss des Blutes vom Spendertransplantat zu gewährleisten. Nach Abschluss der Vorbereitung des venösen Transplantatanschlusses (gecuffte V. jugularis externa des Empfängers) wurde dieser erneut mit Heparinlösung beträufelt und nach Möglichkeit vorsichtig unter freiliegendem Gewebe verwahrt, um einer Austrocknung vorzubeugen. Die Vorbereitung des arteriellen Anschlusses begann mit dem Aufsuchen des M. sternocleidomastoideus. Dieser wurde cranial, vor allem aber kaudal sorgfältig verödet, um eine venöse Blutung zu vermeiden. Der

Muskelbauch wurde mit der Mikroschere abgetrennt. Es wurde die Carotisscheide aufgesucht und die A. carotis communis unter Schonung des N. vagus freigelegt. Die pulsierende Arterie wurde unterhalb des Glomus caroticum mit zwei unmittelbar benachbart sitzenden Seidenligaturen umschlungen und zwischen den Ligaturen abgesetzt. Simultan zum venösen Cuffvorgang wurde nun ein arterieller Kunststoffcuff über den entstandenen Gefäßstumpf der A. carotis communis gestülpt, kaudal mit einer arteriellen Klemme von medial fixiert und das Gefäß erneut direkt unterhalb der Ligatur abgesetzt. Der eröffnete Gefäßstumpf wurde mit verdünnter Heparinlösung beträufelt und mittels Dilatatoren behutsam dilatiert. Die arterielle Dilatation war aufgrund der zarten Arterienwand der anspruchvollste Abschnitt der gesamten Transplantation. Hilfreich war es, vor dem Dilatieren einen Tropfen der Heparinlösung im Dilatator aufzuspannen, um das Endothel der Arterie beim Dilatationsvorgang geschmeidig zu halten. Wenn der Arterien Durchmesser bezogen auf den Durchmesser des arteriellen Cuff ausreichend dilatiert war, konnte die Arterie behutsam über den Cuff gestülpt werden. Aufgrund der muskulären Beschaffenheit der Arterienwand neigte diese dazu, vom Cuff herunterzugleiten. Dies konnte durch längeres in Position halten oder durch „Antrocknen“ der Arterienwand am Cuff mit einem Wattestäbchen vermieden werden. Das Arterienende wurde ebenfalls mit einem Seidenloop umschlungen, mit drei Knoten fixiert und die Enden der Seidenfäden kurz abgeschnitten. Abschließend wurde auch der arterielle Transplantatanschluss erneut mit Heparin beträufelt. Die vorbereiteten Empfängergefäße wurden in einer 0,9%igen NaCl-Lösung vor dem Austrocknen geschützt und die Maus mit einer Dachkomresse bedeckt auf einer Wärmeplatte (MEDAX 13511) gelagert.

4.3.3 Heterotope cervikale Herztransplantation – Transplantatexplantation

Die Explantation des Spenderherzens erfolgte aus einer BALB/c-Maus. Die Narkosegabe glich der der Empfängervorbereitung. Nachdem das Spendertier nicht mehr auf Schmerzreiz reagierte, wurden Abdomen und Thorax rasiert, das Tier wie oben bereits beschrieben fixiert und das Operationsfeld desinfiziert. Diesmal erfolgte der Hautschnitt median aus der umbilicalen Region bis zum Unterrand des Sternums, dabei wurden Haut und Muskulatur vollständig durchtrennt. Auf halber Strecke erfolgte beidseits je ein großzügiger Entlastungsschnitt. Der aufliegende Dünndarm wurde mit einem Wattestäbchen sanft verlagert, bis die V. cava inferior gut einsehbar war. Mit einer feinen Nadel, wurde nach sorgfältiger Entlüftung des Kolbens eine (1:4 mit 0,9% NaCl verdünnte) Heparinlösung injiziert. Wahlweise konnte die Nadel zur Vermeidung einer unkontrollierten Blutung belassen oder die unvermeidliche Blutung nach der Injektion mit einem Wattestäbchen gestoppt werden. Sobald die Blutung beherrscht war, wurde der Brustkorb mit einer groben, stumpfen Schere eröffnet. Dazu wurde das Zwerchfell lateral von caudal durchstoßen und die Rippen dorsolateral beidseits durchtrennt. Das restliche Zwerchfell wurde mittels Mikroschere durchtrennt. Der vordere Teil des

Brustkorbes wurde mit einer groben Klemme, die am Xyphoid ansetzt, nach kranial umgeklappt. Die spitzen, abgetrennten Rippenenden konnten mit sterilen Kompressen belegt werden, um das noch schlagende Herz zu schützen. Der Thymus wurde im Ganzen abpräpariert, die A. pulmonalis und der Aortenbogen wurden bis ungefähr auf Höhe des abgehenden Truncus brachiocephalicus freigelegt. Beide Vv. cavae superiores und die V. cava inferior wurden mit der Mikroschere je zur Hälfte durchtrennt, so dass zum Herzen zurückströmendes Blut in den eröffneten Thorax austrat. Mittels sterilem Tupfer wurde das Herz nun nach kaudal auf leichte Spannung gebracht. Eine Pinzette griff den bereits freipräparierten Aortenbogen, spannte ihn vorsichtig nach kranial. Eine feine Nadel stach anschließend kranial des Truncus brachiocephalicus in den Aortenbogen, um das Herz mit (vier Grad kalter) druckvoll injizierter Custodiol Perfusionslösung (HS Pharma) retrograd zu perfundieren und das restliche Blut via geöffnete Vv. cavae superiores und inferior auszuschwemmen. Das Herz stellte an dieser Stelle seine Pumpfunktion ein. Aorta und A. pulmonalis wurden mit großzügigem Abstand zu den Taschenklappen abgesetzt. Die Hohl- und Pulmonalvenen wurden mit einer gemeinsamen Sammelligatur abligiert und durchtrennt. Die Herzen der Ischämiegruppen wurden anschließend für sechs Stunden in einem mit Perfusionslösung gefülltem 15ml Falcon (BD FALCON 15ml High-Clarity Polypropylene Conical Tube) im Kühlschrank auf Eis gelagert.

4.3.4 Heterotope cervikale Herztransplantation – Transplantatanschluss

Die vorbereiteten, gecufften Empfängergefäße wurden zum Anschluss des Transplantats ausgerichtet. Um eine gute Stabilität zu erreichen, wurden arterielle und venöse Klemme unter den Schnitträndern des ersten Hautschnitts eingespannt. Das Spenderherz wurde um 180 Grad gedreht, dem Hautschnitt folgend, mit der Herzspitze auf das rechte Ohr weisend in das Operationsfeld gelegt. Die jeweils zu verbindenden Strukturen lagen sich nun gegenüber. Das waren empfängerseitig A. carotis communis und spenderseitig Aorta ascendens, die den blutversorgenden Part übernahmen, sowie empfängerseitig V. jugularis externa und spenderseitig A. pulmonalis, die den Rückstrom des Blutes aus dem Transplantat ermöglichten. Die Arterien des Transplantats wurden mit der Mikroschere auf die passende Länge gebracht. Gecufft wurde anschließend zuerst der das Blut abtransportierende Schenkel. Dazu wurde ein Seidenloop über die A. pulmonalis gestülpt, ehe diese selbst über die vorbereitete V. jugularis externa gezogen wurde. Der Seidenloop wurde nun mit den Mikropinzetten so über der Gefäß- und Gefäß-Cuff-Verbindung platziert, dass beim Verknoten der Seide eine kontinuierliche Endothel-Endothel Kontinuität zwischen A. pulmonalis und V. jugularis externa entstand. Das entsprechende Verfahren wurde anschließend ebenfalls zwischen Aorta ascendens und A. carotis communis angewendet, so dass auch hier eine kontinuierliche Endothelverbindung geschaffen wurde. Es war darauf zu achten, an dieser Stelle keine Luft in die Gefäße einzubringen, um der Gefahr von Luftembolien vorzubeugen. Nun konnte mit dem venösen

Klemmenhalter die venöse Klemme geöffnet werden, um den venösen Abfluss freizugeben. Anschließend wurde die arterielle Klemme geöffnet. Die Herzkranzgefäße des Transplantates wurden augenblicklich von der pulsierenden A. carotis communis des Empfängertieres perfundiert. Ebenso gelangte eine kleine Menge Blut retrograd durch die Aortenklappe in den linken Ventrikel und weiter durch die Mitralklappe in das linke Atrium. Das Herz begann rasch seine Kontraktion wieder aufzunehmen. Diese führte allerdings aufgrund eines fehlenden, suffizienten Blutzufusses in den linken Ventrikel nicht zu einem effektiven Blutausswurf. Die Koronarperfusion wurde via Koronarsinus in den rechten Vorhof drainiert. Von dort wurde über den rechten Ventrikel und die Pulmonalarterie der Abfluss in die angeschlossene V. jugularis externa des Empfängers gewährleistet. Die Ventrikelkontraktion ermöglichte es, den Zeitpunkt des Funktionsverlustes des Transplantats fingerpalpatorisch genau festzustellen. Die fingerpalpatorische Kontrolle erfolgte nach Transplantation routinemäßig zweimal täglich. Abschließend wurde der Hautschnitt mittels Prolene 5-0 (ETHICON) fortlaufend vernäht. Die Maus wurde in Bauchlage auf einer sterilen Kompresse bis zum Erwachen aus der Narkose auf der Wärmeplatte gelagert.

4.4 Isolierung der Spendersplenozyten

4.4.1 Entnahme der Spendermilz

Die spenderspezifische Splenozytentransfusion (DST) wurde entsprechend dem Herzen aus einer männlichen BALB/c-Maus gewonnen. Das Spendertier erhielt vor Beginn des Eingriffs ebenfalls eine intraperitoneal verabreichte Narkose. Um eine Verunreinigung des Arbeitsfeldes durch Haare bestmöglich zu vermeiden, wurde das Eingriffsgebiet großzügig rasiert. Die Maus wurde in rechter Seitenlagerung auf einem mit einer Arbeitsunterlage versehenem Korkbrett mittels Klebestreifen fixiert. Anschließend erfolgte die Desinfektion des Arbeitsbereiches mit Scinsept Pur (Ecolab). Der Hautschnitt erfolgte entlang des linken Rippenbogens von medial nach lateral und wurde zur Verbesserung des Sichtfeldes durch ein bis zwei zusätzliche Entlastungsschnitte erweitert. Nach Eröffnen der Bauchhöhle galt es, die Milz vorsichtig darzustellen – dazu eigneten sich Wattestäbchen. Die Milz wurde entlang ihrer Gefäßstiele abgesetzt und das Organ zur Weiterverarbeitung in Dulbecco's PBS-Lösung (PAA Laboratories) auf Eis gelagert. Nach erfolgter Organentnahme wurde die Maus durch cervikale Dislokation sakrifiziert.

4.4.2 Herstellung der Zellsuspension

Die nachfolgenden Arbeitsschritte erfolgten an einer sterilen Zellkulturbank mit Laminar-Flow (Steril-POLARIS compact). Medium (RPMI 1640; 10% fetal calf serum (FCS); 1% Glutamin; 100µg/ml Penicillin; 25µl β-Mercaptoethanol from 1M stock solution) und Zelllösung wurden nach Möglichkeit stets auf Eisuntergrund (ZIEGRA Eismaschine) gelagert. Histopaque (SIGMA 1083) wurde bei Raumtemperatur und lichtgeschützt aufbewahrt.

Die explantierte Milz wurde in eine Petrischale gegeben und mit 10ml Medium bedeckt. Die Kapsel der Milz wurde mit dem Skalpell (HEINTEL Carbon Steel 11er Skalpellklinge) eröffnet und entfernt, ohne Anteile der Milz zu verwerfen. Anschließend wurde die Milz mit dem Skalpell in der Petrischale zerrieben. Die entstandene Lösung wurde durch einen Nylon-cell-strainer (Zellsieb) mit einer Meshgröße von 100µm (FALCON Cell Strainer 100 µm Nylon) in ein 50ml Falcon-Tube (BD FALCON 50ml Polypropylene Conical Tube) gefiltert. Im Zellsieb verbliebene Milzrückstände konnten vorsichtig mit einem Spritzenstempel durch das Zellsieb gerieben werden. Um im Mesh verbliebene Milzbestandteile nicht zu verlieren, wurde das Zellsieb mit 30ml Medium nachgespült.

Das Falcon-Tube mit der Splenozytenlösung wurde in einer auf 4°C vorgekühlten Zentrifuge (EPPENDORF 5810 R) bei 1200 rpm (round per minute) für zehn Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde mit einer Senk-/Hebepipette (DRUMMOND pipet-aid XL) abgehoben, ohne das entstandene Pellet (sedimentierte Zellsuspension) zu gefährden. Das Pellet wurde mit 5ml Medium bedeckt und durch wiederholtes Aufziehen und Ablassen mit einer Pipette vollständig resuspendiert. In einem weiteren 15ml Falcon-Tube wurden 3ml Histopaque vorgelegt. Die Zellsuspension wurde nun mit einer Pipette unter großer Vorsicht, das heißt ohne in die Histopaqueschicht einzudringen, auf das Histopaque pipettiert. Dazu empfahl es sich, das Falcon-Tube ausreichend zu neigen, um die Wucht des Auftreffens der Zellsuspension auf das Histopaque möglichst gering zu halten. Das Falcon-Tube wurde bei Raumtemperatur (23°C) und 2000 rpm für 30 Minuten zentrifugiert. Um den Effekt der Trennung via Dichtegradient zu erhalten, durfte die Zentrifuge nicht abgebremst werden, sondern musste frei auslaufen (vgl. Abb. 12).

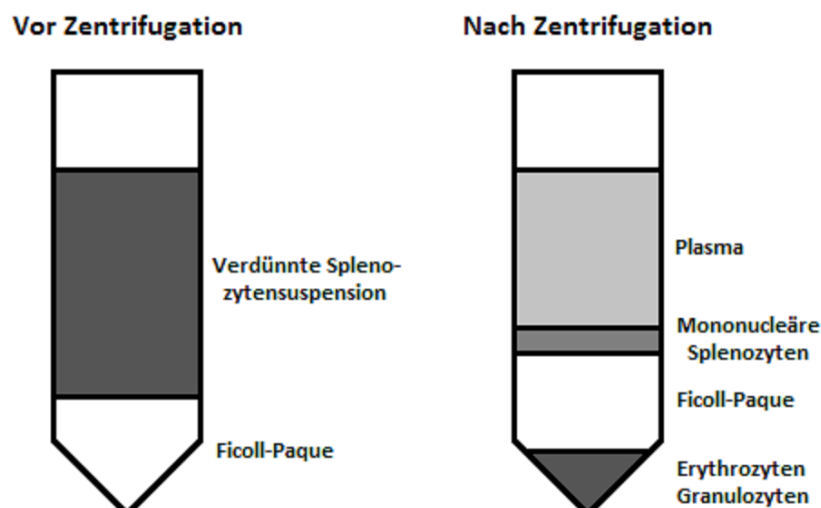


Abbildung 12: Das Bild vor Zentrifugation zeigt das vorgelegte Histopaque mit der aufgelegten Zellsuspension. Nach Zentrifugation sind die einzelnen Bestandteile entsprechend ihrer spezifischen Dichte übereinander angeordnet. Benötigt wurden die mononucleären Zellen im Splenozyten-Layer. Sie wurden mittels Pipette vorsichtig abgehoben. Modifiziert nach Feldmann and Mogelsky 1987 (Feldmann and Mogelsky 1987).

Der nun auf der Histopaqueschicht aufliegende Splenozyten-Layer wurde mit einer Pipette abgehoben und in ein neues 50ml Falcon-Tube gegeben. Zu den Splenzoyten wurden 40ml Medium in das Falcon-Tube pipettiert. Anschließend wurde es bei 4°C und 1500 rpm für 15 Minuten zentrifugiert.

Der Überstand wurde erneut verworfen und das Pellet mit 40ml Dulbecco's PBS (PAA Laboratories) resuspendiert. Die Zelllösung wurde nun mit einem Nylon-cell-strainer mit einer Meshgröße von 40µm (BD FALCON Cell Strainer 40 µm Nylon) in ein 50ml Falcon Tube gefiltert. Die Splenozytensuspension wurde bei 4°C und 1200rpm für zehn Minuten zentrifugiert.

Der Überstand wurde verworfen und das Pellet mit 10ml Nährmedium resuspendiert. Die Zellsuspension wurde anschließend aktiviert und in einem Inkubator bebrütet.

4.4.3 Aktivierung und Inkubation

Die Aktivierung der Spendersplenozyten erfolgte durch die Zugabe von 5µg/ml Concanavalin A. Concanavalin A ist ein Pflanzenlektin, das zur unspezifischen Stimulierung von Lymphozyten verwendet wird. Die Zellsuspension wurde in eine Zellkulturflasche (CELLSTAR Tissue Culture Flasks) gegeben und bei 37°C für 24 Stunden im Inkubator (BINDER) bebrütet.

4.4.4 Herstellung des DST-Aplikats

Nach eintägiger Brutphase wurden die an Boden und Wand haftenden Zellen der Suspension mit Hilfe eines Cell-Scrapers (COSTAR 3010) gelöst und mit der Suspension in ein 50ml Falcon-Tube transferiert. Um den Zellverlust gering zu halten, folgten zwei weitere Spülvorgänge der Zellkulturflasche unter Verwendung von Dulbecco's PBS-Lösung und erneutem Einsatz des Cell-Scrapers. Das auf diese Weise gewonnene Material wurde ebenfalls in das Falcon-Tube eingebracht und anschließend in einer auf 4°C vorgekühlten Zentrifuge bei 1200 rpm für zehn Minuten abzentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das entstandene Pellet mit 40ml Dulbecco's PBS-Lösung resuspendiert. Es folgten zwei weitere Waschvorgänge bei 4°C und 1200 rpm für jeweils 10 Minuten. Anschließend wurde das Pellet in 500µl PBS-Lösung gründlich resuspendiert. Mit einer Pipette wurde ein nun bekanntes Volumen (beispielsweise 500µl) der konzentrierten Splenozytensuspension entnommen und in einem Cryoval auf Eis gelagert. 10µl wurden nach der nachfolgend beschriebenen Methodik der abschließenden Zellzählung und dem Vitalitätstest unterzogen. Die auf Eis liegende, zu injizierende DST wurde entsprechend der ermittelten Gesamtzellzahl mit PBS-Lösung auf 22.5×10^6 Zellen pro 300µl verdünnt. Die Injektion von 22.5×10^6 Spendersplenozyten erfolgte – entsprechend der OP-Beschreibung der Empfängervorbereitung – intraoperativ, intravenös in die V. jugularis externa, bevor diese ligiert wurde.

4.4.5 Zellzählung und Vitalitätstest

Die Gesamtzellzahl und Vitalität der Spenderleukozyten wurde mit Hilfe einer Zellzählkammer vom Typ Neubauer improved (Neubauer Improved Cellcounter) mit einer Tiefe von 0.1mm und einer Kästchengröße von 0.0025mm² ermittelt. Die Zellsuspension wurde im Verhältnis 1:1:10 mit Trypanblau- (SIGMA trypan blue solution 0.4%) und Dulbecco's PBS-Lösung verdünnt. Es wurden entsprechend 10µl der Zellsuspension, 10µl Trypanblau- sowie 100µl PBS-Lösung in einem Cryoval vorgelegt und mit einer Pipette durchmischt. 10µl der entstandenen, dunkelblauen Lösung wurden mittels Pipette am Rand zwischen den Kanten der Neubauerzellzählkammer und dem Deckglas abpipettiert. Bei korrekter Auflage des Deckglases wurde die Lösung per Kapillarwirkung eingesogen und die Zählkammer vollständig gefüllt. Die Auszählung erfolgte per Handzähler (IVO Counter) unter dem Mikroskop (ZEISS Primo-Star). Es mussten mindestens zwei Felder (jeweils 16 Quadrate) der Neubauer improved Zählkammer ausgezählt werden. Wichen die Ergebnisse der einzelnen Felder um mehr als zehn Prozent voneinander ab, musste die auszuzählende Lösung neu angesetzt werden. Die Gesamtzellzahl wurde nach der folgenden Formel berechnet.

$$\frac{\text{number of counted cells}}{\text{number of counted quadrates}} \times \text{volume} \times \text{dilution} \times 10^4 = \text{total cell count}$$

Durchschnittlich können aus einer 6-8 Wochen alten BALB/c-Milz bis zu 80 – 100 x 10⁶ Spenderleukozyten gewonnen werden.

4.4.6 Durchflusszytometrie und Gatingstrategie

Die durchgeführte Durchflusszytometrie diente der Evaluierung der Zellvitalität und Determination der einzelnen Subklassen anhand spezifischer Epitope. Die Methode beruht auf der Emissionsmessung von Streulicht und Fluoreszenz der einzelnen Zellen. Als Lichtquelle dient ein Laser mit einer Wellenlänge von 488 Nanometer. Die Färbung einzelner Zellgruppen erfolgt mittels spezifischer Fluoreszenzmarker, die an die Epitope der Zellen binden. Pro Sekunde können mit diesem Verfahren mehrere Tausend Zellen charakterisiert werden (Ahmed, Friend et al. 2009).

Für die Charakterisierung der murinen lymphozytären Subpopulationen wurden folgende zellspezifische Marker gewählt. B-Lymphozyten wurden als CD45R/B220⁺-Zellen klassifiziert. Eine Unterteilung in naive und reife B-Lymphozyten erfolgte anhand der Oberflächenmarker CD19 und CD27. Naive B-Lymphozyten sind definitionsgemäß CD19⁺/CD27⁻, reife B-Lymphozyten sind CD19⁺/CD27⁺.

T-Lymphozyten sind als CD3⁺-Zellen definiert. Sie lassen sich einteilen in CD4⁺-T-Helferzellen und CD8⁺-zytotoxische T-Lymphozyten (vgl. Abb. 16). Regulatorische T-Zellen (Tregs) definieren sich als CD3⁺/CD4⁺/CD25⁺/FoxP3⁺ Zellen.

Natural-Killer-(NK-)Cells lassen sich phänotypisch als CD3⁻/NKp46⁺-Zellen klassifizieren. Dendritische Zellen sind positiv für den Oberflächenmarker CD11c.

4.5 Gruppenübersicht

In der vorliegenden Arbeit wurden insgesamt fünf verschiedene Gruppen untersucht. Unterschieden wurde zwischen Kontrollgruppen (mit und ohne Ischämiephase), DST-Gruppen (mit und ohne Ischämiephase) sowie einer DST+Resveratrol-Gruppe (potentieller, nicht toxischer HO-1 Induktor). Tabelle 2 führt die einzelnen Gruppen, Anzahl der Tiere und Zeitpunkte der Organentnahme auf.

	Tag 1	Tag 3	Tag 5	Finale Abstoßung
Kontrolle	5	5	5	
DST	5	5	5	
DST + RESV30	5	5	5	
Kontrolle + Ischämie	5	5	5	5
DST + Ischämie	5	5	5	5

Tabelle 2: Gruppenübersicht: In der linken Spalte sind die untersuchten Gruppen aufgeführt. Es wurde zwischen ischämischen und nicht-ischämischen Gruppen unterschieden. Die erste Zeile gibt Auskunft über den Untersuchungszeitpunkt. Die Zahlen geben die Tiere pro Gruppe und Zeitpunkt an. In diesem Projekt wurden pro Gruppe und Zeitpunkt je fünf Tiere (n=5) untersucht.

Pro Gruppe wurden jeweils fünf Empfängertiere nach 1, 3 und 5 Tagen untersucht. Dies ermöglicht es, Aussagen über den Verlauf der akuten Abstoßung treffen zu können. Ausnahme bilden die beiden Langzeitgruppen. Die Organe dieser Gruppen wurden erst nach fingerpalpatorisch gesicherter Einstellung der Organfunktion entnommen.

Da lediglich die Gruppe mit Ischämiephase der klinischen Realität einer Herztransplantation entsprechen, werden deren Ergebnisse vorrangig vorgestellt und diskutiert. Die Nicht-Ischämiegruppen dienen der Modell-Etablierung und einer ersten Einschätzung eines möglichen DST-Effekts.

4.6 Untersuchungszeitpunkt

Als Untersuchungszeitpunkte wurden Tag 1, 3, 5 sowie der Zeitpunkt der funktionslimitierenden Abstoßung (=Einstellen der Kontraktion) festgesetzt. Die Mäuse wurden zur Probenentnahme sakrifiziert. Spenderherz, Lymphknoten und Milz wurden zur weiteren Untersuchung mittels q-PCR und histologischer Aufbereitung entsprechend verarbeitet. Die Lagerung der histologisch aufzubereitenden Proben erfolgte in 10%iger Formalinlösung, während die Proben zur PCR-Auswertung in flüssigem Stickstoff schockgefroren und anschließend bei -80°C gelagert wurden.

4.7 Histologische Aufarbeitung

Die Histologie stellt derzeit den Goldstandard für eine zuverlässige Klassifikation der akuten, zellulären Abstoßung bei transplantierten Herzen dar. Der histopathologischen Auswertung liegt die 2004 überarbeitete Klassifikation der „International Society of Heart and Lung Transplantation“ (ISHLT) zu Grunde. Sie wird in vier Kategorien von 0R bis 3R unterteilt. 0R bedeutet keine lymphozytäre Infiltration und gibt keinen Hinweis auf zelluläre Abstoßung. 3R beschreibt eine schwere Abstoßung mit diffusen Infiltraten und multifokaler Schädigung von Myozyten, die von Ödemen, Einblutungen und Vasculitits begleitet sein kann (vgl. Abb. 13) (Stewart, Winters et al. 2005).

ISHLT-2004 Acute Cellular Rejection Grading Scheme

Grade	Histopathologic findings
0R, none	None
1R, mild	Interstitial and/or perivascular infiltrate with up to 1 focus of myocyte damage
2R, moderate	Two or more foci of infiltrate with associated myocyte damage
3R, severe	Diffuse infiltrate with multifocal myocyte damage ± edema ± hemorrhage ± vasculitis

Abbildung 13: ISHLT-(International Society of Heart and Lung Transplantation)-2004-Kriterien. Die histopathologischen Ergebnisse werden je nach Grad der Abstoßung nach den obenstehenden Kriterien in 0R, 1R, 2R und 3R unterteilt (Stewart, Winters et al. 2005).

Zur Bestimmung des Abstoßungsgrades der transplantierten Herzen des Mausmodells wurde je ein gevierteltes, halbes Herz in gepufferter, 10%-er Formalin-Lösung mit einem pH-Wert von 7.2 fixiert, gelagert und anschließend in Paraffin gebettet. Der Gewebeschnitt ist vier Mikrometer dick und wurde mit Hämatoxylin und Eosin gefärbt. Als histopathologisches Scoringssystem wurde die oben beschriebene ISHLT-2004-Klassifikation herangezogen. Die Bewertung wurde jedoch verfeinert, indem Schäden jeweils an Epikard, Myokard, Endokard und zusätzlich entzündliche Zellinfiltrate einzeln von 0R bis 3R (0R = no damage, 1R = mild damage, 2R = moderate damage, 3R = severe damage) bewertet wurden. Somit ergibt sich ein kumulativer Score, der zwischen 0 und 12 liegen kann (Atkinson, He et al. 2010).

Zur Dehydratation der histologischen Gewebeproben wurde eine aufsteigende Alkoholreihe verwendet. Die in 10%-er Formalin-Lösung gelagerten Herzen wurden dafür aus den Cryovials entnommen und in Gewebecages gegeben. Anschließend wurden die Proben für 20 Minuten unter fließendem Wasser gespült. Die nachfolgenden Schritte in aufsteigend konzentrierter Ethanollösung,

Xylol und Paraffin dauerten jeweils eine Stunde. Begonnen wurde mit einer 70%igen vergällten Ethanollösung. Es folgten Schritte in 80%igem, 90%igem und 100%igem jeweils vergälltem Ethanol. Abgeschlossen wurde mit unvergälltem 100%igem Ethanol. Es folgten zwei einstündige Schritte in Xylol. Nach einstündiger Lagerung in flüssigem Paraffin konnten die Proben nun zum Schneiden in Paraffinblöcke eingegossen werden.

Schneiden des in Paraffin gegossenen Gewebes am Mikrotom, sowie Aufziehen der angefertigten Schnitte auf einen Objektträger, Hydrieren der aufgezogenen Proben, Hämatoxylin-Eosin-(HE)-Färbung der Probe, Konservieren des angefertigten Präparats und abschließend dessen Befundung mittels ISHLT-Rejection-Score wurde von Frau Dr. Brunner im Pathologischen Institut Innsbruck durchgeführt.

4.8 Real-Time-quantitative-PCR

Die Real-Time-quantitative-PCR (q-PCR) ist ein Verfahren, das ermöglicht, bereits kleinste Mengen von Nukleinsäuren zu erkennen und mit Hilfe von Fluoreszenzmarkierung quantitativ zu messen. Die Durchführung der Methode ist aufgrund der hohen Standardisierung relativ einfach zu erlernen. Die q-PCR zeichnet sich besonders durch kurze Auswertungszeiten sowie hohe Sensitivität und Spezifität aus. Folgende Primer und Probensequenzen wurden verwendet (vgl. Tabelle 3).

q-PCR: Probensequenzen und Primer		
Murines HPRT	Probe	TGG ACA GGA CTG AAA GAC TTG CTC GAG ATG
	Primer forward	ATC ATT ATG CCG AGG ATT TGG AA
	Primer reverse	TTG AGC ACA CAG AGG GCC A
Murines IL-6	Probe	CTC TGC AAG AGA CTT CCA TCC AGT TGC CT
	Primer forward	TCC AGA AAC CGC TAT GAA GTT CC
	Primer reverse	GTC ACC AGC ATC AGT CCC AAG
Murines IL-10	Probe	CGC TGT CAT CGA TTT CTC CCC TGT GA
	Primer forward	GAA GAC CCT CAG GAT GCG G
	Primer reverse	CCT GCT CCA CTG CCT TGC T
Murines FoxP3	Probe	ATC CTA CCC ACT GCT GGC AAA TGG AGT C
	Primer forward	CCC AGG AAA GAC AGC AAC CTT
	Primer reverse	TTC TCA CAA CCA GGC CAC TTG
Murines TGFβ	Probe	CAC ACA GTA CAG CAA GGT CCT TGC CCT
	Primer forward	CCC TGC CCC TAT ATT TGG A
	Primer reverse	ACG GTG ACG CCG AAG CGC
Murines TNFα	Probe	CGT CGT AGC AAA CCA CCA AGC GGA
	Primer forward	TCG AGT GAC AAG CCC GTA GC
	Primer reverse	CTC AGC CAC TCC AGC TGC TC
Murines HO-1	Assay-on-Demand	Lifetechnologies - Mm00516005_m1

Tabelle 3: Die Tabelle zeigt die Probensequenzen und verwendeten Primer. Als Primer für murines HO-1 wurde ein Assay-on-Demand von Lifetechnologies (Wien) verwendet (Mm00516005_m1, Katalognummer: 4331182).

4.8.1 mRNA-Aufbereitung

Für die Aufbereitung der mRNA wurde das Nucleo-Spin RNA II Kit von Machery Nagel verwendet (Machery-Nagel, Düren). Die nachfolgenden Schritte sind an das Protokoll „Total RNA purification from tissue with NucleoSpin RNA II“ von Machery Nagel angelehnt. Es wurden lediglich kleine Modifikationen vorgenommen.

Das Zerkleinern der gefrorenen Gewebeproben erfolgte mit einem Mixer Mill MM400 (Retsch). Dazu wurden zwei bis drei Eisenkugeln in ein 2ml Eppendorf Tube eingebracht. Für optimales Zerstoßen war darauf zu achten, Eisenkugeln mit geeigneten Durchmesser – je nach Gewebe zwischen fünf und sieben Millimetern – und abgerundete Tubes zu verwenden. Auf die Eisenkugeln wurde 1ml RA-1-Buffer und 10µl β-Mercaptoethanol pipettiert. Die noch gefrorene Gewebeprobe wurde mittels Pipettenspitze aus dem Cryoval in das 2ml Eppendorf Tube eingebracht. Anschließend wurde die Gewebeprobe für 3 Minuten bei einer Frequenz von 30 Schwingungen pro Sekunde im MM400 zerkleinert. Das Gemisch aus RA-1-Buffer und β-Mercaptoethanol lysierte die Zellen. Die Nukleinsäuren lagen nun frei in der Suspension vor.

Aus dem gewonnenen Lysat wurden 650µl über einen rosa Filter in ein neues 2ml Eppendorf Tube vorgelegt. Dieses wurde anschließend bei 14000 rpm für eine Minute in einer Mikrozentrifuge Mikro 120 (Hettich) filtriert und zentrifugiert. Der rosa Filter wurde verworfen und 1ml 70%iger Ethanol auf die Probe aufgebracht und fünfmal resuspendiert. Dieser Schritt diente der Vorbereitung des RNA-Bindings. Es wurden 650µl Ethanol-Lysat-Gemisch entnommen und in einer blauen Säule, bestehend aus Filter und Auffangtube, vorgelegt. Das 2ml Eppendorf Tube mit der verbliebenen 1ml Probe-Ethanol-Mischung wurde als Backup bei -80°C tiefgefroren. Die blaue Säule wurde bei 14000 rpm für eine Minute zentrifugiert, der Filter in ein 2ml Auffangtube gegeben und der Überstand verworfen. Die RNA lag nun gebunden am blauen Filter vor. Auf den Filter wurden 340µl MDB (Membrane desalting buffer) pipettiert. MDB dient der Entsalzung der Silica-Membran. Die Entsalzung förderte die Effektivität des DNA-Verdau durch DNasen. Die Probe wurde bei 14000 rpm für eine Minute zentrifugiert, der Filter in ein 2ml Auffangtube gegeben und der Überstand verworfen. Auf den Filter wurden nun 95µl Verdaubuffer aufgebracht. Es bestand aus rDNase und DNase Buffer in einem Mischungsverhältnis von 1:10. Das rDNase-DNase-Buffer-Gemisch sollte für 30 Minuten bei Raumtemperatur auf dem blauen Filter inkubieren. Im Filter vorliegende DNA wurde durch DNase enzymatisch abgebaut. Anschließend wurde die Probe bei 14000 rpm für eine Minute zentrifugiert, der blaue Filter in ein neues Auffangtube gegeben und der Überstand verworfen.

Es folgten drei Waschvorgänge, die dem Waschen und Trocknen der Silica-Membran dienten. Es wurden 200µl RA-2 Waschbuffer auf den blauen Filter pipettiert. Das Waschbuffer inaktivierte die

DNasen. RA-2 eine Minute einwirken lassen, die Probe anschließend bei 14000 rpm für eine Minute zentrifugieren. Den blauen Filter in ein neues Auffangtube geben und Überstand verwerfen. Für den zweiten Waschschrift wurden 600µl RA-3 Waschbuffer auf den blauen Filter aufgebracht. Die Probe wurde bei 14000 rpm für eine Minute zentrifugiert, der blauen Filter in ein neues Auffangtube gegeben und der Überstand verworfen. Abschließend wurde der Filter mit 250µl RA-3 Waschbuffer belegt. Um dem Filter möglichst viel Flüssigkeit zu entziehen, wurde er für drei Minuten bei 14000 rpm zentrifugiert. Der mit gebundener RNA beladene Filter wurde nun in ein 1.5ml Eppendorf Tube gesetzt. Der Überstand wurde verworfen.

Der Filter wurde mit 60µl Ampuwa (RNase free Water) belegt und sollte für 2-3 Minuten inkubieren. Ampuwa löste die an den Filter gebundene RNA. Die Probe wurde für drei Minuten bei 14000 rpm zentrifugiert, der blaue Filter verworfen und die gelöste RNA im 1.5 ml Eppendorf Tube auf Eis gelagert.

4.8.2 Quantitative RNA-Bestimmung

Quantität und Reinheit der gewonnenen RNA wurden mittels NANODrop (Peqlab) bestimmt. Das Verfahren beruht auf der spektrophotometrischen Absorptionsmessung von RNA (vgl. Abb. 14).

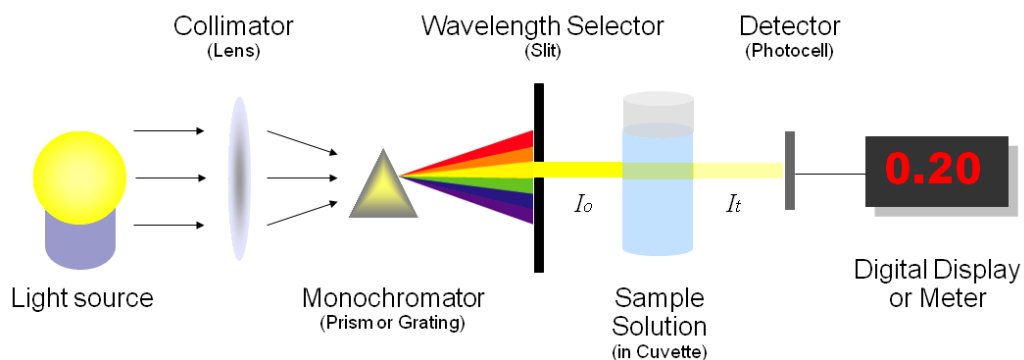


Abbildung 14: Vereinfachte Darstellung eines Spektrophotometers. Es besteht aus Lichtquelle, Linse, Monochromator, Spalt, Küvette mit zu untersuchendem Probenmaterial, photoelektrischem Detektor und digitaler Anzeige.

Vor Beginn der Messung wurde das Spektrophotometer mit 1µl Ampuwa geeicht. Die Reinigung des Probenkollektors, der dem Raum zwischen Spalt und Detektor entspricht, erfolgte mit fusselfreien Einmaltüchern (Kim wipes, fuzz free labtowels). Die Probe wurde vor dem Aufbringen für eine Minute bei 10000 rpm zentrifugiert. Mit der Pipette wurde nun 1µl Probenmaterial auf den Probenkollektor aufgetragen. Das Gerät ist in der Lage, Konzentrationen von 2ng/µl bis zu 15000ng/µl zu detektieren. Die zu erzielenden Konzentrationen waren abhängig von eingebrachtem Probenmaterial und Probenmenge. Milz und Lymphknoten waren im Vergleich zu Herzen RNA-reicher. Damit war die mRNA-Aufbereitung abgeschlossen und die Proben wurden entweder bei -80°C gelagert oder konnten direkt zur cDNA-Synthese verwendet werden.

4.8.3 cDNA-Synthese

Die cDNA wurde aus der bereits gewonnenen mRNA hergestellt. Dafür wurden 2µl OdT (Oligo-dT18-primer) in einem 0.5ml Eppendorf Tube vorgelegt. Es wurden 2µg RNA der zu untersuchenden Probe zugefügt. Für den Fall, dass keine 2µg Probe vorlagen – dies kam speziell bei Herz- und Lymphknotenproben vor – wurde die maximal verfügbare Menge eingebracht. Die Probe wurde, sofern nötig, mit Ampuwa (RNase freies Wasser) auf 20µl gebracht. Die OdT-RNA-Mischung wurde für 10 Minuten bei 75°C in einen Thermoblock (peqSTAR 96X Universal Gradient, Peqlab) gegeben. Dies diente der Dekondensation der RNA und ermöglichte den Primern sich anzulagern.

Anschließend wurde die Probe auf Eis gelagert und der Reaction-Mix vorbereitet. Der Reaction-Mix bestand aus 8µl Reaction-Buffer (from M-MLV reverse transcriptase), 4µl Ampuwa, 4µl dNTPs (desoxy-ribonucleose triphosphates (Mischung aller vier)), 2µl DNase I und 0.5µl RNase Inhibitor (RI). Das Durchmischen des angesetzten Reaction-Mix durfte nicht mittels Vortex erfolgen, da ansonsten die DNase I durch Scherkräfte geschädigt worden wären. Es musste daher mit einer Pipette vorsichtig resuspendiert werden. Es wurden 18.5µl Reaction-Mix auf die Probe pipettiert. Es folgte ein weiterer Zyklus im Thermoblock. Bei 37°C wurde die DNA für 30 Minuten verdaut. Anschließend wurde die Probe für 5 Minuten auf 75°C erhitzt, um die Enzyme zu inaktivieren.

Die Probe wurde erneut auf Eis gelagert und Reverse-Transkriptase (RT) und RNase-Inhibitor (RI) zugesetzt. Der RT-RI-Mix bestand aus 1µl Reverse-Transkriptase und 0.5µl RNase-Inhibitor. Um eine optimale Durchmischung zu erhalten, wurde die Probe kurz gevortext und abzentrifugiert.

Die Probe wurde für eine Stunde bei 42°C in den Thermoblock gegeben, damit die Reverse-Transkription erfolgen konnte. Abschließend wurde die Probe für 5 Minuten auf 95°C erhitzt, um die Enzyme zu inaktivieren. Das cDNA-Sample konnte nun zur quantitativen Messung herangezogen werden oder tiefgefroren bei -80°C gelagert werden.

5. Statistische Auswertung

Die statistische Analyse der erhobenen Daten erfolgte mit der Software GraphPad Prism 5.0 (GraphPad Software, San Diego). Das durchschnittliche Transplantatüberleben wurde mittels Kaplan-Meier-Methode bestimmt. Der Mantel-Cox-Test gab Aufschluss, ob sich die Überlebenskurven signifikant unterscheiden. Die in der Langzeitgruppe verglichenen Mediatoren wurden mit Hilfe des zweiseitigen Mann-Whitney-Tests (T-Test) auf signifikante Unterschiede überprüft. Alle weiteren Gruppen wurden mittels One-way ANOVA analysiert. Als Post-Test wurde Tukey's-Multiple-Comparison-Test angewendet. Für die verwendeten Tests gilt ein p-Wert < 0.05 als statistisch signifikant. Für die visuelle Markierung der statistischen Signifikanz in Abbildungen gilt: * = $p < 0.05$, ** = $p < 0.01$ und *** = $p < 0.001$.

6. Ergebnisse

6.1 Prozedurale Ergebnisse des heterotopen Herztransplantationsmodell

Insgesamt wurden für das Projekt 90 C57BL/6-Empfänger- und 145 BALB/c-Spendermäuse verwendet. Von den 145 BALB/c Spendertieren wurden 93 zur Herzentnahme und 52 zur Milzentnahme zur DST-Herstellung herangezogen. Die perioperative Sterblichkeit lag bei 3.53% (3 von 90 Empfängertieren). Todesursache aller drei Tiere waren Blutungen nach Herzanschluss und Klemmenöffnung. Betroffen davon waren zwei venöse Anastomosen (V. jugularis externa) und eine insuffiziente Ligatur der Pulmonalvenen. Postoperativ wurden zwei Tiere aus der Studienpopulation ausgeschlossen - eine Maus bedingt durch Hemisymptomatik nach vermutlich luftinduziertem Apoplex. Eine weitere wurde mit unklarer Todesursache am ersten postoperativen Tag tot im Käfig aufgefunden. Entsprechend konnten letztlich 94.4% (85 von 90) aller Empfängertiere in die statistische Auswertung eingeschlossen werden.

6.2 Zellzahl und Vitalität der Spendersplenozyten

Die gewonnene Zellzahl lag vor Inkubation mit Concanavalin A bei Zellzählungen in einer Neubauer improved Zellzählkammer zwischen $28 - 50 \times 10^6$ Zellen. Die Vitalität der Splenozyten vor Inkubation lag ausnahmslos bei über 95%. Nach Inkubation lag die Vitalität zwischen 50 – 60% und die durchschnittliche Zellzahl vitaler Zellen betrug 41×10^6 Zellen. Injiziert wurden anschließend 22.5×10^6 vitale Splenozyten, die auf ein Volumen von $300\mu\text{l}$ gebracht wurden. Abbildung 15 zeigt die eingebrachten Splenozyten in der Neubauer improved Zählkammer bereit zur Zellzählung.

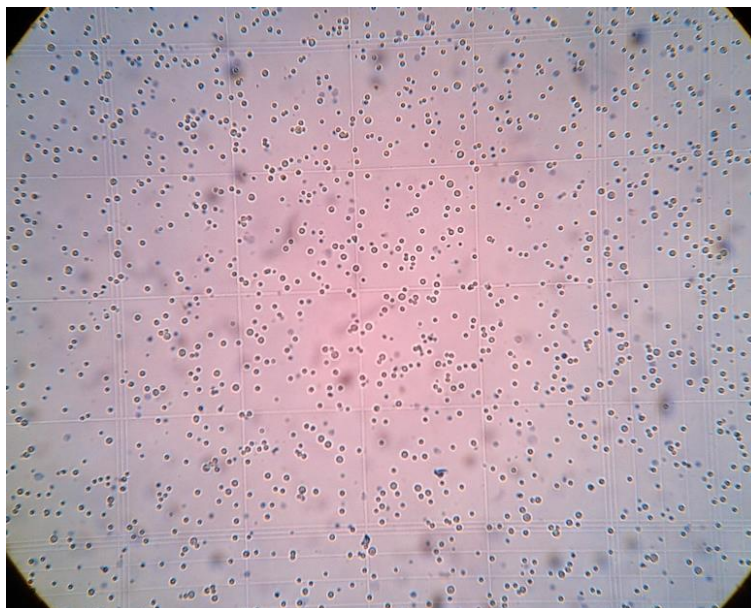


Abbildung 15: Aus einer BALB/c-Milz gewonnene Splenozyten vor 24-stündiger Inkubation mit Concanavalin A. Die Zellen werden nach Inkubation erneut mit Hilfe einer Neubauer improved Zellzählkammer gezählt und zur intravenösen Injektion auf eine Konzentration von 22.5×10^6 auf ein Volumen von $300\mu\text{l}$ gebracht.

6.3 FACS-Analyse

Verglichen wurde zwischen mit 5µg/ml Concanavalin A stimulierten murinen Splenozyten und einer Vergleichsgruppe ohne Stimulation. Die Zellvitalität der Gruppen nach Inkubation zeigte keinen Unterschied (54.0% vs. 53.9%).

Die angefügte Tabelle gibt Aufschluss über den Anteil einzelner Zellgruppen und Zelluntergruppen bezogen auf alle vitalen, gewonnenen und anschließend verabreichten Splenozyten.

	Concanavalin A	Kontrolle
B-Lymphozyten	77,30%	79,00%
CD19 ⁺ /CD27 ⁻ -naive	67,10%	69,52%
CD19 ⁺ /CD27 ⁺ -reife	4,95%	4,87%
T-Lymphozyten	10,30%	11,80%
CD4 ⁺ -T-Helferzelle	8,13%	9,59%
CD8 ⁺ -Zytotoxische	1,34%	1,40%
Regulatorische T-Lymphozyten	0,12%	0,17%
NK-Zellen	2,66%	2,91%
Dendritische Zellen	0,76%	0,74%

Tabelle 4: Prozentuale Verteilung einzelner Splenozytenpopulationen einer BALB/c Maus. Die Zellen wurden für 24 Stunden mit 5µg/ml Concanavalin A stimuliert und bei 37°C inkubiert. Aufgeführt ist der Anteil von B-Lymphozyten, T-Lymphozyten, regulatorischen T-Lymphozyten, NK-Zellen und Dendritischen Zellen bezogen auf alle vitalen Zellen mittels FACS-Analyse.

Mit Concanavalin A stimulierte DST zeigte einen B-Lymphozytenanteil von 77.3% (vs. 79.0%). Davon waren, gemessen an der Gesamtzahl der 22.5×10^6 Splenozyten, 67.1% (vs. 69.5%) naive und 4.95% (vs. 4.87%) reife B-Lymphozyten. T-Lymphozyten machten 10.3% (vs. 11.8%) der DST aus. 8.13% (vs. 9.59%) der verabreichten DST waren T-Helferzellen. 1.34% (vs. 1.4%) zytotoxische T-Zellen. Regulatorische T-Zellen machten 0.12% (vs. 0.17%) der Spendersplenozyten aus. 2.66% (vs. 2.91%) der verabreichten DST waren NK-Zellen und 0.76% (vs. 0.74%) dendritische Zellen.

Die FACS-Analyse erbrachte hinsichtlich einer Stimulation mit Concanavalin A keinen nennenswerten Effekt. Es konnten weder Selektions-, Aktivierungs- noch Proliferationsunterschiede festgestellt werden. Beispielhaft angefügt das Gatingfenster der FACS-Analyse zur Klassifizierung der T-Lymphozyten (vgl. Abb. 16).

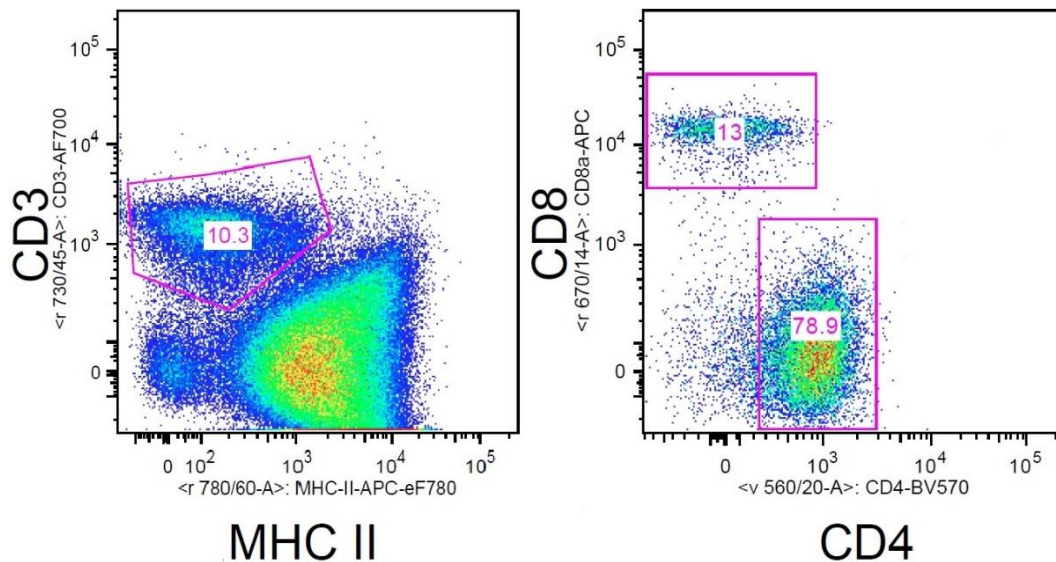


Abbildung 16: FACS-Analyse der Spenderlymphozyten: Gatingfenster der untersuchten T-Lymphozyten. Klassifizierung der T-Lymphozyten anhand exprimierter Oberflächenmarker. Links CD3-positive T-Lymphozyten. Rechts Unterteilung der T-Lymphozyten in CD4- und CD8-positiv..

6.4 Transplantatüberleben

Das mediane Transplantatüberleben des Spenderherzens in der DST+Ischämie-Gruppe war im Vergleich mit der Kontroll+Ischämie-Gruppe von 7.8 auf 14.6 Tage sehr signifikant verlängert ($p=0.0019$). Die kalte Ischämiezeit der Spenderherzen lag bei sechs Stunden. Die Gruppengröße umfasste für beide Gruppen je fünf Tiere ($n=5$) (vgl. Abb. 17).

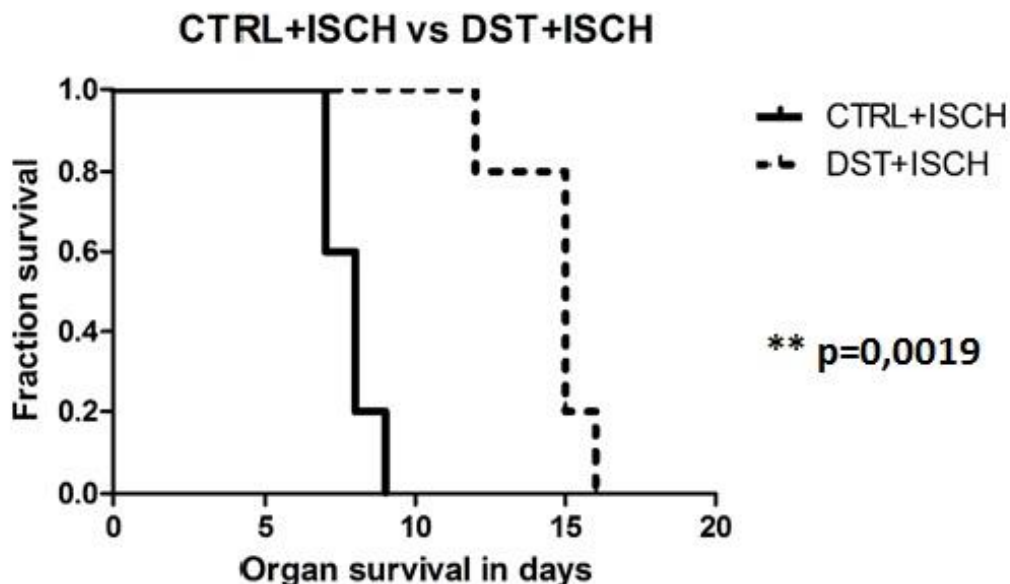


Abbildung 17: Kaplan-Meier-Überlebens-Kurve: Vergleich der Kontrollgruppe mit der DST-Gruppe. Die Spenderorgane beider Gruppen wurden während einer sechsstündigen Ischämiephase in Perfusionslösung auf Eis gelagert. Die Abbildung zeigt das fingerpalpatorisch bestimmte Organsurvival der Spenderherzen bei einer Gruppengröße von $n=5$. Das mediane Organsurvival konnte durch DST-Gabe sehr signifikant von 7.8 auf 14.6 Tage gesteigert werden ($p<0.01$).

6.5 Histologie

Verglichen wurden Gewebeschnitte der DST- und Kontrollgruppe, mit jeweils sechsständiger Ischämiephase des Spenderherzens in eisgekühlter Perfusionsflüssigkeit, an Tag 5 nach Transplantation. Dabei zeigte sich in der Bewertung mittels ISHLT-Score und im kumulativen modifizierten ISHLT Score ein geringerer Abstoßungsschweregrad in der DST-Gruppe (vgl. Abb. 18-21).

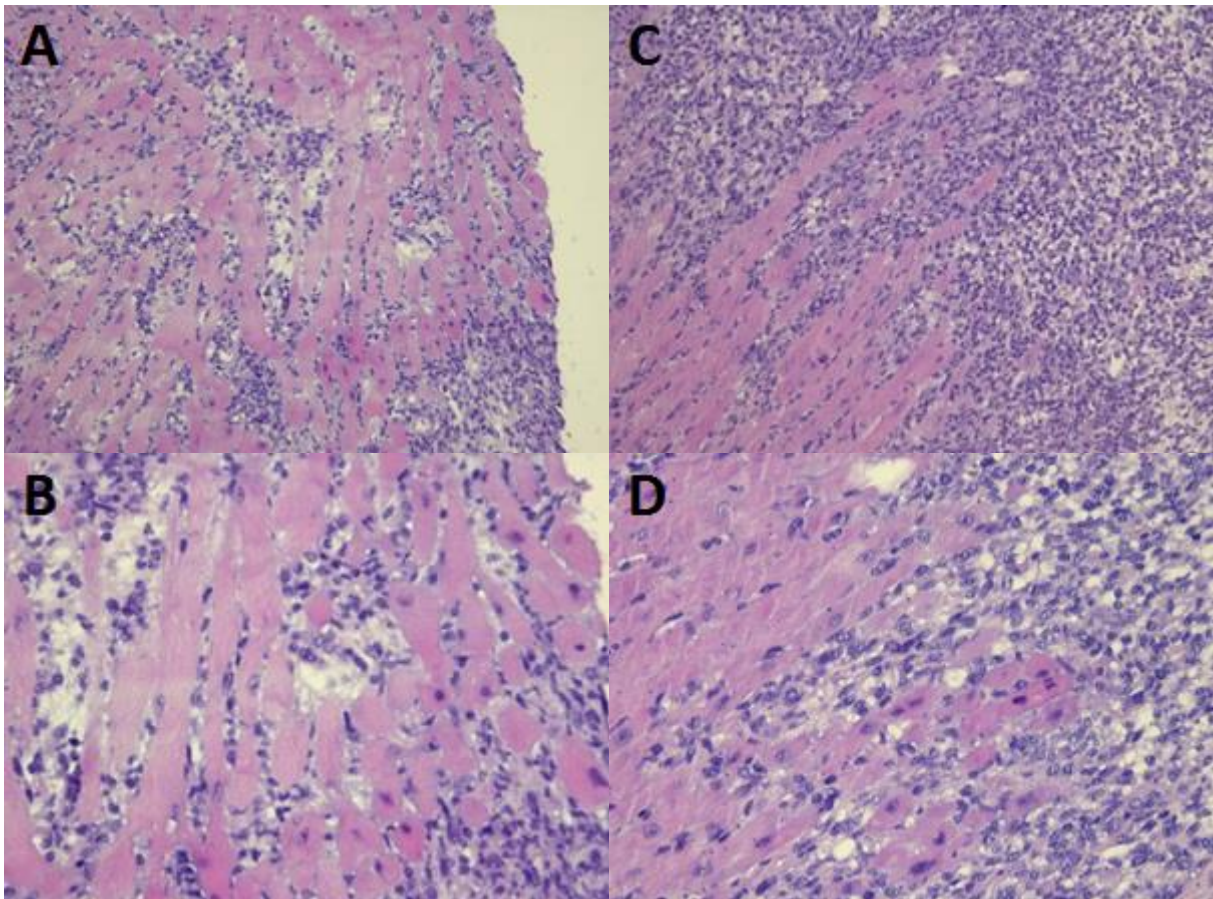


Abbildung 18: HE-Färbung der histologischen Schnitte des Spendermyokards an Tag 5 nach Transplantation. Die DST+Ischämie-Gruppe ist in den Abbildungen A (150-fach) und B (300-fach) dargestellt. Die Abbildungen C und D zeigen die entsprechende Kontrollgruppe in 150-facher und 300-facher Vergrößerung. Der ISHLT-Rejections Score ist in der DST+Ischämie-Gruppe mit 1.4 vs. 2.2 in der Kontrollgruppe signifikant niedriger ($p < 0.05$). Die Bewertung mittels kumulativen, modifizierten ISHLT-Rejection Scores ist ebenfalls signifikant (6.4 vs. 9.8, $p < 0.05$).

Der ISHLT-Rejection-Score zeigt fünf Tage nach Transplantation eine signifikant mildere Ausprägung der Abstoßung in der DST+Ischämie-Gruppe verglichen mit der Kontroll+Ischämie-Gruppe (ISHLT-Rejections Score 1.4 vs. 2.2, $p < 0.05$) (vgl. Abb. 19).

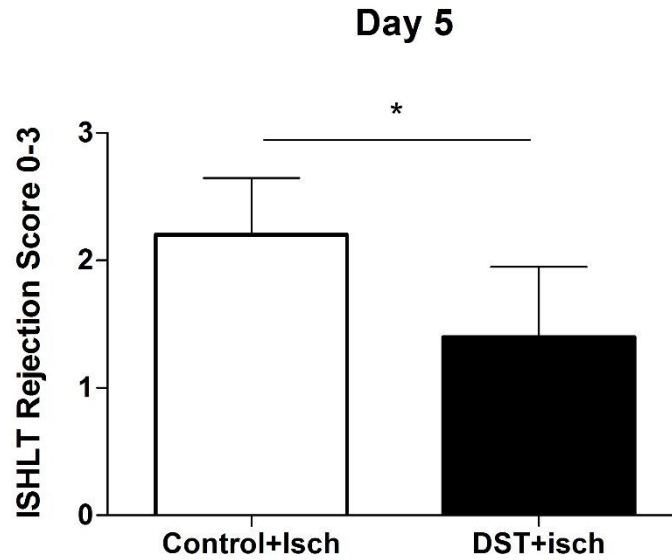


Abbildung 19: ISHLT Rejection Score (0=no rejection – 3=severe rejection): Die histologische Bewertung des gewonnenen Herzmuskelgewebes zeigt eine signifikant abgemilderte Abstoßung für die DST+Ischämie-Gruppe ($p < 0.05$) an Tag 5 nach Transplantation. Je Gruppe $n = 5$.

Der kumulative modifizierte ISHLT-Rejection-Score zeigt an Tag fünf nach Transplantation ebenfalls eine signifikant mildere Ausprägung der Abstoßung in der DST+Ischämie-Gruppe verglichen mit der Kontroll+Ischämie-Gruppe (Cumulative Score 6.4 vs. 9.8, $p < 0.05$) (vgl. Abb. 20).

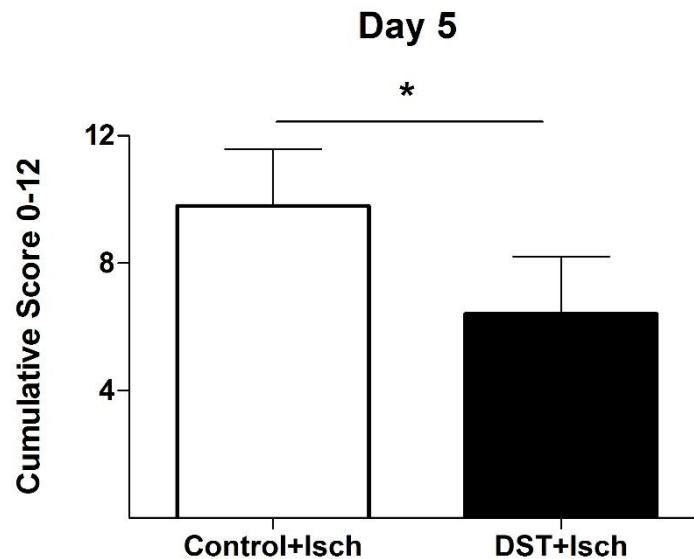


Abbildung 20: Kumulativer modifizierter ISHLT-Score (0=no rejection – >9=severe rejection): Der kumulative Score zeigt an Tag 5 einen signifikant milderen Abstoßungsgrad in der DST+Ischämie-Gruppe verglichen mit der Kontroll+Ischämie-Gruppe ($p < 0.05$). Je Gruppe $n = 5$.

Bewertet man Epikard, Myokard, Endokard und Zellinfiltrate separat mittels Damage-Score (0=no rejection – 3=severe rejection), zeigt sich für alle Schichten ein geringerer Abstoßungsgrad in der DST+Ischämie-Gruppe. Der Unterschied im Epikard ist mit 2.6 vs. 3.0 nicht signifikant. Im Myokard zeigt sich eine deutlich geringere Ausprägung der Abstoßung in der DST+Ischämie-Gruppe (0.8 vs. 1.8). Der Unterschied ist jedoch aufgrund eines Ausreißers knapp nicht signifikant. Im Endokard kam es in der DST+Ischämie-Gruppe zu einer sehr signifikant verringerten Abstoßungsausprägung (1.6 vs. 3.0) ($p < 0.01$). Zellinfiltrate waren in der DST+Ischämie-Gruppe weniger ausgeprägt als in der Kontroll+Ischämie-Gruppe (1.4 vs. 2.0, n.s.) (vgl. Abb. 21).

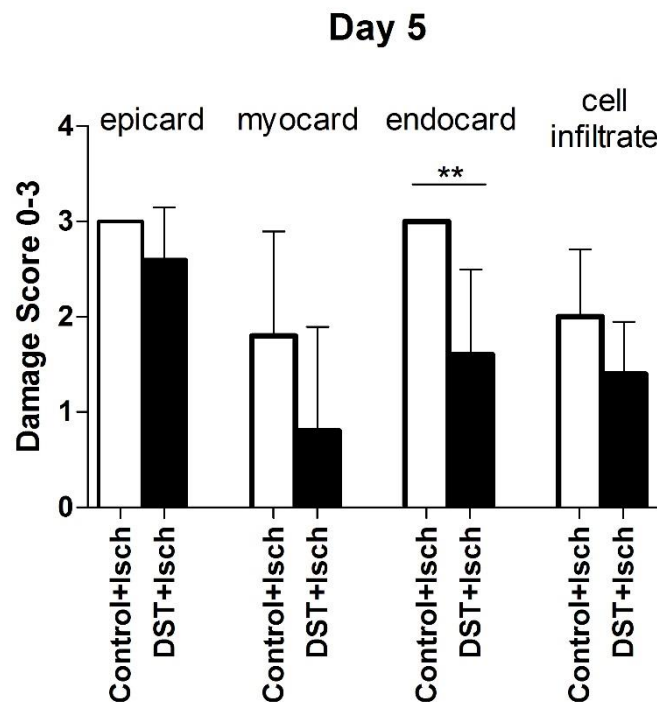


Abbildung 21: Damage Score der einzelnen Subgruppen des kumulativen, modifizierten ISHLT-Rejection Scores (0=no rejection – 3=severe rejection). Es erfolgte eine separate Bewertung des Abstoßungsgrades in Epikard, Myokard, Endokard und der einzelnen Zellinfiltrate. Die Abstoßung ist in allen vier Subgruppen der DST+Ischämie-Gruppe geringer ausgeprägt als in der Vergleichsgruppe. Im Endokard ist der Abstoßungsgrad in der DST+Ischämie-Gruppe gegenüber der Kontroll+Ischämie-Gruppe sehr signifikant vermindert ($p < 0.01$). Je Gruppe $n = 5$.

6.6 Quantitative q-PCR-Ergebnisse

DST+Ischämie vs. Kontrollgruppe+Ischämie Tag 1, 3 und 5 – Herz

DST-Gabe führte im Herzen zu einem hoch signifikanten Anstieg der **FoxP3**-Expression ($p < 0.001$). Bei vergleichbaren Ausgangswerten zeigte sich in der Vergleichsgruppe ein hoch signifikanter FoxP3-Anstieg zwischen Tag 1 und Tag 5 ($p < 0.001$). In der DST-Gruppe war die FoxP3-Expression an Tag 5 jeweils verglichen mit Tag 1 und Tag 3 hoch signifikant erhöht ($p < 0.001$). Hoch signifikant erhöht war

zudem die FoxP3-Expression an Tag 5 in der DST-Gruppe verglichen mit Tag 5 der Kontrollgruppe ($p < 0.001$).

Die **HO-1**-Expression im Herzen wurde durch DST-Gabe nicht signifikant beeinflusst. Trotzdem fällt ein deutlicher Unterschied im Zeitverlauf auf. Während die HO-1-Expression in der Kontrollgruppe zu Beginn höher als in der DST-Gruppe ist, fällt diese von Tag 1 zu Tag 5 kontinuierlich ab. In der DST-Gruppe hingegen steigt sie von Tag 1 zu Tag 5 kontinuierlich an und liegt an Tag 5 deutlich, jedoch nicht signifikant höher als in der Kontrollgruppe.

Die Expression von **IL-6** zeigt in beiden Gruppen den gleichen dynamischen Verlauf. Sie ist an Tag 1 am höchsten, fällt an Tag 3 auf ein Minimum und steigt zu Tag 5 wieder moderat an. In der Kontrollgruppe sind die Expressionslevel jeweils ausgeprägter als in der DST-Gruppe, unterscheiden sich jedoch nicht signifikant.

Die **Interleukin-10**-Expression ist in beiden Gruppen vergleichbar. Sie steigt von niedrigen Werten an Tag 1 zu Tag 5 jeweils sehr signifikant ($p < 0.01$) und von Tag 3 zu Tag 5 signifikant an ($p < 0.05$). Die Expression von IL-10 an Tag 5 ist in der DST-Gruppe höher als in der Kontrollgruppe, jedoch nicht signifikant.

Der Verlauf der **TGF β** -Expression zwischen Kontrollgruppe und DST-Gruppe unterscheidet sich deutlich. Das Expressionslevel ist in der Kontrollgruppe an Tag 1 verglichen mit Tag 1 der DST-Gruppe signifikant erhöht ($p < 0.05$) und sinkt zu Tag 5 signifikant ab ($p < 0.05$). Hingegen bleibt die TGF β -Expression in der DST-Gruppe an Tag 1, Tag 3 und Tag 5 auf einem konstant niedrigem Niveau.

TNF α steigt in der Kontrollgruppe und der DST-Gruppe von Tag 1 zu Tag 5 an. In der Kontrollgruppe zeigt sich dabei kein signifikanter Anstieg der TNF α -Expression. In der DST-Gruppe steigt TNF α zwischen Tag 1 und Tag 5 signifikant an ($p < 0.05$), ebenso zwischen Tag 3 und Tag 5 ($p < 0.05$). Die TNF α -Expression zwischen Tag 5 der Kontrollgruppe und Tag 5 der DST-Gruppe ist knapp nicht signifikant unterschiedlich, in der DST-Gruppe aber deutlich höher.

Die entsprechenden visualisierten Ergebnisse sind Abbildung 22 zu entnehmen.

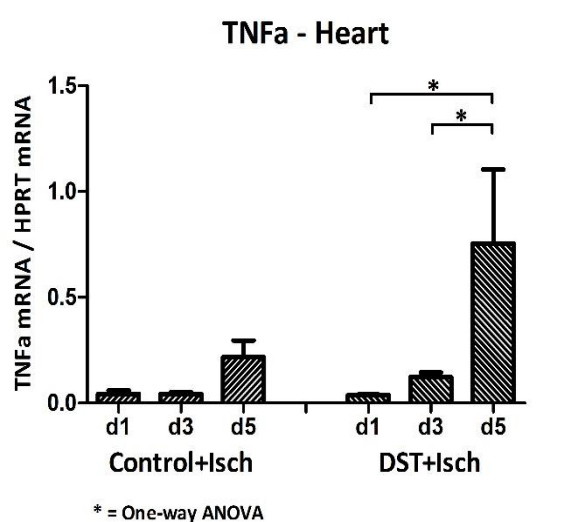
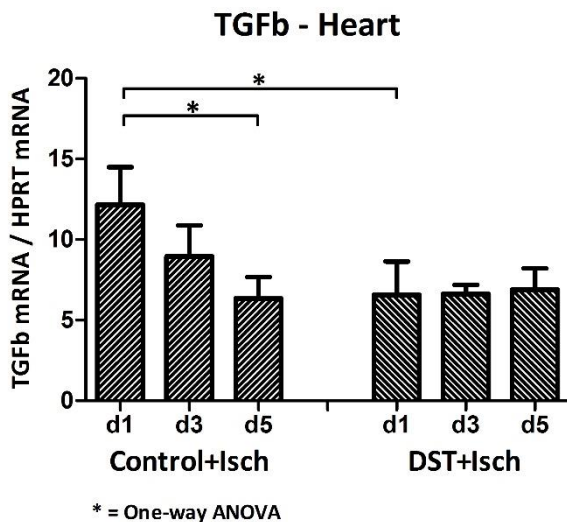
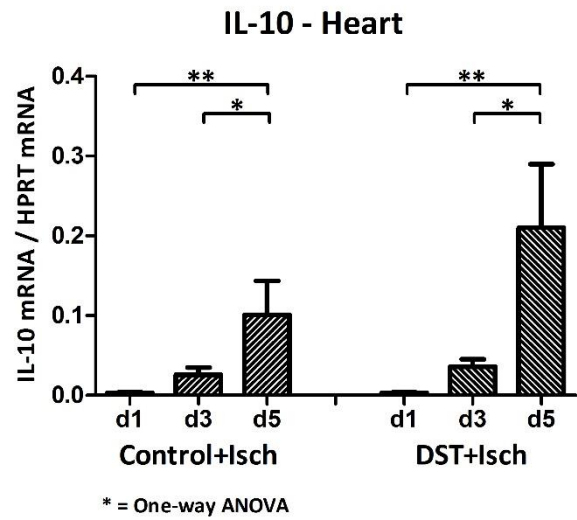
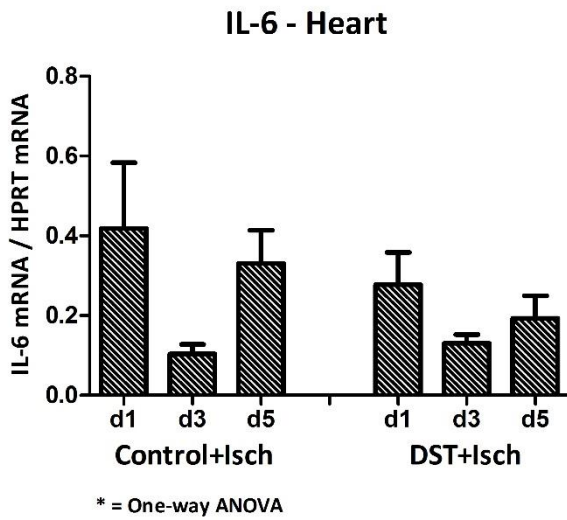
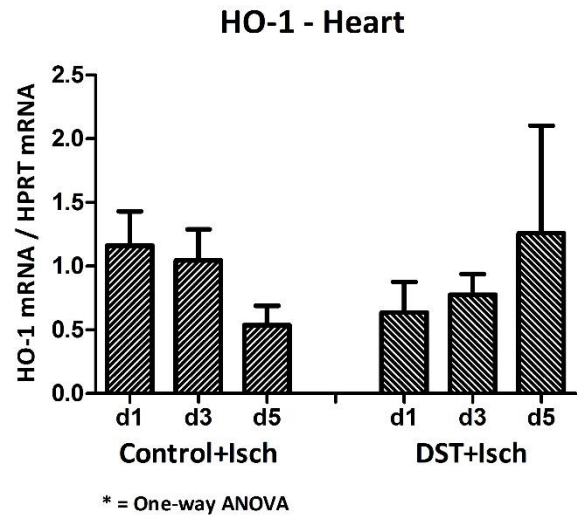
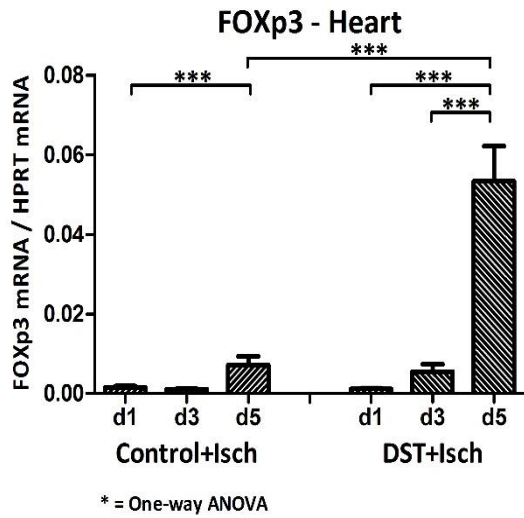


Abbildung 22: DST- und Kontrollgruppe jeweils mit Ischämiephase im Vergleich. Als Referenzgröße dient das murine HPRT. Es wurde zu den Zeitpunkten Tag 1, Tag 3 und Tag 5 die Expression der Mediatoren FoxP3, HO-1, IL-6, IL-10, TGFb und TNFa im Spenderherzen bestimmt. Jede Gruppe umfasst zu allen drei Zeitpunkten 5 Tiere (n=5).

DST+Ischämie vs. Kontrollgruppe+Ischämie Tag 1, 3 und 5 – Lymphknoten

Verglichen mit dem Spenderherz sind in den Lymphknoten die Expressionsunterschiede der untersuchten Biomarker zwischen Kontroll- und DST-Gruppe generell an Tag 1, 3 und 5 geringer.

Die Expression von **FoxP3** zeigt keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen. Jedoch unterscheiden sich die Expressionsverläufe. In der Kontrollgruppe sind die Werte an Tag 1 am höchsten, an Tag 3 sind sie abgefallen und an Tag 5 wieder angestiegen. In der DST-Gruppe steigt FoxP3 von Tag 1 zu Tag 5 kontinuierlich an.

Die **HO-1** Expression zeigt keine signifikanten Unterschiede zwischen Kontroll- und DST-Gruppe. In der Kontrollgruppe nimmt die Expression jedoch von Tag 1 zu Tag 5 deutlich ab. In der DST-Gruppe fällt HO-1 von Tag 1 zu Tag 3 ebenfalls, steigt jedoch zu Tag 5 wieder an.

IL-6 ist in der DST-Gruppe an Tag 1 verglichen mit Tag 3 und Tag 5 jeweils signifikant erhöht ($p < 0.05$). Es fällt sowohl in der DST- als auch in der Kontrollgruppe von Tag 1 über Tag 3 bis Tag 5 ab.

Bei der Expression von **IL-10** zeigen sich im Zeitverlauf und zwischen DST- und Kontrollgruppe keine signifikanten Unterschiede.

An Tag 3 ist die **TGF β** -Expression in der Kontrollgruppe gegenüber Tag 5 signifikant erhöht ($p < 0.05$). In der DST-Gruppe steigt TGF β von Tag 1, über Tag 3 bis Tag 5 an. An Tag 5 ist die TGF β gegenüber Tag 1 signifikant erhöht ($p < 0.05$).

Bei der **TNF α** -Expression zeigen sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den beiden Gruppen. Die Expression nimmt in beiden Gruppen von Tag 1 zu Tag 5 deutlich, jedoch nicht signifikant zu.

Die entsprechenden visualisierten Ergebnisse sind Abbildung 23 zu entnehmen.

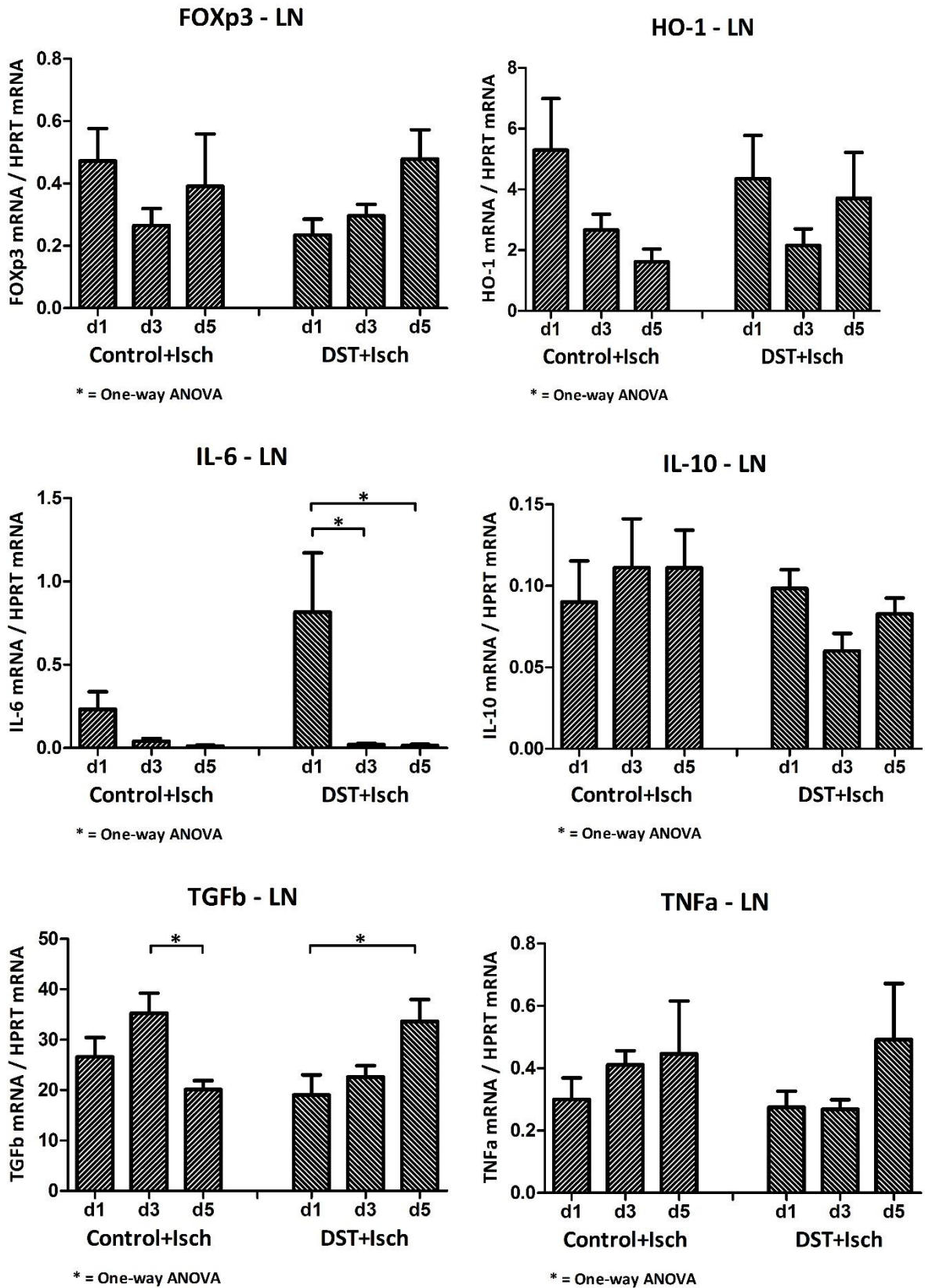


Abbildung 23: Vergleich zwischen DST+Ischchämie und Kontrollgruppe+Ischchämie. Bestimmung der Expression der Mediatoren FoxP3, HO-1, IL-6, IL-10, TGFβ und TNFα in den Lymphknoten. Die Gruppengröße an Tag 1, Tag 3 und Tag 5 umfasst jeweils 5 Tiere (n=5).

DST+Ischämie vs. Kontrollgruppe+Ischämie Tag 1, 3 und 5 – Milz

In der Milz zeigt sich im Vergleich zum Spenderherz für die Mediatoren FoxP3, HO-1 und TNF α ein gegenteiliges Expressionsmuster. Während die Expression der drei Biomarker im Herzen jeweils von Tag 1 zu Tag 5 kontinuierlich angestiegen ist, nimmt sie in der Milz jeweils ab.

Die **FoxP3**-Expression zwischen Kontroll- und DST-Gruppe unterscheidet sich signifikant. Sie ist in der DST-Gruppe an Tag 1 signifikant erhöht ($p < 0.05$). In der DST-Gruppe nimmt die Expression von FoxP3 von Tag 1 zu Tag 5 kontinuierlich ab, von Tag 1 zu Tag 3 signifikant ($p < 0.05$), von Tag 1 zu Tag 5 sehr signifikant ($p < 0.01$).

Bei der Expression von **HO-1** bestehen zwischen beiden Gruppen keine signifikanten Unterschiede. Die Expression von HO-1 nimmt in Kontroll- und DST-Gruppe ab. Im Vergleich zur Expression im Spenderherzen zeigen sich divergierende Verläufe in Kontroll- und DST-Gruppe der Milz. In den Kontrollgruppen beider Organe nimmt die HO-1-Expression von Tag 1 zu Tag 5 ab. In der DST-Gruppe zeigt sich in der Milz zwischen Tag 1 und Tag 5 eine knapp nicht signifikante Abnahme der HO-1-Expression. Im Herzen hingegen steigt HO-1 in diesem Zeitraum an.

Für **IL-6** bestehen keine signifikanten Unterschiede im Zeitverlauf und zwischen DST- und Kontrollgruppe. In der Kontrollgruppe zeigt sich an Tag 3 ein Peak. Dieser ist durch einen Ausreißer bei den Tag 3-Tieren bedingt. In der DST-Gruppe nimmt die Expression von IL-6 von Tag 1 zu Tag 5 ab.

IL-10 zeigt keine signifikanten Expressionsunterschiede im Zeitverlauf und zwischen den beiden Gruppen. Die Expression von IL-10 verläuft in beiden Gruppen auf einem konstanten Niveau. In der DST-Gruppe ist das Expressionsniveau gegenüber der Kontrollgruppe nicht signifikant erhöht.

Es bestehen keine signifikanten Unterschiede für die Expression von **TGF β** . In der Kontrollgruppe steigt TGF β von Tag 1 zu Tag 5 an. In der DST-Gruppe zeigt sich an Tag 3 ein TGF β -Peak.

Die Expression von **TNF α** ist in der DST-Gruppe an Tag 1 verglichen zur Kontrollgruppe hoch signifikant erhöht ($p < 0.001$). In der Kontrollgruppe kommt es von Tag 1 zu Tag 3 zu einem sehr signifikanten Anstieg von TNF α ($p < 0.01$). An Tag 5 hingegen ist die Expression wieder reduziert. In der DST-Gruppe nimmt die TNF α -Expression von Tag 1 zu Tag 5 ab. Die Abnahme von Tag 1 zu Tag 5 ist hoch signifikant ($p < 0.001$), von Tag 1 zu Tag 3 ist die TNF α -Abnahme signifikant ($p < 0.05$). Im Spenderherzen verhält sich TNF α in der DST-Gruppe entgegengesetzt. Die Expression nimmt dort, wie bereits erwähnt, von Tag 1 zu Tag 5 signifikant zu ($p < 0.05$).

Die entsprechenden visualisierten Ergebnisse sind Abbildung 24 zu entnehmen.

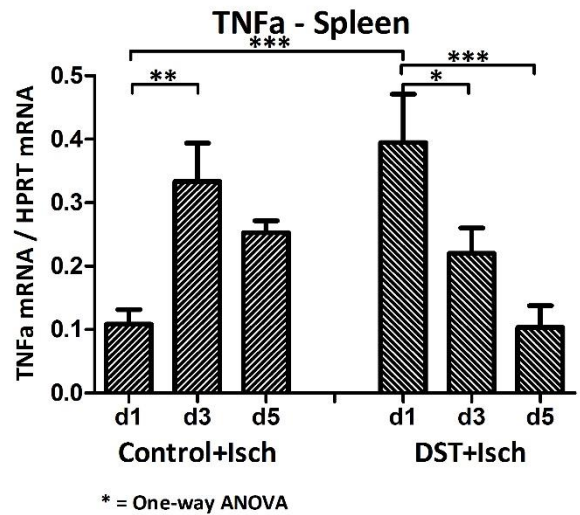
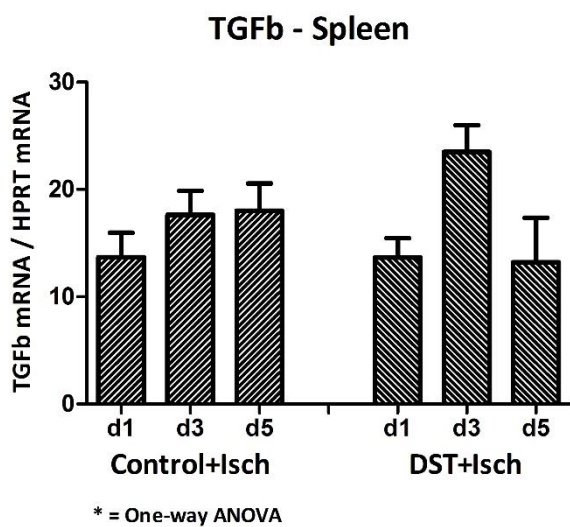
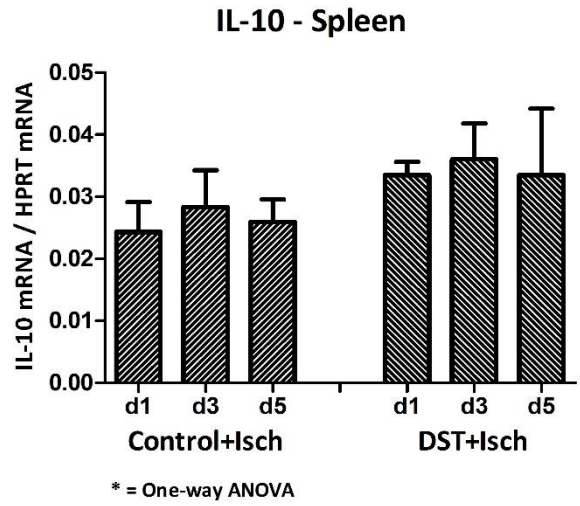
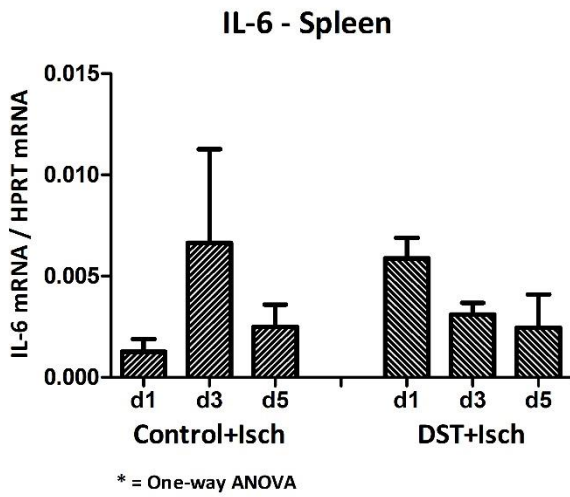
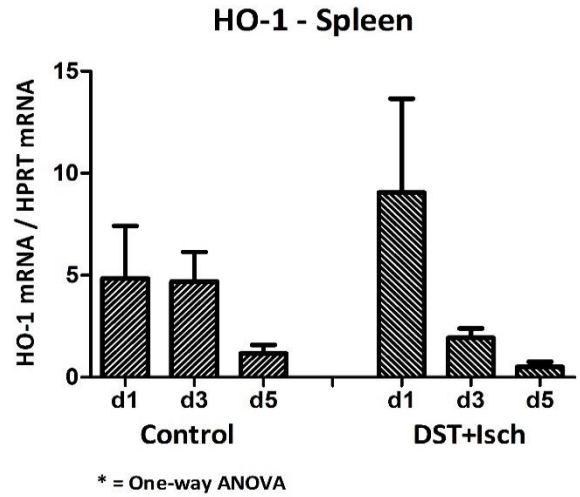
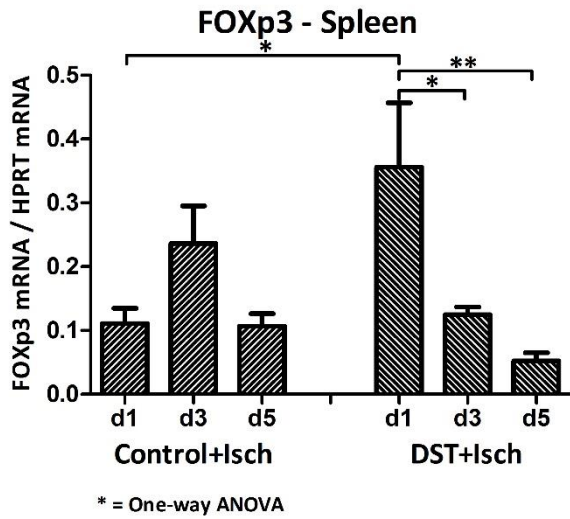


Abbildung 24: Vergleich zwischen DST+Ischämie und Kontrollgruppe+Ischämie. Bestimmung der Expression der Mediatoren FoxP3, HO-1, IL-6, IL-10, TGFb und TNFa in der Milz. Die Gruppengröße für die Zeitpunkte Tag 1, Tag 3 und Tag 5 umfasst jeweils 5 Tiere (n=5).

DST+Ischämie vs. Kontrollgruppe+Ischämie Graft-survival – Herz

Die Expression von **FoxP3** im Herzen war in der DST-Gruppe höher als in der Kontrollgruppe, jedoch nicht signifikant.

Für **HO-1** zeigte sich ein gegenteiliges Bild. In der DST-Gruppe war die Expression zum Zeitpunkt der finalen Abstoßung geringer, allerdings nicht signifikant.

IL-6 zeigte einen signifikanten Expressionsunterschied zwischen DST- und Kontrollgruppe. Die IL-6-Expression war in der DST-Gruppe signifikant niedriger ($p < 0.05$).

IL-10 war in der DST-Gruppe ebenfalls weniger exprimiert worden. Der Unterschied zwischen beiden Gruppen im Spenderherzen war jedoch nicht signifikant.

Bei **TGF β** und **TNF α** zeigte sich zwischen den Gruppen kein signifikanter Unterschied. Die Expression der beiden Biomarker war in der DST-Gruppe jeweils höher.

Die entsprechenden visualisierten Ergebnisse sind Abbildung 25 zu entnehmen.

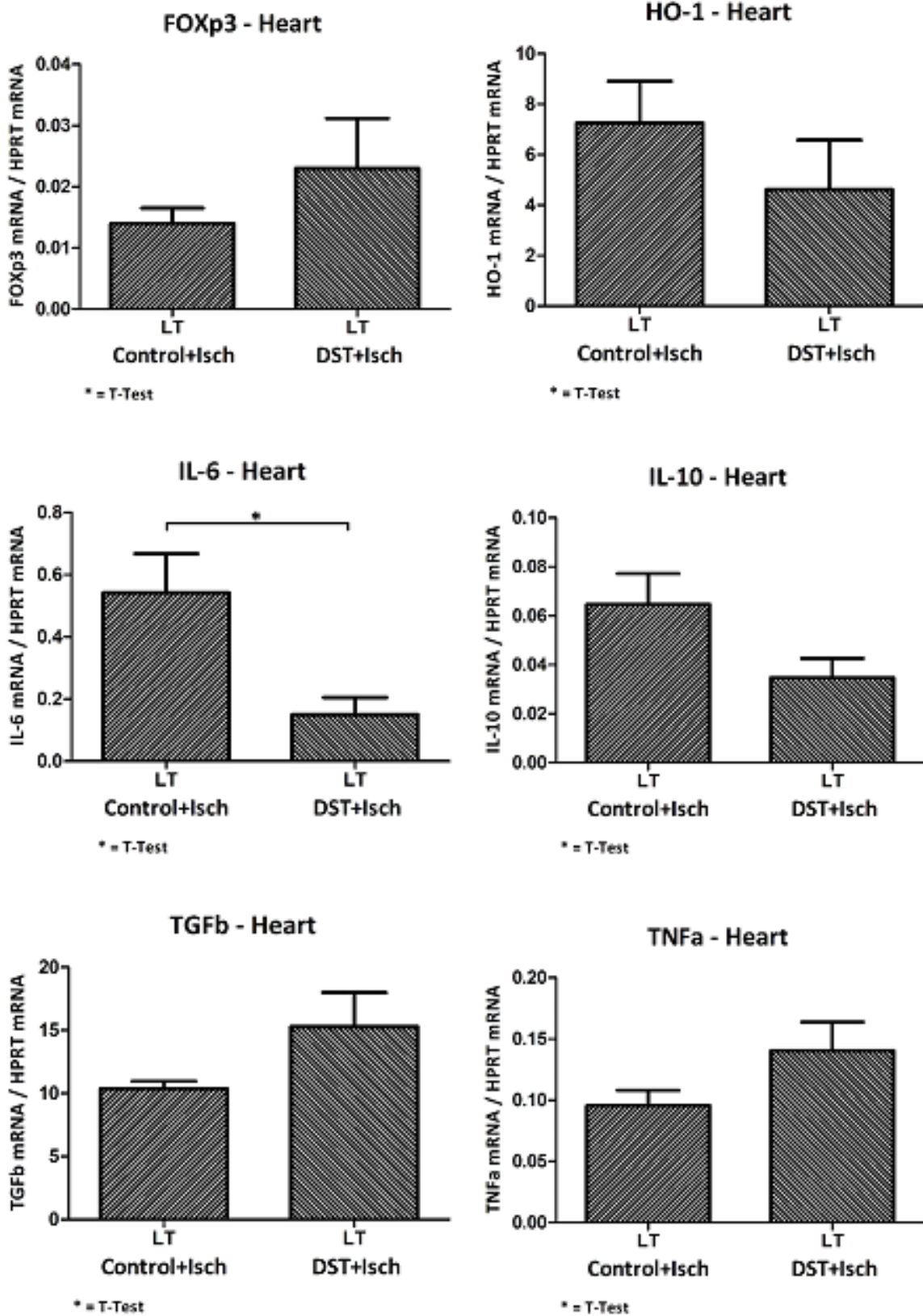


Abbildung 25: Expression der Mediatoren FoxP3, HO-1, IL-6, IL-10, TGF β und TNF α im Spenderherzen zum Zeitpunkt des Funktionsverlusts des Spenderherzens. In den beiden Langzeitgruppen DST+Ischämie und Kontrollgruppe+Ischämie wurden die Organe nach fingerpalpatorisch gesichertem Funktionsverlust des Spenderherzens entnommen. Der durchschnittliche Bestimmungzeitpunkt war in der DST-Gruppe knapp sieben Tage später als in der Kontrollgruppe (14.6 vs. 7.8 Tage). Je Gruppe n = 5.

DST+Ischämie vs. Kontrollgruppe+Ischämie Graft-survival – Lymphknoten

In den Lymphknoten der Langzeitgruppen zeigen sich zum Zeitpunkt der jeweiligen Abstoßung deutlichere Unterschiede als im Spenderorgan.

Für die Expression von **FoxP3** in den Lymphknoten besteht kein signifikanter Unterschied. Die FoxP3-Expression ist in der DST-Gruppe leicht höher.

Die Expression von **HO-1** ist in der DST-Gruppe signifikant niedriger ($p < 0.05$).

IL-6-Expression ist in der DST-Gruppe im Vergleich zur Kontrollgruppe sehr signifikant erniedrigt ($p < 0,01$). Im Spenderherzen wurde, wie bereits erwähnt, in der DST-Gruppe ebenfalls ein signifikanter Expressionsrückgang von IL-6 festgestellt.

Interleukin-10 wird in den Lymphknoten der DST-Gruppe verglichen mit der Kontrollgruppe sehr signifikant geringer exprimiert ($p < 0.01$).

Für **TGF β** besteht kein signifikanter Expressionsunterschied zwischen den beiden Gruppen.

TNF α zeigt keine signifikanten Expressionsunterschiede zwischen DST- und Kontrollgruppe. Jedoch wird deutlich mehr TNF α in den Lymphknoten der DST-Gruppe exprimiert.

Die entsprechenden visualisierten Ergebnisse sind Abbildung 26 zu entnehmen.

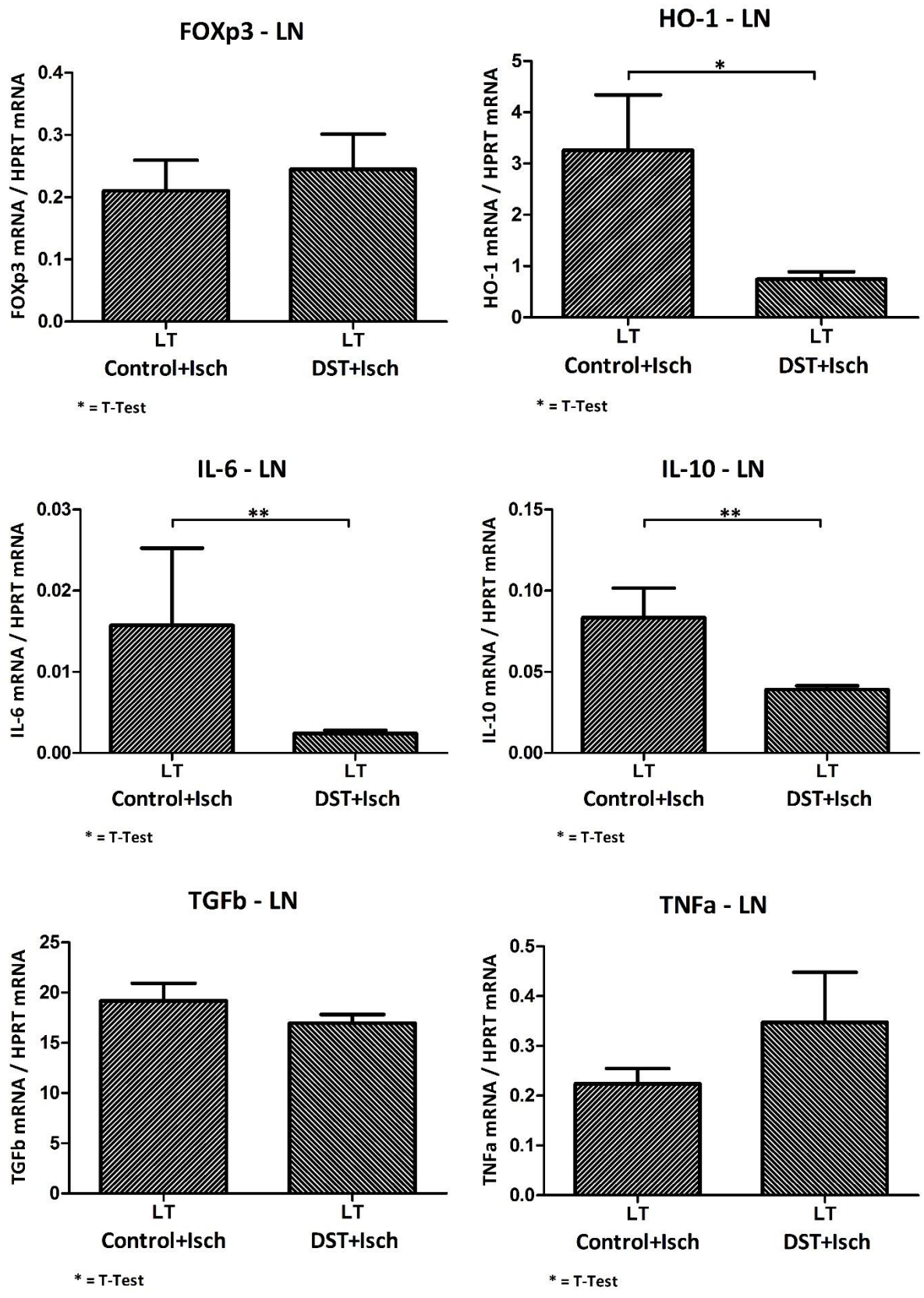


Abbildung 26: Expressionsbestimmung der Mediatoren FoxP3, HO-1, IL-6, IL-10, TGFβ und TNFα in den Lymphknoten zum Zeitpunkt des Funktionsverlusts des Transplantats. Verglichen wird zwischen DST+Ischämie- und Kontrollgruppe+Ischämie. Die Gruppengröße umfasst jeweils 5 Tiere pro Gruppe (n=5).

DST+Ischämie vs. Kontrollgruppe+Ischämie Graft-survival – Milz

In der Milz zeigen sich zum Zeitpunkt der Abstoßung des Spenderherzens zwischen DST- und Kontrollgruppe keine signifikanten Unterschiede für die einzelnen Mediatoren.

Die **FoxP3**-Expression ist in der DST-Gruppe deutlich und nur knapp nicht signifikant erhöht.

HO-1 wird in der DST-Gruppe nicht signifikant vermindert exprimiert.

Für **IL-6** besteht kein signifikanter Expressionsunterschied zwischen den beiden Gruppen.

Interleukin-10 wird in der Milz zum Zeitpunkt der Abstoßung in der DST-Gruppe deutlich geringer exprimiert. Der Unterschied zwischen den beiden Gruppen ist jedoch nicht signifikant.

Für **TGFβ** und **TNFα** gibt es keine signifikanten Expressionsunterschiede. TGFβ und TNFα wird in der DST-Gruppe jeweils etwas vermehrt exprimiert.

Die entsprechenden visualisierten Ergebnisse sind Abbildung 27 zu entnehmen.

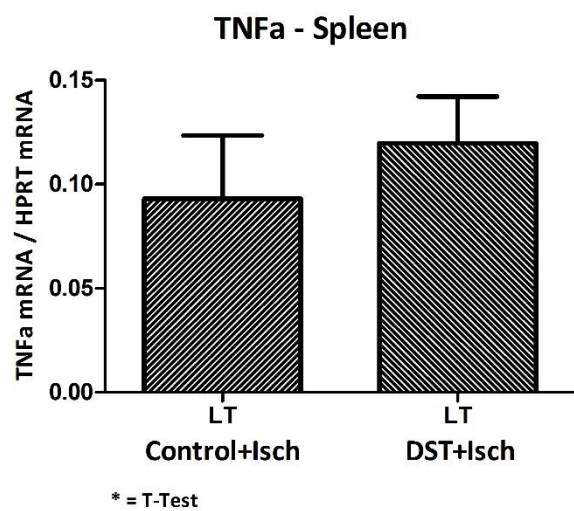
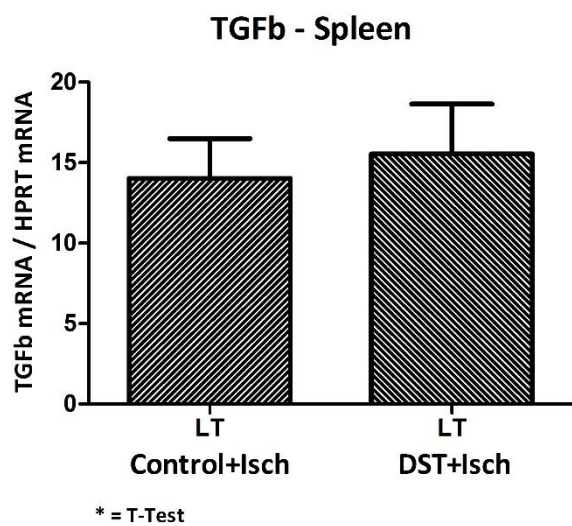
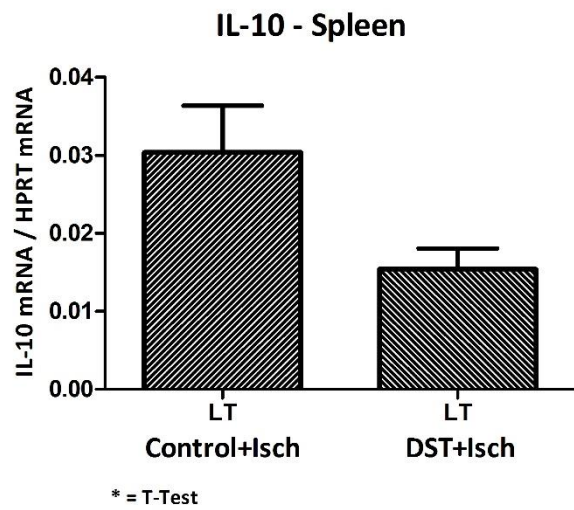
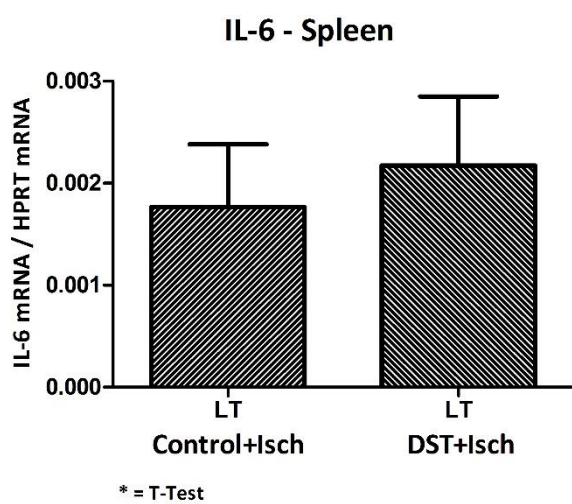
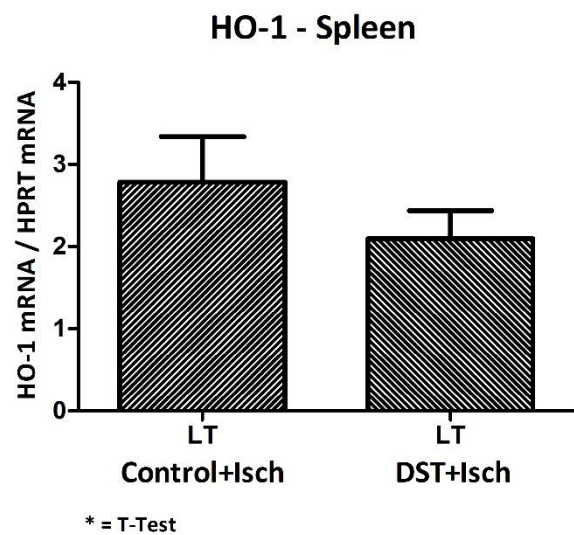
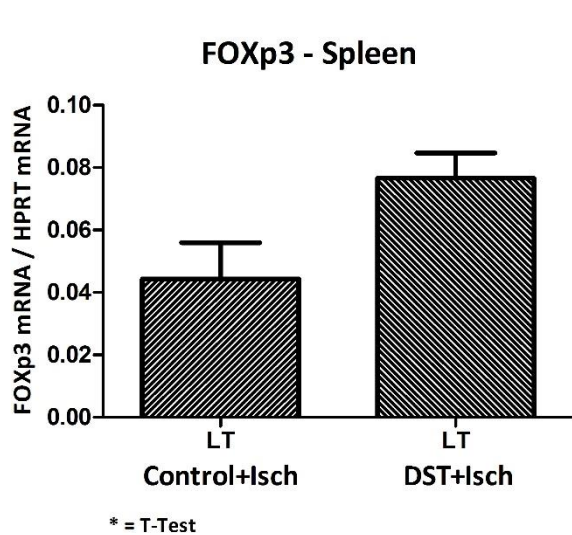


Abbildung 27: Vergleich zwischen DST- und Kontrollgruppe mit jeweiliger Ischämiephase. Expressionsbestimmung der Mediatoren FoxP3, HO-1, IL-6, IL-10, TGFβ und TNFα in der Milz zum Zeitpunkt des Funktionsverlusts des Transplantats. Die Gruppengröße umfasst jeweils 5 Tiere pro Gruppe (n=5).

Im Vergleich der Expressionsunterschiede der einzelnen Mediatoren zum Zeitpunkt der finalen Abstoßung in Spenderherz, Lymphknoten und Milz fällt folgendes auf:

Die FoxP3-Expression ist in der DST-Gruppe in allen untersuchten Organen höher als in der Kontrollgruppe. Für Hämooxygenase-1 gilt das Gegenteil. HO-1 wird in der DST-Gruppe in Herz, Lymphknoten und Milz geringer exprimiert. Interleukin-6 wird in der DST-Gruppe im Herzen signifikant und im Lymphknoten sehr signifikant vermindert exprimiert, in der Milz ist die Expression verglichen mit der Kontrollgruppe hingegen leicht erhöht. Die IL-10-Expression ist in der DST-Gruppe in allen untersuchten Organen geringer, in den Lymphknoten sehr signifikant. TGF β zeigt in der DST-Gruppe einen Expressionsanstieg in Herz und Milz, in den Lymphknoten ist sie verglichen mit der Kontrollgruppe leicht vermindert. Die TNF α -Expression ist in der DST- im Vergleich zur Kontrollgruppe in Spenderherz, Lymphknoten und Milz erhöht.

DST+Resveratrol vs. Kontrollgruppe HO-1-Induktion – Herz

Die präoperative, orale Gabe von 30mg Resveratrol wurde im Hinblick auf eine potentielle Induktion von HO-1 untersucht. Es wurde die Expression in Herz, Lymphknoten und Milz zwischen DST+Resveratrol- und DST-Gruppe an Tag 1, 3 und 5 verglichen. Im Herzen zeigte sich an Tag 1 eine sehr signifikant erhöhte Expression in der DST+Resveratrol-Gruppe ($p < 0.01$). An Tag 3 und 5 konnte kein Expressionsunterschied für HO-1 festgestellt werden (vgl. Abb. 28). In Milz und Lymphknoten zeigten sich keine signifikanten Expressionsunterschiede, jedoch war HO-1 an Tag 5 nach Operation in den Lymphknoten in der DST+Resveratrol-Gruppe deutlich höher exprimiert.

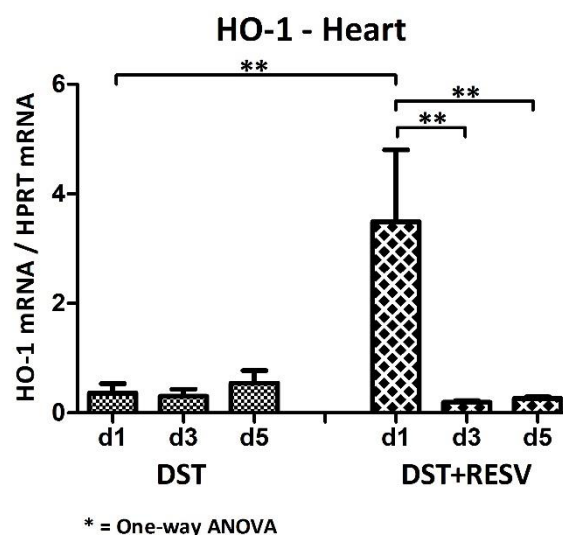


Abbildung 28: Expression des Mediators HO-1 in Spenderherzen in DST+Resveratrol- und DST-Gruppe an Tag 1, 3 und 5 nach Operation. Als Referenzgröße dient das murine HPRT. Jede Gruppe umfasst zu allen drei Zeitpunkten 5 Tiere ($n=5$).

7. Diskussion

7.1 Prozedurale Ergebnisse des heterotopen Herztransplantationsmodell

Eine perioperative Sterblichkeit von 3.5% (3 von 90), sowie ein Einschluss von 94.4% (85 von 90) aller transplantierten Mäuse in die statistische Auswertung ist ein gutes Ergebnis. Im abdominalen Setting mit Einzelknopfnahmt gibt Niimi Aufschluss über den Ersterfolg der Transplantation in Abhängigkeit zu einem vorher gesehenen Operationsvideo, sowie die Anzahl der notwendigen Operationen, um eine Erfolgsrate von über 90% zu erzielen. Die erste erfolgreiche Transplantation gelang mit vorausgehender visueller Videounterstützung nach durchschnittlich 10.8 (vs. 24) Operationen. Eine Erfolgsquote von über 90% wurde nach durchschnittlich 78.8 (vs. 213) Operationen erzielt (Niimi 2001). Für erfahrene Mikrochirurgen (mindestens 200 Prozeduren) gibt Mao im heterotopen, abdominalen Setting eine Überlebensrate von 90% bis 98% an. Blutungen treten bei der Anwendung einer fortlaufenden Gefäßnaht in nur 2% der Fälle auf (Mao, Liu et al. 2009). Wang gibt im heterotopen cervikalen Transplantationsmodell bei angewandter Cuffmethode nach mehreren hundert Operationen sogar eine perioperative Erfolgsquote von über 99% an (Wang, Liu et al. 2005). Eine erfolgreiche Einschlussquote von 96% (48 von 50) wird von Tomita bei cervikaler Cufftechnik beschrieben (Tomita, Zhang et al. 1997).

7.2 Zellzahl und Vitalität der Spendersplenozyten

Zellzahl und Vitalität sind mit anderen Gruppen kaum vergleichbar, da meist nur die Anzahl der insgesamt verabreichten Splenozyten, sowie die Reinheit selektioniert verabreichter Subpopulationen genannt wird. Hayashi gibt in seinem Hauttransplantationsmodell an Mäusen für direkt verabreichte, nicht kultivierte Splenozyten eine Vitalität von über 95% an. Dafür wurde methodisch ebenfalls die Trypanblaufärbung angewendet (Hayashi, Yamazaki et al. 2007). Dies entspricht den eigenen Ergebnissen der aufgearbeiteten Splenozyten vor Inkubation, die ebenfalls stets bei über 95% lag.

In den DST-Gruppen wurden jeweils 22.5×10^6 vitale Spendersplenozyten als DST intravenös injiziert. Je nach Modell beschreiben Autoren ein Verabreichen von zwischen 10×10^6 und 30×10^6 bis zu 50×10^6 Splenozyten (Yang, Du Temple et al. 1998; Hayashi, Yamazaki et al. 2007; Liu, Zhou et al. 2010).

7.3 FACS-Analyse

Die FACS-Analyse erlaubte, eine Aufschlüsselung der einzelnen verabreichten Subpopulationen gemessen an den insgesamt 22.5×10^6 verabreichten, vitalen Splenozyten. Es wurden 2.3×10^6 T-Lymphozyten (2.7×10^4 Regulatorische T-Zellen, 1.8×10^6 CD4-positive T-Helferzellen und 3.0×10^5 CD8-positive zytotoxische T-Zellen) und 17.4×10^6 B-Lymphozyten (15.1×10^6 naive und 1.1×10^6 reife) verabreicht. Ferner wurden 6.0×10^5 NK-Zellen und 1.7×10^5 dendritische Zellen i.v. injiziert.

Die 22.5×10^6 vitalen Splenozyten machten gemäß FACS-Analyse 54% aller verabreichten aus der Milz gewonnenen Zellen aus. Die 46% nicht vitaler Zellen und ihr potentieller Einfluss auf Transplantationstoleranz und akute Abstoßung darf nicht außer Acht gelassen werden. Im folgenden Abschnitt werden daher die einzelnen verabreichten Subpopulationen und ihre Wirkung auf Induktion und Erhalt eines partiellen Chimärismus kurz im Kontext mit der aktuellen Studienlage diskutiert.

Regulatorische Spender T-Lymphozyten

Die Behandlung mit regulatorischen T-Zellen kann eine Transplantatabstoßung verzögern oder verhindern, sowie eine dauerhafte Transplantattoleranz induzieren. Dies konnte in mehreren experimentellen Studien im Tiermodell und am Menschen belegt werden (Safinia, Leech et al. 2013; Tang and Bluestone 2013; Huynh, Zhang et al. 2014).

Der Beitrag FoxP3⁺ regulatorischer T-Zellen (Tregs) zur Toleranzinduktion gegenüber einem Transplantat wird in erster Linie durch Hemmung reaktiver T-Zellen erzielt. Tregs sind in der Lage, CD4⁺- und CD8⁺-T-Zellen bei ihrer Differenzierung, Aktivierung und Proliferation zu hemmen. Dies geschieht entweder direkt zellvermittelt oder indirekt über inhibierende Zytokine, wie IL-10, TGFβ und IL-35 (Chen, Jin et al. 2003; Roncarolo, Gregori et al. 2006; Collison, Workman et al. 2007). Direkte Zytotoxizität gegenüber T-Effektorzellen erfolgt Perforin- und Proteasen-vermittelt (Grossman, Verbsky et al. 2004; Gondek, Lu et al. 2005).

T-Zell-Hemmung bedeutet entweder direkte Zytotoxizität durch Tregs oder indirekte Hemmung von T-Zellen via von Tregs ausgeschüttetem Adenosin, IL-10, IL-35 oder TGFβ. Die indirekte Hemmung erfolgt durch APCs und beruht auf der Interaktion von CTLA-4 mit CD80/86. Es kommt zur Depletion von CD80/86-Molekülen auf dendritischen Zellen. Dies führt zu einer verminderten Costimulation von CD28. Ferner induziert CTLA-4 die IDO- (Indoleamine-2,3-dioxygenase) Expression. Dies führt zu einer Up-Regulation von Kynureninen (Kyn) und Down-Regulation von essentiellen Aminosäuren (AAs). Tregs treiben T-Zellen in Anergie, Zelltod oder machen sie via „infectious tolerance“ selbst zu regulatorischen T-Zellen (vgl. Abb. 29) (Qureshi, Zheng et al. 2011; Juvet, Whatcott et al. 2014).

Der Stellenwert der einzelnen Mechanismen an Homöostase, Inflammation und Transplantationstoleranz in vivo ist noch nicht abschließend geklärt (Huynh, Zhang et al. 2014; Juvet, Whatcott et al. 2014).

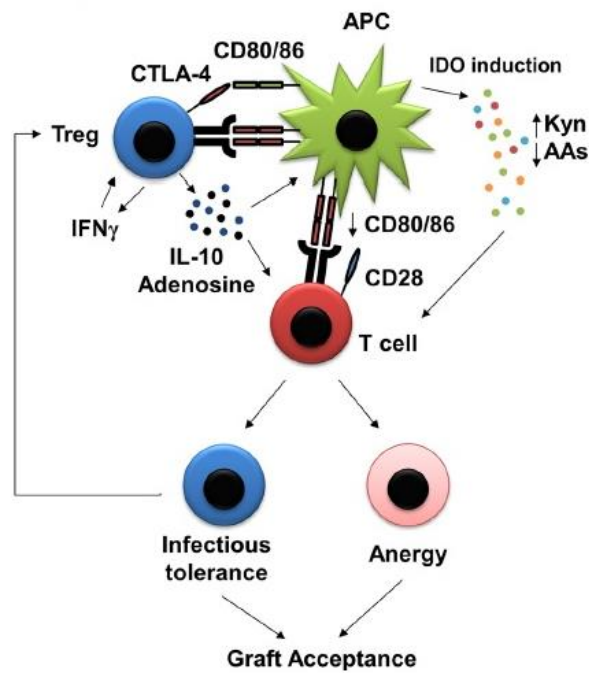


Abbildung 29: Treg vermittelter Einfluss auf Alloreaktivität: Die Toleranzinduktion durch Tregs beruht auf der Hemmung von T-Zellen. Diese kann entweder direkt oder über dendritische Zellen (DCs, APCs) erfolgen. Details s. Text. (Juvet, Whatcott et al. 2014).

Die Hemmung der alloimmunen Immunreaktion durch T-Zellen erfolgt in den Lymphknoten, in welche das Transplantat drainiert, sowie im Transplantat selbst. Regulatorische T-Zellen migrieren aus dem entzündlichen Gewebe im und um das Transplantat in die umliegenden Lymphknoten. Dort verhindern Tregs die Reifung von T-Lymphozyten durch Kontakt mit antigenpräsentierenden Zellen, nach den bereits aufgeführten Mechanismen. Im Transplantat wirken Tregs direkt zytotoxisch bzw. regulierend über inhibitorische Zytokine auf reaktive T-Zellen (Zhang, Schroppe et al. 2009; Edozie, Nova-Lamperti et al. 2014; Lee, Nguyen et al. 2014).

Tregs stellen eine heterogene Zellpopulation dar. Für eine Zell-Therapie eignen sich besonders naive ($CD4^+CD25^{hi}CD127^{lo}CD45RA^+$) regulatorische T-Zellen (Edozie, Nova-Lamperti et al. 2014). $CD161^+$ Tregs fördern via STAT3 die Expression von abstoßungsfördernden IL-17. Sie sollten in Transplantationsmodellen nicht verwendet werden (Afzali, Mitchell et al. 2013).

Pilat hat im Skingrafting-Modell an Mäusen mit komplettem MHC-Mismatch durch Gabe von Tregs und Knochenmark einen stabilen partiellen Chimärismus erzeugen können. Dafür wurde eine kurzzeitige costimulatorische Blockade (CTLA4Ig, anti-CD40L mAb) und Rapamycin verwendet. Auf eine zytoreduktive (myeloablative) Behandlung durch Bestrahlung oder Medikamente wurde verzichtet. Die Gabe von Spender-Tregs führte im Empfänger sowohl zur partiellen zentralen als auch peripheren Deletion spenderreaktiver T-Zellen, sowie zur langfristigen spenderspezifischen Toleranz.

Die Translation dieses Modells in die Klinik würde einen Meilenstein in der Transplantationsimmunologie darstellen (Pilat, Baranyi et al. 2010).

Betrachtet man in unserer Arbeit die q-PCR-Ergebnisse der einzelnen untersuchten Mediatoren im Herzen, so zeigt sich ein hoch signifikanter Anstieg von FoxP3 von Tag 1 zu Tag 5. Dieser Anstieg findet sowohl in der DST+Ischämie- als auch in der Kontroll-Gruppe statt. In der DST-Gruppe kommt es jedoch zu einem weit stärkeren stetigen FoxP3-Anstieg. An Tag 5 nach Transplantation ist die FoxP3-Expression in der DST+Ischämie-Gruppe im Vergleich zur Kontrollgruppe hoch signifikant erhöht. Da FoxP3 ein für regulatorische T-Zellen spezifischer, protektiv-immunregulierender Faktor ist, ist von einer verstärkten Immigration von regulatorischen T-Zellen ins Transplantat in der DST-Gruppe auszugehen. Dies wird gestützt durch die nachweisbare stärkere Expression von IL-10, einem Treg-assoziierten Zytokin, im Transplantat an Tag 5 in der DST-Gruppe. Die signifikant erhöhte Expression von FoxP3 und IL-10 im Transplantat an Tag 5 machen es daher sehr wahrscheinlich, dass die via DST verabreichten Tregs einen maßgeblichen Einfluss auf das verlängerte Transplantatüberleben haben. Die Migration von regulatorischen Spender-T-Zellen in Allografts und in sie umgebende Lymphknoten konnte im Mausmodell bereits belegt werden (Zhang, Schroppel et al. 2009).

Neben dem FoxP3-Anstieg im Transplantat kommt es auch in den das Transplantat umgebenden Lymphknoten zu einer von Tag 1 zu Tag 5 stetig ansteigenden FoxP3-Expression. Auch in den Lymphknoten scheint es zu einer Immigration von Tregs zu kommen. Ebenso kommt es in den Lymphknoten zu einem signifikanten TGF β -Anstieg, das neben IL-10 als eines der zentralen Treg-assoziierten antiinflammatorisch wirksamen Effektormoleküle zu betrachten ist. TGF β ist an der Regulation von Toleranz- und Entzündungsprozessen beteiligt. FoxP3 führt zur Expression von TGF β .

Neben einem FoxP3-Anstieg in Herz und Lymphknoten kam es in der DST-Ischämie-Gruppe zu einem sehr signifikanten FoxP3-Abfall in der Milz. Ob dies einer Migration von regulatorischen T-Zellen aus der Milz entspricht, ist gegenwärtig unklar. Ebenso ist offen, ob es sich hierbei ausschließlich um Empfänger-Tregs handelt, und welche Bedeutung dies haben könnte.

CD4⁺ und CD8⁺ Spender T-Lymphozyten

Yamazaki und Kollegen untersuchten den Stellenwert von CD4- und CD8-positiven T-Zellpopulationen im Hauttransplantationsmodell der Maus zur Erlangung eines partiellen Chimärismus. Es wurden Splenozyten einer B6C3F1-Maus, der Kreuzung aus einer weiblichen C57BL/6- und einer männlichen C3H-Maus, gewonnen. Die Splenozyten wurden anschließend entweder CD4⁺- oder CD8⁺-T-Zell depletiert. Die aufbereiteten Splenozyten wurden 30 Tage nach Erhalt des Skingrafts einer vorbehandelten C3H/He-Maus intravenös verabreicht. Nach Verabreichen einer CD8⁺-T-Zell

depletierten DST trat kein Chimärismus auf. Nach Gabe einer CD4⁺-T-Zell depletierten DST bildete sich hingegen ein partieller Chimärismus aus. Jedoch unterblieb dabei der Reifungsprozess naiver CD8⁺-T-Zellen zu zytotoxischen T-Lymphozyten (CTLs) (vgl. Abb. 30) (Yamazaki, Kanamoto et al. 2013).

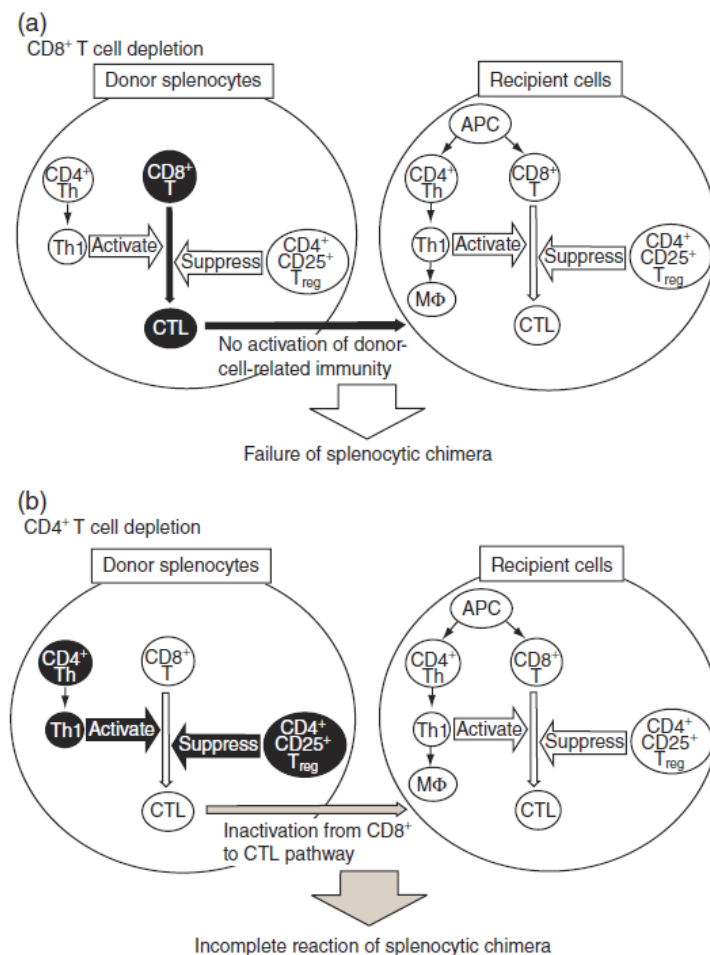


Abbildung 30: Depletion einzelner T-Zell Untergruppen und ihre Wirkung auf induzierbaren Chimärismus. Nach Depletion von CD8⁺ Spender-T-Zellen konnte sich bei DST-Gabe kein partieller Chimärismus ausbilden. Bei Depletion von CD4⁺ Spender-T-Zellen kam es bei DST-Gabe zu einem partiellen Chimärismus. Naive zytotoxische T-Zellen wurden nicht aktiviert (Yamazaki, Kanamoto et al. 2013).

Dementsprechend scheinen CD8⁺-T-Zellen des Spenders eine mögliche Rolle bei der Ausbildung eines partiellen Chimärismus zu spielen. Bei einem Fehlen von CD8⁺-T-Zellen unterbleibt sowohl die Ausbildung eines partiellen Chimärismus als auch einer zytotoxischen Immunreaktion gegen Empfänger-Zellen. CD4⁺-T-Helfer-Zellen sind für die Aktivierung naiver CD8⁺-T-Zellen zu zytotoxischen T-Zellen und für die Bildung von CD8⁺-Gedächtniszellen nötig. Bei Gabe der CD4⁺-T-Zell depletierten DST kommt es daher aufgrund der fehlenden Zellinteraktion zwischen naiven T-Zellen und T-

Helferzellen nicht zu einer spenderseitigen zytotoxischen Aktivität, jedoch schienen verbliebene naive CD8⁺-T-Zellen in der Lage einen Teil des Knochenmarks zu ersetzen und auf diese Weise einen partiellen Chimärismus zu induzieren (Yamazaki, Kanamoto et al. 2013).

Spender B-Lymphozyten

Die Bedeutung von mittels DST verabreichten Spender B-Lymphozyten für die Ausbildung einer Transplantattoleranz ist wenig erforscht und ein potentieller Mechanismus ihres Beitrages weitgehend ungeklärt. Gao und Kollegen haben in einem allogenen Hauttransplantationsmodell mit MHC-Klasse-I-Mismatch an Mäusen nach DST-Gabe eine permanente Transplantatakzeptanz zeigen können. Um die Kinetik und den immunologischen Beitrag von Spender B-Lymphozyten zu untersuchen, wurden wahlweise CD19⁺ oder CD19⁻ selektierte B-Lymphozyten prätransplant intravenös als DST verabreicht und anschließend ihr prozentualer Anteil, sowie ihre absolute Anzahl in Knochenmark, Lymphknoten, Milz und Thymus des Empfängertieres bestimmt. Als Zeitpunkte wurden Tag 2 und Tag 7 nach DST-Gabe gewählt. Vitale Spenderzellen wurden vor allem in Lymphknoten und Milz gefunden, deutlich weniger in Knochenmark und Thymus.

Bei alleiniger Gabe von CD19⁺ B-Lymphozyten wurde, verglichen mit der Kontrollgruppe ohne DST-Gabe, ein hoch signifikant verlängertes, spenderspezifisches Allograftsurvival festgestellt (61 vs. 21 Tage). Jedoch waren B-Lymphozyten allein nicht in der Lage eine permanente Transplantattoleranz zu erzeugen. Nach Gabe von CD19⁻ B-Lymphozyten zeigte sich kein signifikant verlängertes Organsurvival (Gao, McIntyre et al. 2013).

Aktiviert Spender B-Lymphozyten sind, ähnlich reifen Dendritischen Zellen, in der Lage, Alloantigene zu präsentieren. Beide Zelltypen sind befähigt die Aktivierung und Proliferation von regulatorischen T-Zellen im Empfänger zu fördern. Tregs schienen im Transplantationsmodell von Gao verstärkt von auf B-Zellen präsentierten Alloantigenen aktiviert zu werden. Dies wurde einerseits auf die verstärkte Expression von Alloantigenen auf der Oberfläche von aktivierten B-Zellen gegenüber reifen Dendritischen Zellen zurückgeführt, andererseits ließen sich nach unselektionierter DST-Gabe nahezu keine Dendritischen Zellen des Spenders in Lymphknoten und Milz nachweisen. Von Spender B-Lymphozyten geprimte Tregs zeigten anschließend eine hohe zytotoxische Aktivität gegen körpereigene CD8⁺ T-Zellen des Empfängers, die sich gegen MHC-Moleküle des Spenders richteten. Zudem ist es den geprimten regulatorischen T-Zellen möglich körpereigene B- und NK-Zellen zu hemmen (Ford McIntyre, Gao et al. 2011; Gao, McIntyre et al. 2013).

In dieser Arbeit waren knapp drei Viertel der mittels DST verabreichten Zellen B-Lymphozyten. Eine große Mehrheit davon machten naive B-Zellen aus, insgesamt waren rund fünf Prozent der Spenderzellen reife B-Lymphozyten. Bei Gabe von B-Lymphozyten scheint der Zeitpunkt der

Applikation entscheidend. Erfolgt die B-Zell-Gabe bereits wenige Tage vor Organtransplantation, wirkt sich das scheinbar positiv auf das Graftsurvival aus. Erfolgen Transplantation und die Gabe von DST simultan, kann dies den angestrebten Effekt der B-Lymphozyten herabsetzen. Die injizierten B-Zellen wirken vor allem in Milz und Lymphknoten über die oben beschriebenen Mechanismen.

Dendritische Spenderzellen

Dendritische Zellen sind in ihrer Rolle als antigenpräsentierende Zellen wirkungsvoll. Sie haben die Fähigkeit, sowohl das angeborene als auch das adaptive Immunsystem zu regulieren. Vor allem ihre Wirkung auf regulatorische T-Zellen und Effektor-T-Zellen kann zu einer wesentlichen Verlängerung von transplantierten Allografts führen (Ezzelarab and Thomson 2011).

Die intravenöse Gabe von unreifen Dendritischen Spenderzellen eine Woche vor Organtransplantation führte im murinen Herztransplantationsmodell zu einer signifikanten Verzögerung der Transplantatabstoßung von 9.5 auf 22 Tage (Fu, Li et al. 1996). Durch eine adjuvante Costimulationsblockade, T-Zelldepletion oder Gabe von reifungsresistenten Dendritischen Zellen konnte eine Abstoßung stark verzögert oder gänzlich unterbunden werden. Reifungsresistente Dendritische Zellen behalten ihre Fähigkeit zur Phagozytose, Migration und Antigenverarbeitung bei, während reife Dendritische Zellen sich in Lymphknoten oder Thymus ansiedeln und an ihrer Oberfläche exprimierte MHC-Klasse-II-Moleküle präsentieren (Lutz, Suri et al. 2000). Ebenso konnte bereits die Gabe von Dendritischen Vorläuferzellen vor Transplantation das Organsurvival nach heterotoper Herztransplantation signifikant von 9 auf 22 Tage verlängern (Abe, Wang et al. 2005).

Yamano und Kollegen verabreichten Mäusen in einem Hauttransplantationsmodell intravenös Dendritische Zellen, die vorausgehend in vitro mit einem Flt3-Ligand (FMS-related-tyrosine-kinase-3-Ligand) induziert wurden. Der Flt3-Ligand hat Einfluss auf die Entwicklung von Dendritischen Zellen. Die vorbehandelten DCs migrierten anschließend in Lymphknoten und Thymus des Empfängertieres, wo spenderreaktive CD4- und CD8-T-Zellen via negativer Selektion aussortiert wurden. Es kam zur Induktion von zentraler und peripherer Toleranz, die zu einem verlängerten spenderspezifischen Transplantatsurvival führte (Yamano, Watanabe et al. 2011).

Die intravenöse Gabe von reifungsresistenten Dendritischen Spender Zellen führte in Mäusen durch den Kontakt von Dendritischen Empfängerzellen mit Spenderantigenen zu einem verlängerten Organsurvival. Spenderantigene der Dendritischen Spenderzellen konnten nach Injektion auf den Dendritischen Empfängerzellen nachgewiesen werden. Die Dendritischen Empfängerzellen präsentierten das Fremdantigen den eigenen T-Zellen als körpereigenes Material. Spenderreaktive T-Zellen wurden entsprechend ausselektioniert. Es wird daher angenommen, dass neben der Antigen-

Präsentation therapeutischer Dendritischer Spenderzellen auch der Antigen-Transport im Empfänger von Bedeutung ist (Ezzelarab and Thomson 2011).

Toleranzinduzierende Dendritische Zellen sind in der Lage, ihre Effekte über unterschiedliche Zytokine und Moleküle, wie beispielsweise IL-10 und HO-1 zu vermitteln. Zu den wesentlichen toleranzinduzierenden Wirkungsweisen gehören die Induktion von regulatorischen T-Zellen, die u.a. via IL-2, IL-10 und TGF β die Proliferation von Effektor-T-Zellen hemmen und ihre Apoptose induzieren und die Induktion von Anergie und Deletion von spenderreaktiven T-Gedächtniszellen. Zudem fördern endogene antigenpräsentierende Zellen im Thymus via negativer und positiver Selektion die Neubildung von gegenüber dem Antigen nun toleranten T-Zellen (vgl. Abb. 31) (Ezzelarab and Thomson 2011; Vassalli 2013).

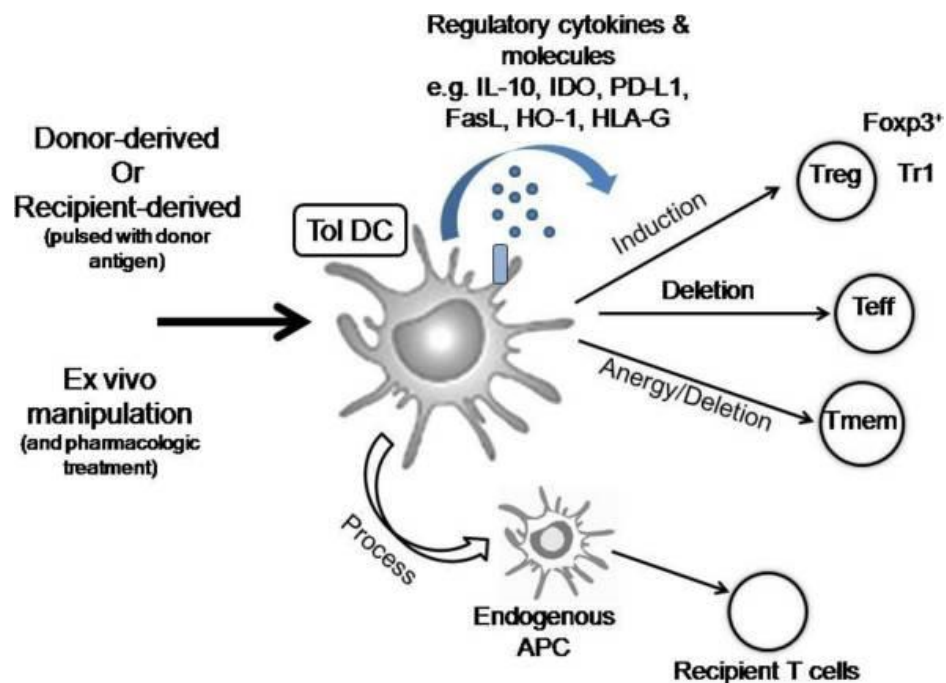


Abbildung 31: Tolerogene Dendritische Zellen (Tol DCs) exprimieren Oberflächenmarker und sezernieren Mediatoren, die eine regulatorische Wirkung auf Empfänger T-Zellen haben. Dabei kann eine Toleranz gegenüber Spenderantigenen auf unterschiedliche Weise erreicht werden. Durch Induktion von regulatorischen T-Zellen, Deletion von Effektor T-Zellen, sowie Induktion von Anergie oder Deletion von T-Gedächtniszellen. Durch das Übertragen von Spender-Antigenen auf endogene APCs erkennen nachfolgende Generationen von Empfänger T-Zellen die Spenderantigene als körpereigen an (Ezzelarab and Thomson 2011).

In der murinen Milz finden sich sowohl Dendritische Zellen als auch dendritische Vorläuferzellen (Naik 2006). Eine Unterteilung in Vorläuferzellen, unreife und reife dendritische Zellen wurde in dieser Arbeit nicht durchgeführt. Insgesamt wurden via DST $1,7 \times 10^5$ Dendritische Zellen intravenös injiziert. Die Bedeutung Dendritischer Zellen in unserem Modell ist anhand der gewonnenen Ergebnisse nicht genau einzuordnen, da keiner der untersuchten Mediatoren DC-spezifisch ist. Ob

eine ansteigende Expression von antiinflammatorischen Zytokinen wie beispielsweise HO-1 und IL-10 im Herzen von Tag 1 zu Tag 5 unter anderem auf DCs zurückzuführen ist, erscheint fraglich. Denkbar hingegen erscheint eine verstärkte HO-1-Expression in der Milz einen Tag nach intravenöser DST-Gabe, da Dendritische Zellen mit der Zirkulation des Blutes zum Teil in die Milz transportiert werden.

Avitale Zellen

In der intravenös verabreichten DST befanden sich zudem avitale Splenozyten bzw. deren Zellbestandteile. Im Lysat von Spenderzellen, Exosomen und apoptotischen Zellkörpern sind spenderspezifische Alloantigene enthalten. Gelangen diese Antigene in die sekundären lymphatischen Organe des Empfängers, können sie durch APCs präsentiert werden und fördern eine T-Zell vermittelte Immunreaktion. Der potentielle Einfluss und die Wirkmechanismen bei Gabe von avitalen Zellen zum Zeitpunkt der heterotopen Herztransplantation auf die Transplantattoleranz ist weitestgehend ungeklärt (Ezzelarab and Thomson 2011).

Zusammenfassend beinhaltet die intravenös verabreichte DST mehrere potente immunregulierende Zellpopulationen, die in der Lage sind, die akute Abstoßung signifikant abzumildern. Aus dem gewählten Modell ist nicht abzuleiten, wie groß der jeweilige Beitrag der einzelnen Zellpopulationen ist. Eine zellspezifische Differenzierung bleibt weiteren Untersuchungen vorbehalten.

7.4 Transplantatüberleben

Vergleicht man das durchschnittliche Organsurvival im heterotopen, murinen Herztransplantationsmodell mit den Ergebnissen anderer Arbeitsgruppen bei gleichem Setting, zeigt sich für die Kontrollgruppen ein vergleichbarer Wert. Der Zeitpunkt der Abstoßung des Spenderherzens in den Kontrollgruppen wird in der Literatur mit sieben bis acht (± 1.0) Tagen nach Transplantation angegeben. Xiao und Kollegen liegen mit einem durchschnittlichem Organsurvival von 6.5 Tagen an der unteren Norm, Zhuang und Kollegen mit 7.75 Tagen im Mittelfeld und Sucher und Kollegen mit knapp 9 Tagen an der oberen Normgrenze (Xiao, Fu et al. 2011; Sucher, Fischler et al. 2012; Zhuang, Shan et al. 2014). Das Ergebnis von 7.8 Tagen im durchschnittlichen Organsurvival in der Kontrollgruppe mit sechstündiger Ischämiephase, liegt somit in der von der Literatur beschriebenen Norm.

Mit Chimärismus auch in Kombination mit myeloablativen Verfahren, T-Zell Depletion, Co-Stimulationsblockade und immunsuppressiver Therapie existieren bereits effektive Ansätze, eine akute Abstoßung zu kontrollieren und das Transplantatüberleben deutlich zu verlängern (Pilat, Baranyi et al. 2010; Pilat, Farkas et al. 2013; Yamazaki, Kanamoto et al. 2013; Yang, Song et al. 2014). Die Erwartung dieses Projekts war es nicht, durch einmalige DST-Gabe ein vergleichbar verlängertes

Organsurvival erzielen zu können, sondern vielmehr einen potentiellen grundlegenden Ansatz zur Toleranzinduktion auf Mediatorebene ausfindig zu machen.

Eine sehr signifikante Steigerung des Organsurvival von 7.8 auf 14.6 Tage durch die Gabe von Spendersplenozyten ohne jedwede Vorbehandlung oder begleitende Immunsuppression bei komplettem MHC-Mismatch ist bemerkenswert. Es ist jedoch unklar, welche Zellsubpopulation welchen Anteil an diesem Effekt hat. Auch scheint keiner der untersuchten Mediatoren singulär diesen Effekt zu vermitteln.

7.5 Histologie

In der histologischen Untersuchung der Spenderherzen konnte im Vergleich der DST-Gruppe zur Kontrollgruppe, jeweils mit sechsstündiger Ischämiephase und somit dem klinischen Setting einer Organtransplantation entsprechend, eine Überlegenheit der DST-Gruppe zu allen Zeitpunkten gezeigt werden. Die Bewertung erfolgte mittels ISHLT-Score und kumulativen modifizierten ISHLT-Score. Der letzte gemeinsam bestimmte, histologisch aufgearbeitete Zeitpunkt nach Transplantation war Tag 5.

Für Empfängertiere, die während der Herztransplantation eine spenderspezifische Transfusion mit Spendersplenozyten erhielten, zeigte sich neben einem sehr signifikant verlängertem Organsurvival (14.6 vs. 7.8 Tage, $p=0.0019$) auch ein entsprechendes histologisches Korrelat. So war die akute Abstoßung in der Bewertung mit beiden Scores in der DST+Ischämie-Gruppe an Tag 5 nach Transplantation signifikant geringer ausgeprägt (1.4 vs. 2.2 mittels ISHLT ($p<0.05$) bzw. 6.4 vs. 9.8 mittels kumulativem Score ($p<0.05$)).

Das Ausmaß der akuten Abstoßung wird durch DST-Gabe signifikant vermindert. In wieweit eine DST-Transfusionsstrategie Teil einer zukünftigen immunmodulierenden Therapie sein sollte, bleibt abzuwarten. Selbstverständlich ist nicht zu erwarten, dass eine DST-Gabe alleine in der Lage ist, eine akute Abstoßung vollständig zu unterdrücken. Einem transienten Chimärismus mit DST kommt jedoch eindeutig ein relevanter, protektiver Beitrag zu.

7.6 Mediatoren

FoxP3 ist zentral an der Regulation der Immunantwort nach Transplantation beteiligt. In dieser Arbeit zeigte sich nach intravenöser DST-Gabe eine deutliche Zunahme der FoxP3-Expression im Transplantat und umgebenden Empfängerlymphknoten. In der Langzeitgruppe erfolgte die Organentnahme am Tag der finalen Transplantatabstoßung. In der DST-Ischämiegruppe war dieser Zeitpunkt signifikant später als in der Kontrollgruppe (Tag 14.6 vs. 7.8, $p=0.0019$). Die Expression von FoxP3 war zu diesem Zeitpunkt in Spenderherzen, Lymphknoten und Milz größer als in der Kontrollgruppe. Da FoxP3 spezifisch für regulatorische T-Zellen ist, scheinen Tregs (gemessen an der

angestiegenen FoxP3-Expression) durch Regulation immunreaktiver, inflammatorischer Prozesse einen aktiven, protektiven Einfluss auf das Transplantat auszuüben (Rudensky 2011; Ramsdell and Ziegler 2014).

Eine gesteigerte **HO-1**-Expression hat nachweislich einen protektiven Einfluss auf transplantierte, kardiale Allografts (Wu, Ho et al. 2011). An Tag 5 nach Transplantation ist die HO-1-Expression im Spenderherzen und den umliegenden Lymphknoten der DST-Gruppe im Vergleich zur Kontrollgruppe erhöht. An Tag 1 nach DST-Gabe ist ein vorübergehender Peak der HO-1-Expression in der Milz zu erkennen. Welche Zellen Ursprung der gesteigerten Expression sind, ist unklar. Mehrere der in die Zirkulation des Empfängers injizierten und in die Milz gelangten Spendersplenozyten können HO-1 exprimieren. HO-1 hemmt im Empfänger die Zytokinproduktion der Th-1-Zellen, vermindert die Transplantatinfiltration von spenderreaktiven Zellen und trägt durch seine Substrate CO und Bilirubin (Substrate des Häm-Abbaus) zur Transplantatprotektion bei (Liu, Wei et al. 2005; Durante 2010; Paine, Eiz-Vesper et al. 2010). In der DST+Resveratrol-Gruppe führte die orale Gabe von Resveratrol an Tag 1 nach Transplantation im Spenderherzen zu einer signifikant erhöhten HO-1-Expression ($p < 0,01$). Dieser Effekt war an Tag 3 und Tag 5 nicht mehr zu erkennen. An Tag 5 konnte histologisch kein signifikanter Unterschied zwischen DST+Resveratrol- und DST-Gruppe festgestellt werden.

IL-6 ist als Immunregulator je nach Signalkaskade in der Lage, protektive oder inflammatorische Prozesse zu vermitteln (Luu, Greenhill et al. 2014; McLoughlin, Jenkins et al. 2005; Mihara, Hashizume et al. 2012). Die Interpretation der Expressions-Werte und ihre Wirkung auf das Gewebe ist in diesem Modell daher nur eingeschränkt möglich. In der DST-Gruppe zeigt sich im Vergleich zur Kontrollgruppe an Tag 1 eine deutlich höhere IL-6-Expression in Lymphknoten und Milz, die im Verlauf rückläufig ist. Eine frühe protektive Wirkung durch Hemmung der MHC-II-Expression auf APCs und Einflussnahme der Chemokin- und Chemokinrezeptorregulation ist denkbar. Zum Zeitpunkt der finalen Abstoßung ist die IL-6-Expression in Transplantat und Lymphknoten der Kontrollgruppe signifikant höher. Ob IL-6 zu diesem Zeitpunkt vor allem proinflammatorische Effekte fördert und somit eine aktive Rolle in der Abstoßung des Allografts einnimmt ist unklar.

IL-10 hat einen besonderen Stellenwert in der Entwicklung von Immuntoleranz. Der starke Anstieg der IL-10-Expression im Spenderherzen von Tag 1 zu Tag 5 ist in der DST-Gruppe deutlicher ausgeprägt. Die vermehrte IL-10-Expression wirkt protektiv auf das Transplantat, indem es Inflammation und Aktivierung von Effektor-T-Zellen hemmt und die Immunantwort von Th1 zu Th2 verschiebt (Hofmann, Rosen-Wolff et al. 2012; Ng, Britton et al. 2013; MacKenzie, Pattison et al. 2014). Zum jeweiligen Zeitpunkt des Transplantatverlusts zeigt sich hingegen eine deutlich höhere IL-10-Expression in Herzen, Lymphknoten und Milz der Kontrollgruppe. In der FoxP3-Gruppe verhält

sich dies gegensätzlich. Welchen Stellenwert IL-10 zum Zeitpunkt der finalen Abstoßung hat, wird derzeit noch nicht vollständig verstanden.

TGFβ ist ein weiteres, zentrales Zytokin in der Regulation der Immunreaktion (Kang, Liu et al. 2009). Im Herzen ist die Expression von TGFβ an Tag 1 in der Kontrollgruppe gegenüber der DST-Gruppe erhöht. Zu Tag 5 hin hat sich die Expression zwischen den beiden Gruppen angeglichen. In der Milz der DST-Gruppe kommt es an Tag 3 zu einem Expressionspeak. In den Lymphknoten kommt es an Tag 3 in der Kontrollgruppe zu einem Peak, in der DST-Gruppe hingegen steigt die Expression von TGFβ von Tag 1 zu Tag 5 stetig an. Dabei verhält sich die Expression von FoxP3 und TGFβ in den das Transplantat umgebenden Lymphknoten kongruent. Da FoxP3 die Expression von TGFβ fördert, ist eine Treg-induzierte Regulation von Inflammation, Chemotaxis und Effektor-T-Zellen via TGFβ in Lymphknoten nach DST-Gabe denkbar (Travis and Sheppard 2014). In der DST-Gruppe ist die Expression von TGFβ im Spenderherzen zum Zeitpunkt der finalen Abstoßung im Vergleich mit der Kontrollgruppe stärker ausgeprägt.

TNFα ist ein proinflammatorisch wirksames Zytokin, das abstoßungsfördernde Effekte vermittelt (Parameswaran and Patial 2010). TNFα fördert Proliferation, Differenzierung und Apoptose verschiedener Zellgruppen. Besondere Bedeutung kommt dabei der Regulation von T-Zellen zu. Ferner fördert es Chemotaxis und die Sekretion weiterer proinflammatorisch wirksamer Zytokine (Munoz, Carlet et al. 1991; Conte, Holcik et al. 2006). Die Expression von TNFα steigt nach Herztransplantation im Transplantat in beiden Gruppen an. Dies ist mutmaßlich in erster Linie auf spenderreaktive Empfängerzellen zurückzuführen (Effektor T-Zellen, NK-Zellen). An Tag 5 ist die TNFα-Expression in der DST-Gruppe im Herzen höher als in der Kontrollgruppe. Somit zeigt sich interessanterweise nicht nur ein Anstieg protektiver Mediatoren im Herzen, sondern auch des proinflammatorischen Zytokins TNFα. Vergleicht man die Expression von TNFα in der Milz an Tag 1, ist sie in der DST-Gruppe deutlich höher und fällt anschließend von Tag 1 zu Tag 5 kontinuierlich ab. In der Kontrollgruppe ist die Expression an Tag 5 höher als in der DST-Gruppe. Die starke TNFα-Expression an Tag 1 ist vermutlich als Effekt des Aufeinandertreffens der Spendersplenozyten und den milzständigen Empfängerzellen zu verstehen. Ob anschließend Zellen der injizierten DST zu einer Reduktion der Expression von TNFα führen ist unklar. In den Langzeitgruppen ist die TNFα-Expression in Herzen, Lymphknoten und Milz in der DST-Gruppe geringer.

8. Zusammenfassung

Die Organtransplantation ist der derzeitige therapeutische Goldstandard bei Funktionsverlust lebensnotwendiger Organe und ermöglicht, das Leben schwer kranker Menschen zu bewahren und ihre Lebensqualität deutlich zu verbessern. Ein bislang leider noch unerreichtes Ziel der Transplantationsmedizin ist die Induktion einer dauerhaften Toleranz zwischen Transplantat und Transplantatempfänger. Dies würde neben dem Unterbinden von Abstoßungsreaktionen auch den Verzicht auf Immunsuppressiva und deren Nebenwirkungen bedeuten.

Das heterotope, cervikale Herztransplantationsmodell an der Maus hat sich in der Transplantationsmedizin als gut geeignet erwiesen, um akute Abstoßungsreaktionen in vivo zu untersuchen. Fragestellung dieser Arbeit war, ob durch die Gabe von DST (Spendersplenozyten) bei komplettem MHC-Mismatch eine verbesserte Transplantattoleranz via partiellem Chimärismus erzielt werden kann, gemessen an verlängertem Transplantatüberleben und histologischem Grad der akuten Transplantatabstoßung an Tag 5 nach Transplantation. Zusätzlich wurde die Expression potentiell beteiligter Mediatoren (FoxP3, HO-1, IL-6, IL-10, TGF β und TNF α), sowie der Einfluss von Resveratrol auf die Expression von HO-1 mittels quantitativer PCR untersucht. Eine klinische Transplantationssituation wurde durch eine sechsstündige Ischämiephase simuliert. Insgesamt wurden 90 Herzen erfolgreich transplantiert mit einer primären technischen Erfolgsrate von 96,5%. Als Empfängertiere wurden männliche C57BL6-Mäuse verwendet. Spenderherz und Milz für die DST-Gewinnung wurden aus zwei BALB/c-Mäusen eines Inzuchtstammes entnommen.

Es zeigte sich ein signifikant verlängertes Organüberleben in Mäusen, denen zum Zeitpunkt der Transplantation intravenös DST (22.5×10^6 Spendersplenozyten) injiziert wurde. Das durchschnittliche Organüberleben konnte von 7.8 Tagen in der Kontrollgruppe auf 14.6 Tage in der DST-Gruppe verlängert werden ($p=0.0019$). Histologisch zeigte sich an Tag 5 nach Transplantation eine signifikant verminderte Abstoßung in der DST-Gruppe. Der Grad der Abstoßung wurde mittels ISHLT-Rejection-Score (0-3) und modifiziertem, kumulativem ISHLT-Rejection-Score (0-12) erhoben. Der ISHLT-Rejection-Score war in der DST-Gruppe mit 1.4 vs. 2.2 signifikant niedriger als in der Kontrollgruppe ($p<0.05$). Im modifizierten, kumulativen ISHLT-Rejection-Score war der Grad der Abstoßung mit 6.4 vs. 9.8 in der DST-Gruppe ebenfalls signifikant niedriger als in der Kontrollgruppe ($p<0.05$). Die organprotektiven Wirkmechanismen der DST auf das Transplantat konnten bislang nicht vollständig geklärt werden. Auf der Suche nach zugrunde liegenden Mechanismen wurden mittels quantitativer PCR an Tag 1, 3 und 5 die Expressionslevel verschiedener immunregulatorisch wirksamer Mediatoren im Spenderherzen und in transplantatnahen Empfängerlymphknoten, sowie Empfänger milz bestimmt. Gewählt wurden dafür Forkhead-Box-Protein-P3 (FoxP3), Hämoxygenase-1 (HO-1), Interleukin-6 (IL-6), Interleukin-10 (IL-10), Tumor-Growth-Factor-Beta (TGF β) und Tumor-

Nekrose-Faktor-Alpha (TNF α). Um potentielle protektive Effekte nicht zu überlagern wurde auf eine Costimulationsblockade und Immunsuppressiva verzichtet und ein nicht-myeloablatives Chimärismusmodell gewählt.

In den Spenderherzen der DST-Gruppe zeigte sich im Vergleich zur Kontrollgruppe an Tag 5 eine hoch signifikant gesteigerte Expression von FoxP3 ($p < 0.001$). In den Lymphknoten der DST-Gruppe, nicht jedoch der Kontrollgruppe, stieg die Expression von FoxP3 von Tag 1 zu Tag 5 tendenziell an. In der Milz kam es in der DST-Gruppe, nicht jedoch in der Kontrollgruppe, von Tag 1 zu Tag 5 zu einer sehr signifikanten Abnahme der FoxP3-Expression ($p < 0.01$). Zum Zeitpunkt der endgültigen Abstoßung ist FoxP3 in Spenderherz und Milz der DST-Gruppe tendenziell höher exprimiert als in der Kontrollgruppe. FoxP3 scheint somit einen wesentlichen Beitrag zu Transplantattoleranz und Minderung der akuten Abstoßung zu leisten. Da FoxP3 spezifisch für regulatorische T-Zellen (Tregs) ist, scheinen Spender-Tregs durch Modulation immunreaktiver Prozesse einen aktiven, protektiven Einfluss auf das Transplantat auszuüben.

Für die Mediatoren HO-1, IL-6, IL-10, TGF β und TNF α zeigten sich Tendenzen, die auf eine Organprotektion durch DST-Gabe hinweisen könnten. Die Expression von HO-1 war in der DST-Gruppe an Tag 5 in Spenderherzen und den umgebenden Lymphknoten im Vergleich zur Kontrollgruppe deutlich, jedoch nicht signifikant erhöht. Die IL-10-Expression im Herzen stieg in der DST-Gruppe von Tag 1 zu Tag 5 deutlich stärker an als in der Kontrollgruppe. In den Lymphknoten kam es nur in der DST-Gruppe von Tag 1 zu Tag 5 zu einem signifikanten Anstieg der TGF β -Expression ($p < 0.05$).

Die Gabe von Resveratrol führte an Tag 1 nach Transplantation in der DST+Resveratrol- gegenüber der DST-Gruppe zu einem sehr signifikanten Anstieg der HO-1-Expression im Spenderherzen ($p < 0.01$). Diesbezüglich konnte jedoch histologisch an Tag 5 kein Vorteil auf die akute Abstoßung festgestellt werden.

Es war nicht zu erwarten, durch einmalige DST-Gabe zum Zeitpunkt der Organtransplantation eine dauerhafte Transplantationstoleranz erwirken zu können. Jedoch könnte die Gabe von DST oder einem Bestandteil der DST potentiell ein gut verträglicher Teilbeitrag einer zukünftigen Strategie auf dem Weg zum Ziel einer Transplantattoleranz sein. Als Zelltyp scheinen regulatorische T-Zellen, als Mediator FoxP3 vielversprechende Kandidaten zu sein, die weiter untersucht werden sollten.

9. Literaturverzeichnis

- Abbott, C. P., E. S. Lindsey, et al. (1964). "A Technique for Heart Transplantation in the Rat." Arch Surg **89**: 645-652.
- Abe, M., Z. Wang, et al. (2005). "Plasmacytoid dendritic cell precursors induce allogeneic T-cell hyporesponsiveness and prolong heart graft survival." Am J Transplant **5**(8): 1808-1819.
- Afzali, B., P. J. Mitchell, et al. (2013). "CD161 expression characterizes a subpopulation of human regulatory T cells that produces IL-17 in a STAT3-dependent manner." Eur J Immunol **43**(8): 2043-2054.
- Ahmed, F., S. Friend, et al. (2009). "Numbers matter: quantitative and dynamic analysis of the formation of an immunological synapse using imaging flow cytometry." J Immunol Methods **347**(1-2): 79-86.
- Alfonso, C., J. O. Han, et al. (2001). "The impact of H2-DM on humoral immune responses." J Immunol **167**(11): 6348-6355.
- Apetoh, L., F. J. Quintana, et al. (2010). "The aryl hydrocarbon receptor interacts with c-Maf to promote the differentiation of type 1 regulatory T cells induced by IL-27." Nat Immunol **11**(9): 854-861.
- Atkinson, C., S. He, et al. (2010). "Targeted complement inhibitors protect against posttransplant cardiac ischemia and reperfusion injury and reveal an important role for the alternative pathway of complement activation." J Immunol **185**(11): 7007-7013.
- Barbagallo, I., F. Galvano, et al. (2013). "Potential therapeutic effects of natural heme oxygenase-1 inducers in cardiovascular diseases." Antioxid Redox Signal **18**(5): 507-521.
- Barker, C. F. and J. F. Markmann (2013). "Historical overview of transplantation." Cold Spring Harb Perspect Med **3**(4): a014977.
- Barnard, C. N. (1967). "The operation. A human cardiac transplant: an interim report of a successful operation performed at Groote Schuur Hospital, Cape Town." S Afr Med J **41**(48): 1271-1274.
- Baumans, V. (2005). "Science-based assessment of animal welfare: laboratory animals." Rev Sci Tech **24**(2): 503-513.
- Baur, B., M. Oroszlan, et al. (2011). "Efficacy and safety of sirolimus and everolimus in heart transplant patients: a retrospective analysis." Transplant Proc **43**(5): 1853-1861.
- Berg, D. J., J. Zhang, et al. (2001). "IL-10 is a central regulator of cyclooxygenase-2 expression and prostaglandin production." J Immunol **166**(4): 2674-2680.
- Bloom, D. D., H. Hu, et al. (2006). "T-lymphocyte alloresponses of Campath-1H-treated kidney transplant patients." Transplantation **81**(1): 81-87.
- Bradley, J. A., E. M. Bolton, et al. (2002). "Stem cell medicine encounters the immune system." Nat Rev Immunol **2**(11): 859-871.
- Cahoon, W. D., C. R. Ensor, et al. (2012). "Alemtuzumab for cytolytic induction of immunosuppression in heart transplant recipients." Prog Transplant **22**(4): 344-349; quiz 350.
- Cantarovich, D. (2004). "Prevention of acute rejection with antithymocyte globulin (Thymoglobuline): its potential to reduce corticosteroids." J Nephrol **17 Suppl 8**: S40-46.
- Cantarovich, M., N. Giannetti, et al. (2004). "Antithymocyte globulin induction allows a prolonged delay in the initiation of cyclosporine in heart transplant patients with postoperative renal dysfunction." Transplantation **78**(5): 779-781.
- Chen, W., W. Jin, et al. (2003). "Conversion of peripheral CD4+CD25- naive T cells to CD4+CD25+ regulatory T cells by TGF-beta induction of transcription factor Foxp3." J Exp Med **198**(12): 1875-1886.
- Chen, Z. H. (1991). "A technique of cervical heterotopic heart transplantation in mice." Transplantation **52**(6): 1099-1101.
- Chinen, J. and R. H. Buckley (2010). "Transplantation immunology: solid organ and bone marrow." J Allergy Clin Immunol **125**(2 Suppl 2): S324-335.
- Collison, L. W., C. J. Workman, et al. (2007). "The inhibitory cytokine IL-35 contributes to regulatory T-cell function." Nature **450**(7169): 566-569.

- Conte, D., M. Holcik, et al. (2006). "Inhibitor of apoptosis protein cIAP2 is essential for lipopolysaccharide-induced macrophage survival." *Mol Cell Biol* **26**(2): 699-708.
- Corry, R. J., H. J. Winn, et al. (1973). "Heart transplantation in congenic strains of mice." *Transplant Proc* **5**(1): 733-735.
- Corry, R. J., H. J. Winn, et al. (1973). "Primarily vascularized allografts of hearts in mice. The role of H-2D, H-2K, and non-H-2 antigens in rejection." *Transplantation* **16**(4): 343-350.
- Dranoff, G. (2004). "Cytokines in cancer pathogenesis and cancer therapy." *Nat Rev Cancer* **4**(1): 11-22.
- Durante, W. (2010). "Targeting heme oxygenase-1 in vascular disease." *Curr Drug Targets* **11**(12): 1504-1516.
- Edozie, F. C., E. A. Nova-Lamperti, et al. (2014). "Regulatory T-cell therapy in the induction of transplant tolerance: the issue of subpopulations." *Transplantation* **98**(4): 370-379.
- Eisen, H. J., R. E. Hobbs, et al. (2001). "Safety, tolerability, and efficacy of cyclosporine microemulsion in heart transplant recipients: a randomized, multicenter, double-blind comparison with the oil-based formulation of cyclosporine--results at 24 months after transplantation." *Transplantation* **71**(1): 70-78.
- Eisen, H. J., J. Kobashigawa, et al. (2005). "Three-year results of a randomized, double-blind, controlled trial of mycophenolate mofetil versus azathioprine in cardiac transplant recipients." *J Heart Lung Transplant* **24**(5): 517-525.
- Eisen, H. J., J. Kobashigawa, et al. (2013). "Everolimus versus mycophenolate mofetil in heart transplantation: a randomized, multicenter trial." *Am J Transplant* **13**(5): 1203-1216.
- Ezzelarab, M. and A. W. Thomson (2011). "Tolerogenic dendritic cells and their role in transplantation." *Semin Immunol* **23**(4): 252-263.
- Feldmann, D. L. and T.C. Mogelsky (1987). "Use of Histopaque for isolating mononuclear cells from rabbit blood." *J Immunol Methods* **102**(2): 243-249
- Ferrandiz, M. L. and I. Devesa (2008). "Inducers of heme oxygenase-1." *Curr Pharm Des* **14**(5): 473-486.
- Ford McIntyre, M. S., J. F. Gao, et al. (2011). "Consequences of double negative regulatory T cell and antigen presenting cell interaction on immune response suppression." *Int Immunopharmacol* **11**(5): 597-603.
- Fu, F., Y. Li, et al. (1996). "Costimulatory molecule-deficient dendritic cell progenitors (MHC class II+, CD80dim, CD86-) prolong cardiac allograft survival in nonimmunosuppressed recipients." *Transplantation* **62**(5): 659-665.
- Fuchs, E. J. (2014). "Transplantation tolerance: from theory to clinic." *Immunol Rev* **258**(1): 64-79.
- Fujii, D., J. E. Brissenden, et al. (1986). "Transforming growth factor beta gene maps to human chromosome 19 long arm and to mouse chromosome 7." *Somat Cell Mol Genet* **12**(3): 281-288.
- Gao, J., M. S. McIntyre, et al. (2013). "Pretransplant infusion of donor B cells enhances donor-specific skin allograft survival." *PLoS One* **8**(10): e77761.
- Golshayan, D., S. Jiang, et al. (2007). "In vitro-expanded donor alloantigen-specific CD4+CD25+ regulatory T cells promote experimental transplantation tolerance." *Blood* **109**(2): 827-835.
- Gondek, D. C., L. F. Lu, et al. (2005). "Cutting edge: contact-mediated suppression by CD4+CD25+ regulatory cells involves a granzyme B-dependent, perforin-independent mechanism." *J Immunol* **174**(4): 1783-1786.
- Gonzalez-Vilchez, F., J. A. de Prada, et al. (2008). "Avoidance of calcineurin inhibitors with use of proliferation signal inhibitors in de novo heart transplantation with renal failure." *J Heart Lung Transplant* **27**(10): 1135-1141.
- Grimm, M., Rinaldi, M., et al. (2006). "Superior prevention of acute rejection by tacrolimus vs. cyclosporine in heart transplant recipients – a large European trial." *Am J Transplant* **6**(6): 1387-1397.
- Grossman, W. J., J. W. Verbsky, et al. (2004). "Human T regulatory cells can use the perforin pathway to cause autologous target cell death." *Immunity* **21**(4): 589-601.

- Guethoff, S., B. M. Meiser, et al. (2013). "Ten-year results of a randomized trial comparing tacrolimus versus cyclosporine a in combination with mycophenolate mofetil after heart transplantation." Transplantation **95**(4): 629-634.
- Hayashi, Y., S. Yamazaki, et al. (2007). "Splenocytes can replace chimeric cells and maintain allograft tolerance." Transplantation **84**(9): 1168-1173.
- Hirt, S. W., C. Bara, et al. (2013). "Everolimus in heart transplantation: an update." J Transplant **2013**: 683964.
- Hofmann, S. R., A. Rosen-Wolff, et al. (2012). "Biological properties and regulation of IL-10 related cytokines and their contribution to autoimmune disease and tissue injury." Clin Immunol **143**(2): 116-127.
- Holzknicht, Z. E. and J. L. Platt (2000). "The fine cytokine line between graft acceptance and rejection." Nat Med **6**(5): 497-498.
- Huynh, A., R. Zhang, et al. (2014). "Signals and pathways controlling regulatory T cells." Immunol Rev **258**(1): 117-131.
- Juvet, S. C., A. G. Whatcott, et al. (2014). "Harnessing regulatory T cells for clinical use in transplantation: the end of the beginning." Am J Transplant **14**(4): 750-763.
- Kang, J. S., C. Liu, et al. (2009). "New regulatory mechanisms of TGF-beta receptor function." Trends Cell Biol **19**(8): 385-394.
- Kawai, T. and D. H. Sachs (2013). "Tolerance induction: hematopoietic chimerism." Curr Opin Organ Transplant **18**(4): 402-407.
- Kitamura, H., H. Kamon, et al. (2005). "IL-6-STAT3 controls intracellular MHC class II alphabeta dimer level through cathepsin S activity in dendritic cells." Immunity **23**(5): 491-502.
- Kobashigawa, J., L. Miller, et al. (1998). "A randomized active-controlled trial of mycophenolate mofetil in heart transplant recipients. Mycophenolate Mofetil Investigators." Transplantation **66**(4): 507-515.
- Krupnick, A. S., X. Lin, et al. (2009). "Orthotopic mouse lung transplantation as experimental methodology to study transplant and tumor biology." Nat Protoc **4**(1): 86-93.
- Kubo, M. and Y. Motomura (2012). "Transcriptional regulation of the anti-inflammatory cytokine IL-10 in acquired immune cells." Front Immunol **3**: 275.
- Kuhn, R., J. Lohler, et al. (1993). "Interleukin-10-deficient mice develop chronic enterocolitis." Cell **75**(2): 263-274.
- Kuppahally, S., A. Al-Khaldi, et al. (2006). "Wound healing complications with de novo sirolimus versus mycophenolate mofetil-based regimen in cardiac transplant recipients." Am J Transplant **6**(5 Pt 1): 986-992.
- Lee, K., V. Nguyen, et al. (2014). "Attenuation of donor-reactive T cells allows effective control of allograft rejection using regulatory T cell therapy." Am J Transplant **14**(1): 27-38.
- Leventhal, J., M. Abecassis, et al. (2013). "Tolerance induction in HLA disparate living donor kidney transplantation by donor stem cell infusion: durable chimerism predicts outcome." Transplantation **95**(1): 169-176.
- Leventhal, J. R., J. M. Mathew, et al. (2013). "HLA identical non-chimeric and HLA disparate chimeric renal transplant tolerance." Clin Transpl: 145-156.
- Li, B., K. Suemaru, et al. (2006). "Repeated electroconvulsive stimuli increase brain-derived neurotrophic factor in ACTH-treated rats." Eur J Pharmacol **529**(1-3): 114-121.
- Li, C., L. Luo, et al. (2011). "A modified splint tubing technique for heterotopic heart transplantation in mouse." Transpl Immunol **25**(1): 82-87.
- Liu, J. H., F. Zhou, et al. (2010). "[Kinetic study of splenocytes after allogeneic murine bone marrow transplantation]." Zhongguo Shi Yan Xue Ye Xue Za Zhi **18**(4): 1013-1016.
- Liu, X., J. Wei, et al. (2005). "Absence of heme oxygenase-1 exacerbates myocardial ischemia/reperfusion injury in diabetic mice." Diabetes **54**(3): 778-784.
- Lund, L. H., L. B. Edwards, et al. (2013). "The Registry of the International Society for Heart and Lung Transplantation: Thirtieth Official Adult Heart Transplant Report--2013; focus theme: age." J Heart Lung Transplant **32**(10): 951-964.

- Lutz, M. B., R. M. Suri, et al. (2000). "Immature dendritic cells generated with low doses of GM-CSF in the absence of IL-4 are maturation resistant and prolong allograft survival in vivo." Eur J Immunol **30**(7): 1813-1822.
- Luu, K., C. J. Greenhill, et al. (2014). "STAT1 plays a role in TLR signal transduction and inflammatory responses." Immunol Cell Biol.
- MacKenzie, K. F., M. J. Pattison, et al. (2014). "Transcriptional regulation of IL-10 and its cell-specific role in vivo." Crit Rev Immunol **34**(4): 315-345.
- Mahmud, S. A., L. S. Manlove, et al. (2013). "Interleukin-2 and STAT5 in regulatory T cell development and function." JAKSTAT **2**(1): e23154.
- Mao, M., X. Liu, et al. (2009). "A novel and knotless technique for heterotopic cardiac transplantation in mice." J Heart Lung Transplant **28**(10): 1102-1106.
- Matsuura, A., T. Abe, et al. (1991). "Simplified mouse cervical heart transplantation using a cuff technique." Transplantation **51**(4): 896-898.
- McLoughlin, R. M., B. J. Jenkins, et al. (2005). "IL-6 trans-signaling via STAT3 directs T cell infiltration in acute inflammation." Proc Natl Acad Sci U S A **102**(27): 9589-9594.
- Mihara, M., M. Hashizume, et al. (2012). "IL-6/IL-6 receptor system and its role in physiological and pathological conditions." Clin Sci (Lond) **122**(4): 143-159.
- Monteleone, G., M. Boirivant, et al. (2008). "TGF-beta1 and Smad7 in the regulation of IBD." Mucosal Immunol **1 Suppl 1**: S50-53.
- Moreau, A., E. Varey, et al. (2013). "Effector mechanisms of rejection." Cold Spring Harb Perspect Med **3**(11).
- Motomura, Y., H. Kitamura, et al. (2011). "The transcription factor E4BP4 regulates the production of IL-10 and IL-13 in CD4+ T cells." Nat Immunol **12**(5): 450-459.
- Munoz, C., J. Carlet, et al. (1991). "Dysregulation of in vitro cytokine production by monocytes during sepsis." J Clin Invest **88**(5): 1747-1754.
- Naik, S. H., Metcalf, D., et al. (2006). "Intrasplenic steady-state dendritic cell precursors that are distinct from monocytes." Nat Immunol **7**(6): 663-671.
- Ng, T. H., G. J. Britton, et al. (2013). "Regulation of adaptive immunity; the role of interleukin-10." Front Immunol **4**: 129.
- Niimi, M. (2001). "The technique for heterotopic cardiac transplantation in mice: experience of 3000 operations by one surgeon." J Heart Lung Transplant **20**(10): 1123-1128.
- Olivari, M. T., M. E. Jessen, et al. (1995). "Triple-drug immunosuppression with steroid discontinuation by six months after heart transplantation." J Heart Lung Transplant **14**(1 Pt 1): 127-135.
- Ono, K. and E. S. Lindsey (1969). "Improved technique of heart transplantation in rats." J Thorac Cardiovasc Surg **57**(2): 225-229.
- Paine, A., B. Eiz-Vesper, et al. (2010). "Signaling to heme oxygenase-1 and its anti-inflammatory therapeutic potential." Biochem Pharmacol **80**(12): 1895-1903.
- Parameswaran, N. and S. Patil (2010). "Tumor necrosis factor-alpha signaling in macrophages." Crit Rev Eukaryot Gene Expr **20**(2): 87-103.
- Parkin, J. and B. Cohen (2001). "An overview of the immune system." Lancet **357**(9270): 1777-1789.
- Pilat, N., U. Baranyi, et al. (2010). "Treg-therapy allows mixed chimerism and transplantation tolerance without cytoreductive conditioning." Am J Transplant **10**(4): 751-762.
- Pilat, N., A. M. Farkas, et al. (2013). "T-regulatory cell treatment prevents chronic rejection of heart allografts in a murine mixed chimerism model." J Heart Lung Transplant.
- Plenter, R. J., M. R. Zamora, et al. (2013). "Four decades of vascularized heterotopic cardiac transplantation in the mouse." J Invest Surg **26**(4): 223-228.
- Pot, C., H. Jin, et al. (2009). "Cutting edge: IL-27 induces the transcription factor c-Maf, cytokine IL-21, and the costimulatory receptor ICOS that coordinately act together to promote differentiation of IL-10-producing Tr1 cells." J Immunol **183**(2): 797-801.
- Povoleri, G. A., C. Scotta, et al. (2013). "Thymic versus induced regulatory T cells - who regulates the regulators?" Front Immunol **4**: 169.

- Qureshi, O. S., Y. Zheng, et al. (2011). "Trans-endocytosis of CD80 and CD86: a molecular basis for the cell-extrinsic function of CTLA-4." *Science* **332**(6029): 600-603.
- Ramsdell, F. and S. F. Ziegler (2014). "FOXP3 and scurfy: how it all began." *Nat Rev Immunol* **14**(5): 343-349.
- Roncarolo, M. G., S. Gregori, et al. (2006). "Interleukin-10-secreting type 1 regulatory T cells in rodents and humans." *Immunol Rev* **212**: 28-50.
- Rosenberg, P. B., A. E. Vriesendorp, et al. (2005). "Induction therapy with basiliximab allows delayed initiation of cyclosporine and preserves renal function after cardiac transplantation." *J Heart Lung Transplant* **24**(9): 1327-1331.
- Rosenblum, J. M., N. Shimoda, et al. (2010). "CXC chemokine ligand (CXCL) 9 and CXCL10 are antagonistic costimulation molecules during the priming of alloreactive T cell effectors." *J Immunol* **184**(7): 3450-3460.
- Rudensky, A. Y. (2011). "Regulatory T cells and Foxp3." *Immunol Rev* **241**(1): 260-268.
- Sachs, D. H. (2011). "Transplant tolerance: bench to bedside--26th annual Samuel Jason Mixer Lecture." *Arch Surg* **146**(5): 501-505.
- Sachs, D. H., T. Kawai, et al. (2014). "Induction of tolerance through mixed chimerism." *Cold Spring Harb Perspect Med* **4**(1): a015529.
- Safinia, N., J. Leech, et al. (2013). "Promoting transplantation tolerance; adoptive regulatory T cell therapy." *Clin Exp Immunol* **172**(2): 158-168.
- Saraiva, M., J. R. Christensen, et al. (2009). "Interleukin-10 production by Th1 cells requires interleukin-12-induced STAT4 transcription factor and ERK MAP kinase activation by high antigen dose." *Immunity* **31**(2): 209-219.
- Schmidt, R. (2007). "Cobalt protoporphyrin as a potential therapeutic agent?" *FASEB J* **21**(11): 2639; author reply 2640.
- Seroussi, E., D. Kedra, et al. (1999). "TOM1 genes map to human chromosome 22q13.1 and mouse chromosome 8C1 and encode proteins similar to the endosomal proteins HGS and STAM." *Genomics* **57**(3): 380-388.
- Shi, Y. and J. Massague (2003). "Mechanisms of TGF-beta signaling from cell membrane to the nucleus." *Cell* **113**(6): 685-700.
- Shoemaker, J., M. Saraiva, et al. (2006). "GATA-3 directly remodels the IL-10 locus independently of IL-4 in CD4+ T cells." *J Immunol* **176**(6): 3470-3479.
- Sikorski, K., S. Chmielewski, et al. (2011). "STAT1-mediated signal integration between IFN-gamma and LPS leads to increased EC and SMC activation and monocyte adhesion." *Am J Physiol Cell Physiol* **300**(6): C1337-1344.
- Sikorski, K., A. Czerwoniec, et al. (2011). "STAT1 as a novel therapeutic target in pro-atherogenic signal integration of IFN-gamma, TLR4 and IL-6 in vascular disease." *Cytokine Growth Factor Rev* **22**(4): 211-219.
- Son, Y., J. H. Lee, et al. (2013). "Therapeutic roles of heme oxygenase-1 in metabolic diseases: curcumin and resveratrol analogues as possible inducers of heme oxygenase-1." *Oxid Med Cell Longev* **2013**: 639541.
- Stehlik, J., L. B. Edwards, et al. (2010). "The Registry of the International Society for Heart and Lung Transplantation: twenty-seventh official adult heart transplant report--2010." *J Heart Lung Transplant* **29**(10): 1089-1103.
- Stewart, S., G. L. Winters, et al. (2005). "Revision of the 1990 working formulation for the standardization of nomenclature in the diagnosis of heart rejection." *J Heart Lung Transplant* **24**(11): 1710-1720.
- Sucher, R., K. Fischler, et al. (2012). "IDO and regulatory T cell support are critical for cytotoxic T lymphocyte-associated Ag-4 Ig-mediated long-term solid organ allograft survival." *J Immunol* **188**(1): 37-46.
- Tang, Q. and J. A. Bluestone (2013). "Regulatory T-cell therapy in transplantation: moving to the clinic." *Cold Spring Harb Perspect Med* **3**(11).

- Teuteberg, J. J., M. Shullo, et al. (2008). "Aggressive steroid weaning after cardiac transplantation is possible without the additional risk of significant rejection." *Clin Transplant* **22**(6): 730-737.
- Tomita, Y., Q. W. Zhang, et al. (1997). "Improved technique of heterotopic cervical heart transplantation in mice." *Transplantation* **64**(11): 1598-1601.
- Travis, M. A. and D. Sheppard (2014). "TGF-beta activation and function in immunity." *Annu Rev Immunol* **32**: 51-82.
- Vassalli, G. (2013). "Dendritic cell-based approaches for therapeutic immune regulation in solid-organ transplantation." *J Transplant* **2013**: 761429.
- Wang, Q., Y. Liu, et al. (2005). "Simplified technique for heterotopic vascularized cervical heart transplantation in mice." *Microsurgery* **25**(1): 76-79.
- Worthington, J. J., T. M. Fenton, et al. (2012). "Regulation of TGFbeta in the immune system: an emerging role for integrins and dendritic cells." *Immunobiology* **217**(12): 1259-1265.
- Wu, M. L., Y. C. Ho, et al. (2011). "Heme oxygenase-1 in inflammation and cardiovascular disease." *Am J Cardiovasc Dis* **1**(2): 150-158.
- Xiao, L., Z. R. Fu, et al. (2011). "Suppression of allograft rejection by Tim-1-Fc through cross-linking with a novel Tim-1 binding partner on T cells." *PLoS One* **6**(7): e21697.
- Yamani, M. H., D. O. Taylor, et al. (2008). "Thymoglobulin induction and steroid avoidance in cardiac transplantation: results of a prospective, randomized, controlled study." *Clin Transplant* **22**(1): 76-81.
- Yamano, T., S. Watanabe, et al. (2011). "Ex vivo-expanded DCs induce donor-specific central and peripheral tolerance and prolong the acceptance of donor skin grafts." *Blood* **117**(9): 2640-2648.
- Yamazaki, S., A. Kanamoto, et al. (2013). "Donor-specific tolerance induction in organ transplantation via mixed splenocytes chimerism." *Clin Exp Immunol* **173**(2): 173-178.
- Yang, L., B. Du Temple, et al. (1998). "Mechanisms of long-term donor-specific allograft survival induced by pretransplant infusion of lymphocytes." *Blood* **91**(1): 324-330.
- Yang, Y., H. L. Song, et al. (2014). "Reduction of Acute Rejection by Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells during Rat Small Bowel Transplantation." *PLoS One* **9**(12): e114528.
- Yet, S. F., R. Tian, et al. (2001). "Cardiac-specific expression of heme oxygenase-1 protects against ischemia and reperfusion injury in transgenic mice." *Circ Res* **89**(2): 168-173.
- Youssef, A. R., C. Otley, et al. (2004). "Role of CD4+ and CD8+ T cells in murine skin and heart allograft rejection across different antigenic disparities." *Transpl Immunol* **13**(4): 297-304.
- Zhang, N., B. Schroppel, et al. (2009). "Regulatory T cells sequentially migrate from inflamed tissues to draining lymph nodes to suppress the alloimmune response." *Immunity* **30**(3): 458-469.
- Zhuang, J., Z. Shan, et al. (2014). "CXCL9 and CXCL10 accelerate acute transplant rejection mediated by alloreactive memory T cells in a mouse retransplantation model." *Exp Ther Med* **8**(1): 237-242.

www.corbisimages.com	Heart transplantation	abgerufen	am	31.03.2014
www.dso.de	DSO Jahresbericht 2012	abgerufen	am	23.03.2014
www.imgkid.com	Abstoßungsreaktionen	abgerufen	am	19.04.2014
www.isHLT.org/registries/slides	Immunsuppressiva Herz	abgerufen	am	09.05.2014

Danksagung

Mein aufrichtiger Dank gilt Herrn Professor Öllinger für die Aufgabenstellung und die Anleitung in eine hoch komplexe, klinisch relevante und operativ herausfordernde Thematik.

Frau Professor Kotsch danke ich für die konstante, konstruktive und stets zugewandte Unterstützung und Förderung im transplantationsimmunologischen Forschungslabor der Universitätsklinik Innsbruck.

Herrn Professor Hagl möchte ich für die exzellente Beratung und Betreuung meiner externen Promotion danken.

Dank gebührt zudem Herrn Doktor Ritschl für die Betreuung in operativen Fragen, Herrn Nguyen für die Einarbeitung in benötigte Auswertungsverfahren, Herrn Doktor Resch, sowie Frau Doktor Brunner für die histologische Auswertung.

Herzlich bedanken möchte ich mich auch bei allen nicht namentlich erwähnten Wegbegleitern, meiner Familie und meinen Freunden für die konstante Unterstützung und das Mittragen aller entstandenen Entbehrungen.

Eidesstattliche Versicherung

Ich – Dr. med. univ. Moritz von Scheidt genannt Weschpfennig – erkläre hiermit an Eides statt, dass ich die vorliegende Dissertation mit dem Thema

„Einfluss und potentielle Wirkmechanismen einer Spendersplenozyten-Gabe auf die akute Abstoßung im heterotopen, cervikalen Herztransplantationsmodell der Maus“

selbstständig verfasst, mich außer der angegebenen keiner weiteren Hilfsmittel bedient und alle Erkenntnisse, die aus dem Schrifttum ganz oder annähernd übernommen sind, als solche kenntlich gemacht und nach ihrer Herkunft unter Bezeichnung der Fundstelle einzeln nachgewiesen habe.

Ich erkläre des Weiteren, dass die hier vorgelegte Dissertation nicht in gleicher oder in ähnlicher Form bei einer anderen Stelle zur Erlangung eines akademischen Grades eingereicht wurde.

Ort, Datum

Unterschrift Doktorandin/Doktorand