

Aus der Klinik für Anaesthesiologie
Klinik der Ludwig-Maximilians-Universität München
Vorstand: Prof. Dr. Bernhard Zwißler

Charakterisierung der T-Zell-Antwort im kardialen Xenotransplantationsmodell

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

Vorgelegt von
Maliha Tariq
aus
Bradford

2021

**Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität München**

Berichterstatter: Prof. Dr. Dr. Simone Kreth

Mitberichterstatter: Prof. Dr. Paolo Brenner
Prof. Dr. Michael Weis

Mitbetreuung: PD Dr. Jan-Michael Abicht

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

Tag der mündlichen Prüfung: 29.04.2021

Inhaltsverzeichnis

1	EINLEITUNG	1
1.1.	Mangel an Spenderherzen in der Transplantationsmedizin.....	1
1.2.	Definition und Geschichte der Xenotransplantation	2
1.3	Das Schwein als Organspender für die kardiale Xenotransplantation	4
1.4	Abstoßungsreaktionen bei Xenotransplantation und mögliche Therapieansätze	6
1.4.1	Hyperakute Abstoßungsreaktion.....	6
1.4.2	Akute humorale xenogene Abstoßung	7
1.4.3	Akut zelluläre Abstoßung.....	7
1.4.4	Chronische Abstoßung.....	8
1.5	microRNAs	9
1.5.1.	Entstehung und Wirkung von microRNAs	10
1.5.2	microRNAs im Rahmen der (Xeno-)transplantation	11
2	FRAGESTELLUNG	14
3	VERSUCHSTIERE UND MATERIAL.....	15
3.1	Versuchstiere	15
3.2	Probenmaterial	15
3.3	Materialien.....	15
3.3.1	Reagenzien.....	15
3.3.2	Assays und Kits.....	17
3.3.3	Medien und Puffer.....	18
3.3.4	Primersequenzen.....	18
3.3.5	Antikörper für durchflusszytometrische Untersuchungen.....	19
3.3.6	Geräte und Verbrauchsmaterialien für die zell- und molekularbiologischen Methoden	20
3.3.7	Geräte und Verbrauchsmaterialien für das ex-vivo Perfusionssystem	20
3.3.8	Medikamente und Lösungen für den ex-vivo Perfusionsversuch	21

3.3.9	Software.....	21
4	METHODEN.....	22
4.1	Ex-vivo Perfusionsmodell.....	22
4.1.1	Anästhesie	23
4.1.2	Herzexplantation	23
4.1.3	Präparation des Herzens.....	24
4.1.4	Aufbau des Perfusionssystems	24
4.1.5	Vorbereitung des Perfusionssystems	24
4.1.6	Reperfusion im Langendorff-Modus.....	25
4.1.7	Perfusion im Working-Heart-Modus	26
4.1.8	Regulation des biventrikulären Working-Heart-Modells	27
4.1.9	Kontrollen	28
4.1.10	Messzeitpunkte im Versuchsverlauf.....	29
4.2	Zellbiologische Methoden	29
4.2.1	Isolation mononukleärer Zellen aus humanem Vollblut	29
4.2.2	Bestimmung der Zellzahl und der Zellviabilität	29
4.2.3	Magnetische Pan-T-Zell-Separation.....	30
4.3	Molekularbiologische Methoden.....	31
4.3.1	RNA-Extraktion	31
4.3.2	RNA-Amplifikation	32
4.3.3	cDNA-Synthese	34
4.4	Real-time quantitative PCR (RT-qPCR).....	35
4.4.1	Quantifizierung der mRNA-Expression	35
4.4.2	Quantifizierung der microRNA-Expression.....	37
4.5	Durchflusszytometrie.....	38
4.6	Statistische Auswertung	41

5	ERGEBNISSE	42
5.1	Expressionsmuster verschiedener Oberflächenantigene auf primären humanen T-Zellen im kardialen Xenotransplantationsmodell	42
5.2	mRNA-Expression in primären humanen T-Zellen im kardialen Xenotransplantationsmodell	46
5.2.1	mRNA-Expression costimulatorischer und coinhibitorischer Zielgene in primären humanen T-Zellen	47
5.2.2	mRNA-Expression in Th1-Zellen.....	49
5.2.3	mRNA-Expression in Th2-Zellen und des Chemokins IL-8	51
5.2.4	mRNA-Expression in regulatorischen T-zellen (T _{regs})	52
5.2.5	mRNA-Expression in zytotoxischen T-Zellen	53
5.3	microRNA-Expression in primären humanen T-Zellen im kardialen Xenotransplantationsmodell	55
6	DISKUSSION	58
7	ZUSAMMENFASSUNG.....	71
8	SUMMARY	73
9	LITERATURVERZEICHNIS	75
10	DANKSAGUNG	81
11	ANHANG	82
11.1	Abbildungsverzeichnis	82
11.2	Tabellenverzeichnis.....	82
11.3	Abkürzungsverzeichnis	83

1 EINLEITUNG

1.1. Mangel an Spenderherzen in der Transplantationsmedizin

Die chronische Herzinsuffizienz stellt weltweit eine der häufigsten chronischen Erkrankungen dar. In Deutschland leiden 1,6 Millionen Menschen an einer Herzinsuffizienz, das heißt etwa 2 % der Gesamtbevölkerung [1]. Es gibt neben dem Einsatz von ACE-Hemmern, β -Blockern, Aldosteron-Antagonisten Fortschritte in der Therapie der fortgeschrittenen Herzinsuffizienz, beispielsweise durch kardiale Resynchronisationstherapie mittels biventrikulärer Schrittmachersysteme [2]. Die terminale Herzinsuffizienz bleibt jedoch mit einer 5-Jahres-Letalität von bis zu 50 % eine schwerwiegende chronische Erkrankung, deren einzige kurative Therapiealternative eine Herztransplantation darstellt [3]. Die 5-Jahres-Überlebensrate beträgt derzeit etwa 70 % und das mittlere Überleben nach Herztransplantation liegt aktuell bei mehr als 11 Jahren [4].

Im Jahr 1967 wurde die erste erfolgreiche Herztransplantation am Groote Schuur Hospital in Kapstadt durchgeführt und stellte damit einen großen Durchbruch in der Geschichte der Transplantationsmedizin dar [5]. Während zunächst die Überlebensrate der Patienten sehr gering war, änderte sich dies in den 1980er Jahren mit dem Einsatz des Immunsuppressivums Cyclosporin A bei Herztransplantation. Das Überleben nach erfolgter Herztransplantation verlängerte sich signifikant, so dass sich die Herztransplantation als Standardverfahren bei terminaler Herzinsuffizienz etablierte [6, 7].

Jedoch herrscht ein weltweiter Mangel an Spenderorganen vor, insbesondere in Deutschland. Im Jahr 2017 standen 1141 Patienten auf der Eurotransplant Warteliste für eine Herztransplantation, jedoch wurden nur 548 Herztransplantationen durchgeführt [8]. Die durch den extremen Organspendermangel entstehende verlängerte Wartezeit der Patienten für eine Herztransplantation erhöht die Mortalität auf der Warteliste [9]. Es wird versucht dem Mangel an Spenderorganen durch verschiedene Ansätze entgegen zu wirken. Zum einen wird durch Aufklärungsarbeit und Gesetze versucht die Anzahl an potentiellen Organspendern zu erhöhen. So trat am 01. November 2012 mit dem Gesetz zur Neuregelung der Organspende die Entscheidungslösung in Kraft, die regelt, dass jeder Bürger mit Vollendung des 16. Lebensjahres von seiner Krankenkasse kontaktiert, zum Thema Organspende informiert und dazu aufgefordert wird, sich zu seiner

Organspendebereitschaft zu äußern. Es besteht jedoch keine Pflicht sich zu entscheiden. [10] Trotz dieses Versuchs, die deutsche Bevölkerung zur Organspende aufzurufen, ist allein die Erhöhung der Spenderbereitschaft nicht ausreichend, um den Mangel an Spenderherzen zu beheben. Dies zeigt die weiterhin vorherrschende Diskrepanz zwischen Patienten auf der Warteliste für eine Herztransplantation und den verfügbaren Spenderherzen und tatsächlich durchgeführten Operationen [11].

Der Einsatz von uni- und biventrikulären mechanischen Herzunterstützungssystemen kann die Zeit bis zu einer Transplantation überbrücken, wird aber zunehmend als dauerhafte Therapie angewendet. Trotz großer Fortschritte dieser Technik erreichen diese Systeme noch nicht das Niveau einer Herztransplantation. Linksventrikuläre Unterstützungssysteme besitzen eine 6-Monats-Überlebensrate etwa 90 % und eine 18-Monats-Überlebensrate von 79 %. Das Überleben von Patienten, die auf biventrikuläre Unterstützungssysteme zur Überbrückung der Wartezeit angewiesen sind, beträgt jedoch lediglich unter 50 %. Der größte Nachteil sind jedoch die hohe Rate schwerwiegender Komplikationen, wie Infektionen und Schlaganfälle [12]. Es muss also weiterhin nach alternativen Möglichkeiten zur Überbrückung der Wartezeit geforscht werden. Eine mögliche Alternative könnten dabei Xenotransplantationen darstellen. Hierdurch könnte ein nahezu uneingeschränktes Organangebot mit besser kontrollierbarer Organgröße, Organqualität und planbarem Transplantationszeitpunkt erreicht werden.

1.2. Definition und Geschichte der Xenotransplantation

Der Begriff Xenotransplantation leitet sich aus dem griechischen Wort *Xénos* (Fremder) und dem lateinischen Verb *transplantare* (umsetzen, verpflanzen) ab und bezeichnet eine Transplantation zwischen zwei Individuen verschiedener Spezies, zum Beispiel die Übertragung eines Organs von einem Tier auf einen Menschen. Bei einer Allotransplantation hingegen handelt es sich um eine Transplantation zwischen zwei genetisch nicht-identischen Individuen derselben Spezies, d.h. zum Beispiel von einem Menschen auf einen anderen Menschen.

Betrachtet man die Xenotransplantation, so kann die konkordante von der diskordanten Xenotransplantation unterscheiden. Als konkordante Xenotransplantation wird dabei eine Transplantation zwischen nahe verwandten Individuen bezeichnet (Primat-Mensch; Maus-Ratte). Hierbei kommt es zu einer Abstoßung ähnlicher Intensität und Geschwindigkeit wie bei der Allotransplantation. Bei der diskordanten

Xenotransplantation hingegen kommt es zu einer hyperakuten Abstoßungsreaktion durch präformierte Antikörper, die der Abstoßung von Organen bei ABO-Inkompatibilität gleicht. Diese Art der Abstoßung findet man zum Beispiel bei Transplantation von Organen zwischen Individuen weiter entfernter Spezies (z.B. Schwein-Mensch) [13, 14].

Bereits im Jahr 1964, drei Jahre vor der ersten Allotransplantation, führte James Hardy in Mississippi, USA die erste Xenotransplantation bei einem sich im kardiogenen Schock befindenden 68-jährigen Patienten durch. Dabei transplantierte er ihm ein Schimpansenherz, das allerdings zu klein war um den Körper ausreichend mit Blut zu versorgen, so dass der Patient bereits nach 90 Minuten verstarb [15]. In den darauffolgenden Jahren gab es bis zum Jahre 1996 immer wieder Versuche der kardialen Xenotransplantation am Menschen, die jedoch weiterhin keine langfristigen Erfolge zeigten (Tabelle 1). So gab es im Jahre 1968 Versuche dem Menschen ein Schweineherz (Ross) oder das Herz eines Schafes (Cooley) zu transplantieren, doch wurden diese Herzen jeweils hyperakut abgestoßen [16, 17]. Die bisher wahrscheinlich bekannteste kardiale Xenotransplantation am Menschen wurde 1984 von Leonard Bailey in Kalifornien, USA durchgeführt. Er transplantierte einem 12 Monate alten Kind mit hypoplastischem Linksherzsyndrom ein ABO-inkompatibles Pavianherz. Obwohl das Herz eine für das Baby passende Größe hatte und eine Immunsuppression mit Cyclosporin erfolgte, wurde das Herz abgestoßen und das Baby verstarb bereits 20 Tage nach der Transplantation. In der anschließend durchgeführten Histologie des Herzens waren Anzeichen einer humoralen Abstoßung erkennbar, die wahrscheinlich auf eine ABO-Inkompatibilität zurückzuführen waren [18].

Schlussendlich erfolgte im Jahr 1996 der letzte Versuch einer kardialen Xenotransplantation durch Baruah in Indien. Er transplantierte einem 32-jährigen Mann mit Ventrikelseptumdefekt ein Schweineherz, jedoch verstarb dieser am siebten postoperativen Tag im septischen Schock. Baruah musste nach Versterben des Patienten sein Handeln verantworten und wurde wegen Missachtung des *Human Organ Transplantation Act* von 1994 verhaftet [16].

Aufgrund der schlechten Ergebnisse der klinischen Xenotransplantation, nahm man Abstand von klinischen Versuchen und untersucht heute die Abstoßungsreaktionen in tierexperimentellen Versuchen. Um aber wirklich das Langzeitüberleben eines xenogenen Transplantates in einem Menschen unter realen Bedingungen beurteilen zu können, muss die Abstoßungsreaktion in einem nicht-menschlichen Primaten und zuletzt

in klinischen Studien untersucht werden. Die Bedingungen für den erneuten Start einer solchen klinischen Studie legte die *International Society of Heart and Lung Transplantation* im Jahr 2000 fest. Demnach müssen in einer konsekutiven Versuchsreihe mit nicht-menschlichen Primaten bei orthotoper Xenotransplantation mindestens 60 % der Tiere (mindestens 10 Tiere) mindestens 90 Tage überleben. Nur wenn unter anderen diese Bedingung erfüllt wurde, kann eine klinische Studie durchgeführt werden [19].

Tabelle 1: Versuche der kardialen Xenotransplantation am Menschen

<i>Jahr</i>	<i>Arzt/Autor</i>	<i>Spenderspezies</i>	<i>Transplantatüberleben</i>
1964	Hardy	Schimpanse	90 Minuten
1968	Ross	Schwein	4 Minuten
1968	Cooley	Schaf	10 Minuten
1969	Marion	Schimpanse	Einige Minuten
1977	Barnard	Pavian	5 h
1977	Barnard	Schimpanse	4 Tage
1984	Bailey	Pavian	20 Tage
1992	Religa	Schwein	23 h
1996	Baruah	Schwein	7 Tage

1.3 Das Schwein als Organspender für die kardiale Xenotransplantation

Betrachtet man nun die kardiale Xenotransplantation als potentielle Überbrückungsstrategie für Patienten auf der Warteliste, so stellt sich die Frage welches Tier sich am besten als Spender eignen würde. Aufgrund der nahen Verwandtschaft zum Menschen und in Anbetracht der Histokompatibilität würden sich nicht-menschliche Primaten gut als Organspender für eine konkordante Xenotransplantation eignen. Die Abstoßungsreaktion wäre, ähnlich wie bei der Allotransplantation, geringer ausgeprägt und dadurch besser kontrollierbar als bei einer diskordanten Transplantation. Dennoch gibt es viele Gründe, die gegen eine Organspende von nicht-menschlichen Primaten sprechen. Zum einen gibt es gerade aufgrund der nahen Verwandtschaft viele ethische Bedenken bezüglich einer solchen Organspende [20-22]. Viele Affen stehen zudem unter Artenschutz. Des Weiteren beschränken die lange Tragezeit, die geringe Zahl an Nachkommen und das langsame Wachstum von Primaten die Verfügbarkeit von Spenderorganen [19, 23]. Auch in Hinblick auf die Übertragung von

Infektionskrankheiten besteht bei einer Transplantation von Organen nicht-menschlicher Primaten auf den Menschen ein hohes Risiko [24, 25].

Bei weniger nah verwandten Spezies, wie dem Schwein, ist hingegen die Gefahr der Übertragung von Infektionskrankheiten wesentlich geringer [19, 26]. Darüber hinaus können Schweine unter pathogenfreien Bedingungen gehalten und angezüchtet werden [27, 28]. Eine Sonderstellung nehmen im Erbgut verankerte endogene Retroviren ein und stellen eine potentielle Gefahr dar. Klinisch gab es jedoch bisher keinen Fall einer Übertragung der porcinen endogenen Retroviren (PERV) auf den Menschen und auch in experimentellen Studien konnte die Gefahr einer Übertragung nicht bestätigt werden [19, 29, 30]. Zudem war es in tierexperimentellen Studien möglich, durch gezielte genetische Modifikation, Schweine anzuzüchten, in denen die PERV inaktiviert wurden [31].

Im Gegensatz zu Primaten haben Schweine zudem eine frühere Geschlechtsreife, kürzere Tragezeit, mehr Nachkommen und ein schnelleres Wachstum, was die Verfügbarkeit einer hohen Anzahl von Schweineherzen als Spenderorgane für eine Xenotransplantation erheblich vereinfachen würde [19, 21, 23]. Da das Schwein für den Menschen bereits als Nutztier und zum Gewinn von Nahrung dient und bereits porcine Herzklappen und Schweineinsulin in der Medizin verwendet werden, ist bei der Verwendung von Schweineherzen für eine Xenotransplantation kaum mit ethischen Bedenken zu rechnen [19, 32].

Das Schwein stellt aufgrund eines anatomisch und physiologisch dem Menschen ähnelnden Herzens einen guten Organspender für eine Xenotransplantation dar [24]. Auch ist eine ausreichende Funktion des Herzens in einem aufrecht gehenden Empfänger erwiesen [33]. Dennoch gibt es einige physiologische Unterschiede zwischen Schwein und Mensch, die vor allem die Körpertemperatur, die Proteinsynthese, das Gerinnungssystem und den Hormonhaushalt betreffen. Allen voran ist zu berücksichtigen, dass es sich bei einer kardialen Xenotransplantation von Schwein zu Mensch um eine diskordante Transplantation handelt, die starke Reaktionen im menschlichen Immunsystem auslöst [13, 14, 24].

1.4 Abstoßungsreaktionen bei Xenotransplantation und mögliche Therapieansätze

1.4.1 Hyperakute Abstoßungsreaktion

Kennzeichnend für die diskordante kardiale Xenotransplantation von Schwein zu Primat (nicht-humaner Primat, Mensch) ist die hyperakute Abstoßungsreaktion, eine sehr starke und schnelle Form der Abstoßung, die innerhalb weniger Minuten bis Stunden nach Transplantation im Empfänger stattfindet [14]. Ausgelöst wird die Reaktion durch präformierte Antikörper im Blut des Primaten, die gegen das auf den Endothelzellen des Schweins befindliche Galactose- $\alpha(1,3)$ -Galactose-Epitop (Gal) gerichtet sind. Bei Perfusion eines Schweineherzens mit Blut eines Primaten binden diese anti-Gal- $\alpha(1,3)$ -Gal-Antikörper an die auf den Endothelzellen exprimierten Gal-Epitope und aktivieren somit das Komplementsystem [34-36]. Dies führt in Folge zu einem sofortigen Gewebeschaden und zur Einschränkung der Organfunktion. Histopathologisch zeigt sich dieser Schaden in Form von Ödemen, Thrombosen und interstitiellen Hämorrhagien [37, 38]. Diese schnelle und starke Abstoßungsreaktion, ausgelöst durch präformierte Antikörper, gleicht dabei der Reaktion bei einer Allotransplantation mit ABO-Inkompatibilität [39].

Die anti-Gal-Antikörper gehören hauptsächlich zur Immunglobulinklasse M (IgM) und finden sich bei allen Menschen und Altweltaffen (z.B. Paviane), da es bei diesen Spezies im Zuge der Evolution zu einem Verlust der 1,3-Galaktosyltransferase kam, die eine spezifische Bindung innerhalb der Kohlenhydratketten bildet [14, 40]. Bereits in den ersten Lebensmonaten entstehen die anti-Gal-Antikörper in Primaten als Reaktion auf die Besiedlung des Gastrointestinaltrakts mit Mikroorganismen, die das Gal-Epitop exprimieren [41].

Durch die Reaktion der anti-Gal-Antikörper mit den Gal-Epitopen kommt es zu einer Abspaltung wichtiger Oberflächenstrukturen und einer Aktivierung des klassischen Weges des Komplementsystems. Am Ende der Komplementkaskade steht die Spaltung der C3-Konvertase (C4b2b) wodurch ein C5b-9 Komplex, der membrane attack complex (MAC) entsteht und zur Osmolyse der Endothelzellen und in Folge zu einer Thrombozytenaggregation führt [37].

1.4.2 Akute humorale xenogene Abstoßung

Es können Verfahren, wie zum Beispiel Plasmapherese und Immunadsorption, eingesetzt werden, um eine hyperakute xenogene Abstoßungsreaktion durch Elimination der präformierten anti-Gal-Antikörper abzuwenden [42, 43]. Ist diese hyperakute Abstoßungsreaktion überwunden, so kommt es jedoch innerhalb von Tagen und Wochen nach Transplantation zu einer Abstoßung durch die akute humorale xenogene Abstoßungsreaktion (AHXR) [44, 45], welche auch als verzögerte xenogene Transplantatabstoßung (DXR) bezeichnet wird [46, 47]. Das histopathologische Bild gleicht dabei der hyperakuten Abstoßung. Es kommt zu interstitiellen Ödemen, myokardialen Hämorrhagien und einem Anschwellen und einer Ruptur der Endothelzellen. Zudem entstehen im Rahmen der AHXR, vor allem in den mittelgroßen Arterien, Thrombosen [47]. Auch zeigen sich in der Histologie Antikörper- und Komplementablagerungen und eine Gewebsinfiltration mit mononukleären Zellen. [48-50]

Ursächlich für die AHXR sind zum einen präformierte und induzierte anti-Gal- $\alpha(1,3)$ -Gal-Antikörper und zum anderen insbesondere induzierte anti-Schwein-Antikörper, welche gegen non-Gal- $\alpha(1,3)$ -Gal-Antigene auf der Endothelzelloberfläche des Schweins gerichtet sind [51]. Durch die Bindung dieser sogenannten „non-Gal“ Antikörper kommt es zu einer komplementunabhängigen Endothelzellaktivierung Typ II, die zu einer Synthese von Adhäsionsmolekülen (E-Selectin, P-Selectin, u.a.), proinflammatorischen Zytokinen (TNF- α , INF- γ) und Chemokinen (IL-6, IL-8) und prokoagulatorischen Molekülen (TF, PAI-1) führt [48, 52, 53]. In der subendothelialen Matrix enthaltene Proteine wie Kollagen und der von-Willebrand-Faktor können durch Retraktion der Endothelzellen freigegeben werden und durch Bindung an Integrine und den humanen GPIIb-Rezeptor zur Thrombozytenaggregation führen [48]. Natürliche Killerzellen, die mit ihrem Fc-Rezeptor an Immunglobuline binden führen über die antikörperabhängige Zytotoxizität (ADCC) zur Lyse der porcinen Endothelzellen [54-56].

1.4.3 Akut zelluläre Abstoßung

Neben der hyperakuten Abstoßungsreaktion und der AHXR, ist nach Xenotransplantation auch die akut zelluläre Abstoßungsreaktion (ACXR) beschrieben. Diese wird klinisch innerhalb von Tagen und Wochen manifest und gleicht histopathologisch dem Bild einer Abstoßungsreaktion nach Allotransplantation.

Die ACXR wird charakterisiert durch eine T-Zellantwort auf die Oberflächenantigene des Transplantats. Dabei unterscheidet man zwei Wege der Aktivierung der T-Lymphozyten: Die CD8⁺-T-Zellen können direkt durch MHC-I-Moleküle (Major Histocompatibility Complex der Klasse I) aktiviert werden, die sich auf der Oberfläche von aus dem Transplantat in den Empfänger immigrierten antigenpräsentierenden Zellen befinden. Eine indirekte Aktivierung erfolgt hingegen durch antigenpräsentierende Zellen des Empfängers, die in das Transplantat wandern, Antigene aufnehmen, prozessieren und anschließend mithilfe der auf ihrer Oberfläche befindlichen MHC-II-Moleküle (Major Histocompatibility Complex der Klasse II) den CD4⁺-T-Zellen präsentieren. Bei Xenotransplantationen ist aufgrund der hohen Anzahl nicht kompatibler Antigene mit einer stärkeren T-Zellaktivierung zu rechnen als bei Allotransplantation [57].

Eine akut zelluläre Abstoßungsreaktion bei Allotransplantation kann durch die Gabe von Immunsuppressiva gut kontrolliert und unterdrückt werden [58, 59]. Bei Xenotransplantationen tritt diese Form der Abstoßungsreaktion aufgrund der vorhergehenden akut humoralen Abstoßung jedoch nur selten auf und kann ebenfalls durch Immunsuppressiva supprimiert werden, so dass die ACXR nur wenig beobachtet und erforscht ist. Histologisch kennzeichnet sich diese Art der Abstoßung durch eine Infiltration des Gewebes durch T- und B-Lymphozyten, Natürliche Killerzellen und Makrophagen. Hämorrhagien und Thrombosen fehlen bei der ACXR typischerweise. Komplement- und Immunglobulinablagerungen, wie sie bei der AHXR zu finden sind, können vorkommen und das Gewebe schädigen [47, 50].

1.4.4 Chronische Abstoßung

Nach erfolgreicher Überwindung der akuten Abstoßungsreaktionen, könnte die chronische Abstoßungsreaktion bestimmend für das Langzeitüberleben des Spenderherzens sein. Im xenogenen Transplantationsmodell ist diese Art der Abstoßung noch nicht ausreichend beobachtet und untersucht worden, jedoch scheint sie ähnlich wie bei allogener Transplantation zu verlaufen [60]. Dabei kommt es nach einem Transplantatüberleben von mehreren Wochen und Monaten zu einer Vaskulopathie. Es erfolgt eine Aktivierung von Makrophagen und T-Lymphozyten und kommt zu einem plötzlichen, unkontrollierten Wachstum der glatten Gefäßmuskelzellen und einer Proliferation der Intima. Dies führt letztendlich zur Schädigung und Stenose der Koronararterien und damit letztendlich durch die chronische Entzündung und Unterversorgung zum Transplantatversagen [61].

1.5 microRNAs

MicroRNAs (miRNAs) sind eine Gruppe von kurzen, aus rund 22 nichtkodierenden Nukleotiden bestehenden, hoch konservierten einzelsträngigen RNA-Molekülen. Sie regulieren durch sequenzspezifische, komplementäre Basenpaarbindung an die 3'-untranslatierte Region (3'UTR) einer mRNA die Expression von Zielgenen auf posttranskriptionaler Ebene. Durch die komplementäre Bindung kommt es schließlich zu einer Degradation der mRNA oder einer Translationshemmung. Es wird angenommen, dass microRNAs in Säugetieren bis zu 50 % der Aktivität proteincodierender Gene und einen Großteil der grundlegenden zellulären Prozesse regulieren und somit eine Änderung der microRNA-Expression mit vielen humanen Pathologien assoziiert ist. [62, 63]

Erstmals wurden microRNAs im Jahr 1993 beschrieben. Lee, Feinbaum und Ambros zeigten in Ihrer Arbeit, dass im Fadenwurm *C. elegans* das Gen *lin-4* zu finden war, das nicht wie üblich für ein Protein, sondern zwei RNA-Moleküle, von einer Länge von 22 und 61 Nukleotiden, kodierte. Bei der 22 Nukleotid langen RNA handelte es sich um reife microRNA, die sequenzspezifisch über komplementäre Basenpaarung an die 3'-untranslatierte Region (3'UTR) der *lin-14* mRNA band, zu ihrer Degradation und somit schließlich auch zu einer Reduktion des *lin-14* Proteins führte. [64] Im Jahr 2000 fand man mit der Entdeckung einer weiteren microRNA (*let-7*) schließlich heraus, dass es sich bei der Regulation der Genexpression durch microRNAs um ein universelles Phänomen handelt, das auch in multizellulären Organismen zu finden ist [63, 65].

Inzwischen sind 48 860 reife microRNAs in 271 verschiedenen Spezies in der microRNA Datenbank mirBase registriert. Im Menschen wurden bisher 1917 microRNA-Sequenzen identifiziert, und es wird angenommen, dass ca. 30 % der Proteincodierenden Gene eines Menschen durch microRNAs reguliert werden können [66, 67].

Im Rahmen vieler physiologischer und pathologischer Prozesse spielen microRNAs eine wichtige regulatorische Rolle. Bereits geringe Veränderungen in der microRNA-Expression können somit Einfluss auf die Embryonalentwicklung, Differenzierung, Proliferation und Apoptose von Zellen nehmen und Entzündungsprozesse und die Tumorgenese regulieren. Eine einzelne microRNA kann dabei an verschiedene Zielsequenzen binden und somit die Expression vieler verschiedener mRNAs, und damit Zielgene, regulieren [63, 67, 68].

1.5.1. Entstehung und Wirkung von microRNAs

Die Biogenese von reifen microRNAs ist bereits gründlich erforscht worden und besteht im Wesentlichen aus zwei Prozessierungsschritten. Zunächst erfolgt die Transkription der miRNA-Gene durch die RNA-Polymerase II im Nukleus der Zelle. Die dabei entstehenden doppelsträngigen Primär-microRNA-Transkripte (pri-miRNAs) sind an ihrem 3'-Ende polyadenyliert, besitzen ein 7-Methylguanosin-Cap an ihrem 5'-Ende und eine charakteristische Haarnadelstruktur. In dieser Struktur dienen sie als Substrate für zwei Unterarten der RNA-Polymerase III, Drosha und Dicer. Zunächst schneidet Drosha die pri-miRNA-Moleküle, im Nukleus der Zelle, in 70-80 Nukleotid lange Vorläufer-microRNAs (pre-miRNAs), die sich durch einen zwei Nukleotid langen Überhang an ihrem 3'-Ende kennzeichnen. Dieser Überhang dient schließlich als Bindungsstelle für den Transport ins Zytoplasma. Die pre-miRNA wird von Exportin-5 gemeinsam mit seinem Co-Faktor Ran-GTP gebunden und vom Nukleus ins Zytoplasma transportiert, wo sie schließlich GTP-Hydrolyse vermittelt freigesetzt wird und der zweite Prozessierungsschritt beginnt. [69]

Im Zytoplasma schneidet Dicer, eine weitere RNA-Polymerase III Unterart, die pre-miRNA in einzelsträngige, 20 Nukleotid lange, reife microRNA, die schließlich in Form eines Sense:Anti-Sense-microRNA:miRNA* Duplex vorliegt [70]. Der miRNA Strang unterscheidet sich unter anderem in der thermodynamischen Stabilität vom entgegengesetzten miRNA*-Strang und wird schließlich mit seinem instabileren 5'-Ende bevorzugt in den RISC-Komplex (RNA-induced silencing complex) inkorporiert. Der miRNA*-Strang hingegen, der über ein stabileres 5'-Ende verfügt, wird in der Regel degradiert.[62] So ist es microRNAs möglich Zielgene posttranskriptionell zu regulieren, indem der miRNA-RISC-Komplex an eine komplementäre Ziel-mRNA bindet. Dies erfolgt durch partiell komplementäre Basenpaarung, durch Bindung eines 2-8 Nukleotid langen Abschnitts am 5'-Ende der reifen microRNA an die entsprechende Zielsequenz in der 3'UTR-Region der Ziel-mRNA. Liegt eine (fast) vollständige Basenpaarkomplementarität zwischen microRNA und mRNA vor so wird die Ziel-mRNA degradiert. Bei nur partieller Basenpaarkomplementarität kommt es hingegen nicht zur Degradierung der mRNA, jedoch zur Destabilisierung der mRNA und somit zur Inhibierung der Proteintranslation. [62, 71]

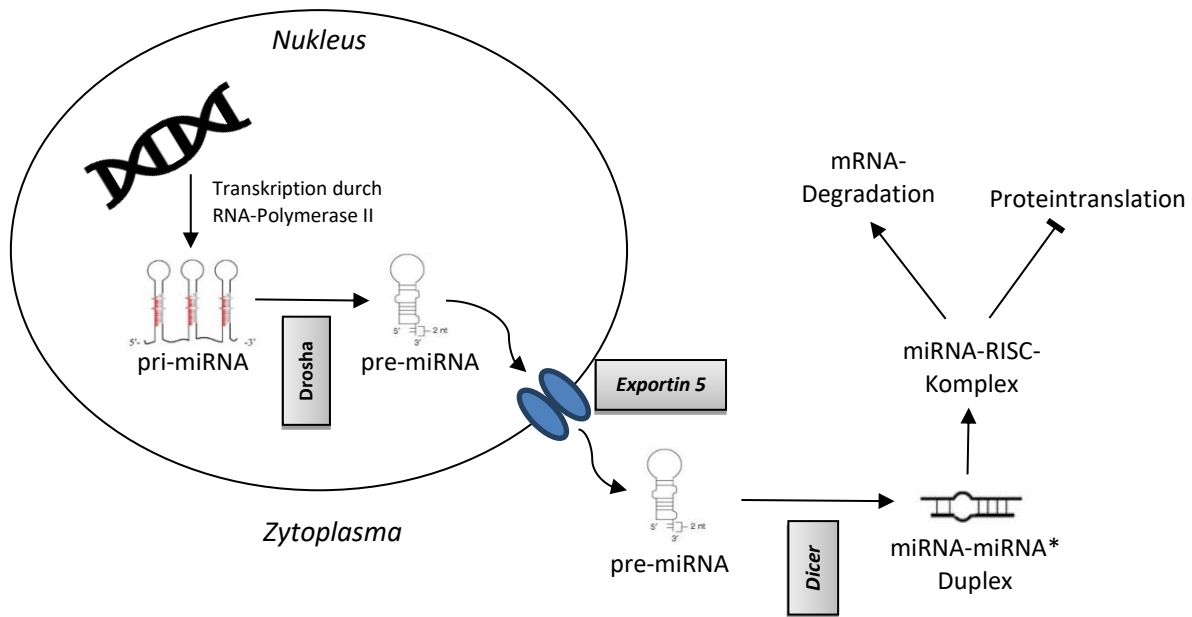


Abbildung 1: microRNA Biogenese nach [61, 68, 69]

Die Biogenese von reifen microRNAs besteht aus zwei Prozessierungsschritten. Zunächst erfolgt die Transkription der miRNA-Gene durch die RNA-Polymerase II im Nukleus der Zelle. Dabei entsteht ein doppelsträngiges Primär-microRNA-Transkript (pri-miRNA) das als Substrat für zwei Unterarten der RNA-Polymerase III, Drosha und Dicer dient. Drosha schneidet die pri-miRNA-Moleküle im Nukleus der Zelle in Vorläufer-microRNAs (pre-miRNAs), die schließlich von Exportin-5 gemeinsam mit seinem Co-Faktor Ran-GTP gebunden und vom Nukleus ins Zytoplasma transportiert werden. Im Zytoplasma schneidet Dicer die pre-miRNA in einzelsträngige microRNA, die schließlich in Form eines microRNA:miRNA* Duplex vorliegt. Der reife miRNA Strang wird schließlich in den RISC-Komplex inkorporiert. So ist es microRNAs, durch komplementäre Basenpaarbindung an die entsprechende Zielsequenz in der 3'UTR-Region der Ziel-mRNA, möglich die Ziel-mRNA zu degradieren oder die Proteintranslation zu inhibieren.

1.5.2 microRNAs im Rahmen der (Xeno-)transplantation

MicroRNAs spielen eine wichtige regulatorische Rolle in zahlreichen physiologischen und auch pathologischen Prozessen im menschlichen Körper. Durch Veränderungen in der microRNA-Expression können verschiedenste Zielgene reguliert werden und somit Einfluss auf die Embryogenese, Differenzierung, Proliferation und Apoptose von Zellen nehmen und dadurch inflammatorische Prozesse regulieren. Es ist bereits bekannt, dass microRNAs eine zentrale Rolle bei der Pathogenese humaner Erkrankungen, beispielsweise im Rahmen von Autoimmunerkrankungen und in der Tumorgenese spielen. [72, 73] Auch wurde inzwischen mehrfach ihre Bedeutung für immunologische und nicht immunologische Erkrankungen untersucht. Aktuelle Studien deuten darauf hin, dass microRNAs auch im Rahmen von (Xeno-)transplantationen eine zentrale Rolle spielen.

So fanden Anglicheau et al. in ihrer Studie heraus, dass die microRNA-Expression innerhalb eines renalen Allotransplantates einen guten Biomarker für die akute Abstoßungsreaktion (AR) darstellt. In ihrer Studie untersuchten sie 33 Nierenallotransplantate (12 Transplantate mit AR und 21 normale Transplantate ohne AR) anhand von Biopsien auf die Expression von 17 microRNAs. Sie fanden heraus, dass sich die microRNA-Expression in den Biopsien der akut abgestoßenen Allotransplantate von denen der normalen, gesunden Allotransplantate deutlich unterschieden und vor allem die microRNAs miR-142-5p, -155, -223 als Biomarker gut geeignet sind, um mit einer Sensitivität von bis zu 100% und einer Spezifität von bis zu 95% eine Vorhersage über die AR zu treffen. [74, 75]

Ähnliches fanden auch Duong van Huyen et al. in ihrer Studie heraus. Sie untersuchten die Expression von 14 microRNAs in Transplantatbiopsien und im Serum von Herztransplantationspatienten (n=30) mit einer stattgefundenen und in der Biopsie nachgewiesenen akuten Transplantatabstoßung (AR). Diese Ergebnisse wurden mit einer Kontrollgruppe (n=30) ohne stattgefundene AR verglichen. Es konnten dabei sieben microRNAs identifiziert werden, deren Expression sich in den Transplantatbiopsien mit AR signifikant von ihrer Expression in den Biopsien ohne AR unterschied: miR-10a, miR-21, miR-31, miR-92a, miR-142-3p miR-155, und miR-451 ($P < 0.0001$). Die miR-10a, miR-31, miR-92a, und miR-155 zeigten zudem eine starke Korrelation zwischen ihrer Expression im Serum und im Biopsiegewebe. Ziel dieser Studie war es somit die unterschiedlich starke microRNA-Expression abhängig von der AR sowohl im Transplantatgewebe als auch im Serum zu zeigen und damit die potentielle Rolle der microRNAs als nicht-invasive Biomarker im Rahmen der akuten Transplantatabstoßung zu zeigen. [76]

Auch Givens et al. untersuchten in ihrer Studie die Rolle von microRNAs im Rahmen der Herztransplantation. In dieser Studie wurde das Serum von 12 gesunden Probanden, 12 Patienten nach Herztransplantation ohne Anzeichen einer AR in der Transplantatbiopsie, 11 Patienten nach Herztransplantation mit akut zellulärer Abstoßung (ACR) und 6 Patienten mit Antikörper-abhängiger Abstoßung (AMR) verglichen. Hierbei zeigte sich, dass vor allem die microRNAs miR-101 und -223-3p and -let-7a das Potential haben frühzeitig Patienten mit ACR und AMR zu erkennen. [77]

Li et al. untersuchten in einem heterotopen kardialen Maus-zu-Ratte Transplantationsmodell die Rolle von microRNAs im Rahmen der Xenotransplantation. Mithilfe von Microarray Analysen wurden 579 microRNAs identifiziert, die nach erfolgter Transplantation im Herztransplantat exprimiert wurden. Dazu wurden die Versuchstiere in drei Gruppen unterteilt: eine Maus-zu-Ratte xenogen transplantierte Versuchsgruppe bei der die microRNA-Expression 24 Stunden nach Transplantation erfasst wurde, eine Maus-zu-Ratte xenogen transplantierte Versuchsgruppe bei der die microRNA-Expression 40 Stunden nach Transplantation erfasst wurde und eine syngen transplantierte Maus-zu-Maus Kontrollgruppe. 24 Stunden nach erfolgter Xenotransplantation unterschied sich die Expression von 24 microRNAs im Transplantat deutlich von der Kontrollgruppe, 40 Stunden nach Xenotransplantation sogar die Expression von 25 microRNAs. Weitere Versuche ergaben, dass die microRNAs miR-146a und miR-155 bei Xenotransplantation deutlich hochreguliert wurden und miR-451 deutlich herunterreguliert wurde im Vergleich zur Kontrolle. Somit konnte gezeigt werden, dass die untersuchten microRNAs möglicherweise an der Abstoßungsreaktion bei Xenotransplantationen beteiligt sind und einen wichtigen Ansatzpunkt in der Regulation dieser Immunantwort spielen könnten. [78]

Zusammenfassend zeigen all diese Studien, dass microRNAs einen wichtigen diagnostischen und therapeutischen Ansatzpunkt im Rahmen der Xenotransplantationsforschung darstellen.

2 FRAGESTELLUNG

Die Transplantatabstoßung stellt das größte Hindernis für eine erfolgreiche Xenotransplantation dar. Bei der kardialen Xenotransplantation von Schwein zu Mensch handelt es sich um eine diskordante Transplantation, die eine starke Immunreaktion im menschlichen Körper auslöst.

In Studien konnte bereits gezeigt werden, dass es im Rahmen einer Xenotransplantation, ähnlich wie bei einer Allotransplantation, zu einer Infiltration des Transplantates mit Makrophagen, NK-Zellen, CD4⁺-Zellen und CD8⁺-Zellen kommt [79]. Jedoch gibt es bisher nur wenige Studien, die die akute T-Zell-vermittelte Abstoßung eines Xenotransplantates auf molekularbiologischer Ebene untersuchen.

Nach unserem Kenntnisstand wird in der vorliegenden Arbeit erstmalig, anhand eines ex-vivo Perfusionsmodells, die T-Zell-Antwort im Rahmen einer kardialen Xenotransplantation charakterisiert. Hierfür erfolgte nach 180-minütiger Perfusion eines porcinen Herzens mit humanem Vollblut die Untersuchung verschiedener an einer T-Zell-Aktivierung beteiligter Targets durch Durchflusszytometrie (CD25, CD69, CD134, CD137 und CD154) und Real-Time quantitative PCR (FoxP3, GZM β , ICOS, Interferon- γ , IL-2, IL-4, IL-8, IL-10, OX40, PD1, PRF1, TGF β , TIM3, TNF α und die microRNAs miR-16, miR-31, miR-93, miR-150, miR-155, miR-223).

Ziel dieser Arbeit war es, ein umfassendes Bild der T-Zell-Antwort im Rahmen eines kardialen Xenotransplantationsmodells zu zeichnen, um mögliche diagnostische und therapeutische Ansatzpunkte zur Erkennung und Überwindung einer Transplantatabstoßung ausfindig zu machen.

3 VERSUCHSTIERE UND MATERIAL

3.1 Versuchstiere

Als Organspender wurden sieben männliche Schweine (Deutsche Landrasse) mit einem Körpergewicht zwischen 11 und 21 kg verwendet. Die explantierten Herzen hatten vor Perfusion ein Gewicht zwischen 60 und 118 g.

3.2 Probenmaterial

Die Blutspenden für die ex-vivo Organperfusionen wurden von freiwilligen, gesunden, männlichen Probanden unter deren Einverständnis entnommen. Die Blutentnahmen wurden von der Ethikkommission der Medizinischen Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität genehmigt (Aktenzeichen 105-2).

3.3 Materialien

Nachfolgend werden alle im Rahmen dieser Dissertation benötigten Materialien alphabetisch aufgelistet.

3.3.1 Reagenzien

Sämtliche für die experimentelle Durchführung benötigten Reagenzien wurden in höchstmöglichem Reinheitsgrad von den entsprechenden Herstellern bezogen.

autoMACS® Rinsing Solution	Miltenyi Biotech GmbH, Bergisch Gladbach
β-Mercaptoethanol	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Desoxyribonukleosidtriphosphate (dNTPs)	Roche Diagnostics, Mannheim
Ethanol 100% für Molekularbiologie	Merck KGaA, Darmstadt
Forward Primer FoxP3	Metabion GmbH, Martinsried
Forward Primer GZMβ	Metabion GmbH, Martinsried
Forward Primer ICOS	Metabion GmbH, Martinsried
Forward Primer Interferon-γ	Metabion GmbH, Martinsried
Forward Primer Interleukin-2	Metabion GmbH, Martinsried
Forward Primer Interleukin-4	Metabion GmbH, Martinsried
Forward Primer Interleukin-10	Metabion GmbH, Martinsried

Forward Primer OX40	Metabion GmbH, Martinsried
Forward Primer PD1	Metabion GmbH, Martinsried
Forward Primer PRF1	Metabion GmbH, Martinsried
Forward Primer SDHA	Metabion GmbH, Martinsried
Forward Primer TBP	Metabion GmbH, Martinsried
Forward Primer TGF β	Metabion GmbH, Martinsried
Forward Primer TIM3	Metabion GmbH, Martinsried
Forward Primer TNF α	Metabion GmbH, Martinsried
Hank'sche Lösung ohne Phenolrot (HBSS)	Apotheke Innenstadt Universität München
HISTOPAQUE®- 1077 (Dichte 1,077 g/ml)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
LightCycler 480 Probes Master	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
MACS® BSA Stock Solution	Miltenyi Biotech GmbH, Bergisch Gladbach
Oligo-dT Primer	Qiagen GmbH, Hilden
Phosphate Buffered saline (PBS) (pH 7,4)	Apotheke Innenstadt Universität München
PCR-Grade Nuklease-freies Wasser	Qiagen GmbH, Hilden
Reverse Primer FoxP3	Metabion GmbH, Martinsried
Reverse Primer GZM β	Metabion GmbH, Martinsried
Reverse Primer ICOS	Metabion GmbH, Martinsried
Reverse Primer Interferon- γ	Metabion GmbH, Martinsried
Reverse Primer Interleukin-2	Metabion GmbH, Martinsried
Reverse Primer Interleukin-4	Metabion GmbH, Martinsried
Reverse Primer Interleukin-10	Metabion GmbH, Martinsried
Reverse Primer OX40	Metabion GmbH, Martinsried
Reverse Primer PD1	Metabion GmbH, Martinsried
Reverse Primer PRF1	Metabion GmbH, Martinsried
Reverse Primer SDHA	Metabion GmbH, Martinsried
Reverse Primer TBP	Metabion GmbH, Martinsried
Reverse Primer TGF β	Metabion GmbH, Martinsried
Reverse Primer TIM3	Metabion GmbH, Martinsried
Reverse Primer TNF α	Metabion GmbH, Martinsried
RNaseOut™ Recombinant Ribonuclease Inhibitor	Invitrogen GmbH, Darmstadt

RPMT-1640 Medium	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
T4 DNA Ligase	Promega GmbH, Mannheim
T4 DNA Ligase Puffer 10x	Promega GmbH, Mannheim
Taq Polymerase	Jena Bioscience GmbH, Jena
Taq Polymerase 10x Reaktionspuffer	Jena Bioscience GmbH, Jena
Universal Probes Library #2 (verwendet für ICOS)	Roche Diagnostics, Mannheim
Universal Probes Library #3 (verwendet für TIM3)	Roche Diagnostics, Mannheim
Universal Probes Library #21 (verwendet für Interferon- γ)	Roche Diagnostics, Mannheim
Universal Probes Library #23 (verwendet für OX40)	Roche Diagnostics, Mannheim
Universal Probes Library # 26 (verwendet für PD1, PRF1)	Roche Diagnostics, Mannheim
Universal Probes Library # 29 (verwendet für TNF α)	Roche Diagnostics, Mannheim
Universal Probes Library # 31 (verwendet für TGF β)	Roche Diagnostics, Mannheim
Universal Probes Library # 37 (verwendet für GZM β)	Roche Diagnostics, Mannheim
Universal Probes Library # 38 (verwendet für Interleukin-4)	Roche Diagnostics, Mannheim
Universal Probes Library # 65 (verwendet für Interleukin-2, FoxP3)	Roche Diagnostics, Mannheim
Universal Probes Library # 67 (verwendet für Interleukin-10)	Roche Diagnostics, Mannheim
Universal Probes Library #87 (verwendet für TBP)	Roche Diagnostics, Mannheim
Universal Probes Library #132 (verwendet für SDHA)	Roche Diagnostics, Mannheim
10x DNase-Buffer	Ambion, Inc., Austin, USA

3.3.2 Assays und Kits

MACS® Pan T Cell Isolation Kit II (human)	Miltenyi Biotec GmbH, Bergisch Gladbach
mirVana™ miRNA Isolation Kit	Applied Biosystems, Foster City, USA
Real Time Ready Single Assay IL-8 (Assay 103136)	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
RNeasy Mini Kit	Qiagen GmbH, Hilden
SuperScript™ III Reverse Transcriptase Kit	Invitrogen GmbH, Darmstadt
TaqMan® MicroRNA Assay für hsa-miR 16	Applied Biosystems, Inc., Foster City, USA
TaqMan® MicroRNA Assay für hsa-miR 31	Applied Biosystems, Inc., Foster City, USA
TaqMan® MicroRNA Assay für hsa-miR 93	Applied Biosystems, Inc., Foster City, USA

TaqMan® MicroRNA Assay für hsa-miR 150	Applied Biosystems, Inc., Foster City, USA
TaqMan® MicroRNA Assay für hsa-miR 155	Applied Biosystems, Inc., Foster City, USA
TaqMan® MicroRNA Assay für hsa-miR 223	Applied Biosystems, Inc., Foster City, USA
TaqMan® MicroRNA Assay für Kontrolle U47	Applied Biosystems, Inc., Foster City, USA
TaqMan® MicroRNA Reverse Transcription Kit	Applied Biosystems, Inc., Foster City, USA
TargetAmp 1-Round aRNA Amplification Kit 103	Epicentre Biotechnologies, Chicago, USA
TURBO DNA-free™ Kit	Life Technologies GmbH, Darmstadt

3.3.3 Medien und Puffer

MACS® - Puffer = Puffer A	MACS™ BSA Stock solution autoMACS™ rinsing solution (Verdünnung 1:20)
RPMI 1640-Medium (Roswell Park Memorial Institute Medium)	500 mL RPMI-Medium 10 % FCS (hitzeinaktiviert) 1 % L-Glutamin 1 % Penicillin-Streptomycin 1 % HEPES

3.3.4 Primersequenzen

FoxP3 forward FoxP3 reverse	5'-CCT TGC CCC ACT TAC AGG-3' 5'-CCA CCG TTG AGA GCT GGT-3' UPL probe #65
GZMβ forward GZMβ reverse	5'-GGG GGA CCC AGA GAT TAA AA-3' 5'-CCA TTG TTT CGT CCA TAG GAG-3' UPL probe #37
ICOS forward ICOS reverse	5'-TTC TGC TTG CGC ATT AAA GTT-3' 5'-CAT CTC ATA ATT GGC AGA ACC A-3' UPL probe #2
Interferon- γ forward Interferon- γ reverse	5'-GGC ATT TTG AAG AAT TGG AAA G-3' 5'-TTT GGA TGC TCT GGT CAT CTT-3' UPL probe #21
Interleukin-2 forward Interleukin-2-reverse	5'-AAGTTTTACATGCCCAAGAAG G-3' 5'-AAGTGAAAGTTTTTGCTTTGAGCTA-3' UPL probe #65
Interleukin-4 forward Interleukin-4-reverse	5'-TGCCTCACATTGTCACTGC-3' 5'-GCACATGCTAGCAGGAAGAAC-3' UPL probe #38
Interleukin-10 forward Interleukin-10-reverse	5'-TGCCTTCAGCAGAGTGAAGA -3' 5'-GCAACCCAGGTAACCCTTAAA 3' UPL probe #67

OX40 forward OX40 reverse	5'-TGC ACG TGG TGT AAC CTC AG-3' 5'-CTC CAG GCT TGT AGC TGT CC-3' UPL probe #23
PD1 forward PD1 reverse	5'-CTC CAG GCA TGC AGA TCC-3' 5'-GGC CTG TCT GGG GAG TCT A-3' UPL probe #26
PRF1 forward PRF1 reverse	5'-CACTCACAGGCAGCCAACT-3' 5'-GGGAGTGTGTACCACATGGA-3' UPL probe #26
SDHA forward SDHA reverse	5'-GAGGCAGGGTTTAATACAGCA-3' 5'-CCAGTTGTCCTCCTCCATGT-3' UPL probe #132
TBP forward TBP reverse	5'-GAACATCATGGATCAGAACAACA-3' 5'-ATAGGGATTCCGGGAGTCAT-3' UPL probe #87
TGFβ forward TGFβ reverse	5'-ACTACTACGCCAAGGAGGTCAC-3' 5'-TGCTTGAAGTTGTCATAGATTTCG-3', UPL probe #31
TIM3 forward TIM3 reverse	5'-CCA AGG ATG CTT ACC ACC AG-3' 5'-GAG GCT CCC CAG TGT CTG T-3' UPL probe #3
TNFα forward TNFα reverse	5'-CAGCCTCTTCTCCTTCCTGAT-3' 5'-GCCAGAGGGCTGATTAGAGA-3' UPL probe #29

3.3.5 Antikörper für durchflusszytometrische Untersuchungen

Antikörper	Konjugat	Klon	Ig-Klasse	Hersteller
Lebend-Tot	Blue Dye	-	-	Invitrogen GmbH, Darmstadt
CD4	APC	L200	IgG1k	BD Biosciences, San Jose, USA
CD8	Alexa Fluor 700	RPA-T8	Mouse IgG1k	BD Pharmingen, Heidelberg, Deutschland
CD25	PerCp-Cy5.5	M-A 251	IgG1k	BD Pharmingen, Heidelberg, Deutschland
CD69	FITC	FN50	Mouse IgG1k	BD Biosciences, San Jose, USA
CD134	FITC	ACT35	IgG1	BD Biosciences, San Jose, USA
CD137	PE	4B4-1	IgG1k	BD Biosciences, San Jose, USA
CD154	PE	89-76	IgG1	BD Biosciences, San Jose, USA

3.3.6 Geräte und Verbrauchsmaterialien für die zell- und molekularbiologischen Methoden

Attune® Acoustic Focusing Cytometer	Applied Biosystems, Foster City, USA
Autoklav DE-45	Systec GmbH, Wettenberg
BD™ LSR II Flow Cytometer	BD Biosciences, San Jose, USA
Falcon Tubes 50 mL	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen
Handschuhe Latex, unsteril	Paul Hartmann AG, Heidenheim
Handschuhe Nitril, unsteril	Cardinal Health Inc., Dublin, Amerika
Light Cycler® 480	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
Light Cycler® 480 Sealing Foil	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
MACS® Separation Columns LS	Miltenyi Biotec GmbH, Bergisch Gladbach
Mikrozentrifuge Centrifuge 5425 R	Eppendorf AG, Hamburg
Mikrozentrifuge Mikro 200	Andreas Hettich GmbH & Co. KG, Tuttlingen
Pipetten Eppendorf Reference	Eppendorf AG, Hamburg
Perfusionsspritze BD Plastipak TM 50ml	BD Drogna, Ireland
Pipettenspitzen, steril	Eppendorf AG, Hamburg
Pipettenspitzen, unsteril	Eppendorf AG, Hamburg
Pipettenspitzen mit Filter, steril	Biozym GmbH, Hessisch Oldendorf
Quadro MACS® Separator	Miltenyi Biotec GmbH, Bergisch Gladbach
Reagenzröhrchen 1,5 mL, steril	Eppendorf AG, Hamburg
Reagenzröhrchen 1,5 mL, unsteril	Eppendorf AG, Hamburg
Reagenzröhrchen 0,5 mL, steril	Eppendorf AG, Hamburg
Reagenzröhrchen 2 mL, steril	Biozym GmbH, Hessisch Oldendorf
Reagenzröhrchen 13 mL	Sarstedt AG & Co, Nürnbrecht-Rommelsdorf
Spectrophotometer Nano Drop 2000	Peqlab GmbH, Erlangen
Thermocycler Mastercycler gradient	Eppendorf AG, Hamburg
Thermocycler Mastercycler pro S	Eppendorf AG, Hamburg
Vi-Cell™ XR Cell Viability Analyzer	Beckman Coulter GmbH, Krefeld
Vi-Cell™ Sample Cups Analysengefäße	Beckman Coulter GmbH, Krefeld
Vortexschüttler REAX 2000	Heidolph Instruments GmbH & Co.KG, Schwabach
Wasserbad SWB 25	Haake-Technik, Vreden
Zentrifuge Multifuge 3S-R	Heraeus Instruments, Hanau
Zentrifuge Varifuge 3.0R	Heraeus Sepatech, Hanau
96-Well Light Cycler® 480 Multiwell Platten	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim

3.3.7 Geräte und Verbrauchsmaterialien für das ex-vivo Perfusionssystem

Aorten/ Truncus pulmonalis Kanüle	Spezialanfertigung
Blutgasanalysegerät	Siemens AG, Erlangen
Dopplersensoren zur Flussmessung, Ultrasonic Flowmeter	Cynergy3, Dorset, England
Dreiwegehahn	B. Braun, Melsungen
DTX/Plus™ Druckwandler	BD, Utah, USA
Gerader Schlauchkonnektor	MCS, München
Hewlett Packard Codemaster XL+®	Hewlett-Packard GmbH, Böblingen
Koronarsinus-Katheter, Blue FlexTip®	Arrow, Reading, USA
Oxygenator HILITE® 1000	Medos, Stolberg

Perfusor® Space	B. Braun, Melsungen
Siemens SC 900 Beatmungsgerät	Siemens AG, München
soft shell Reservoir	MCS, München
Teilchenfluss Filter	MCS, München
Voltcraft VC110	Conrad Electronic SE, Hirschau
Verlängerungsleitung, 150cm	B.Braun, Melsungen
Vorhofkanüle	Spezialanfertigung
Widerstandssystem	Sonderanfertigung
Y-förmiger Schlauchkonnektor	MCS, München
Zentrifugalpumpe Deltastream®,	Medos, Stolberg
1/4 Zoll Schlauchleitung	Rehau GmbH, Rehau
3/8 Zoll Schlauchleitung	Rehau GmbH, Rehau
4.5 Spiraltubus, Safety-FLEX,	Mallinckrodt, St. Louis, USA
50ml Spritze	B.Braun, Melsungen

3.3.8 Medikamente und Lösungen für den ex-vivo Perfusionsversuch

Atropinsulfat®	B.Braun, Melsungen
Calciumgluconat 10% Injektionslösung,	B.Braun, Melsungen
Custodiol®	Dr. Franz Köhler Chemie GmbH, Bensheim
Fentanyl-Janssen®	Janssen-Cilag GmbH, Neuss
Heparin-Natrium-25000-Ratiopharm®	Ratiopharm, Ulm
Ketavet®	Pharmacia&Upjohn GmbH, Erlangen
Natriumhydrogencarbonat 8,4%, Infusionslösung	B.Braun, Melsungen
Pancuronium Inresa	Inresa GmbH, Freiburg
Plastipur®	Fresenius Kabi Deutschland GmbH, Bad Homburg v.d.H
Propofol-®Lipuro 2%	B.Braun, Melsungen
Stresnil®	Janssen-Cilag GmbH, Neuss
Vololyte 6%	Fresenius Kabi Deutschland GmbH, Bad Homburg v.d.H.

3.3.9 Software

Attune® Cytometric Software	Applied Biosystems, Foster City, USA
BD™ Diva	BD Biosciences, San Jose, USA
Light Cycler® 480 Relative Quantification Software	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
Microsoft® Excel 2010	Microsoft Deutschland GmbH, Unterschleißheim
PubMed	http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/
SigmaPlot 11.0	Systat Software GmbH
Universal ProbeLibrary Assay Design Center	https://www.roche-applied- science.com/sis/rtpcr/upl/index.jsp?id=uplct_030000

4 METHODEN

4.1 Ex-vivo Perfusionsmodell

Das Perfusionssystem wurde entwickelt, um die biventrikuläre Funktion von Schweineherzen während einer ex-vivo Perfusion mit humanem Vollblut zu untersuchen. Dabei wurden die Herzen von sieben deutschen Landrasseschweinen mit heparinisiertem (10 IE/ml Blut) frischem humanem Blut perfundiert. Als Blutspender dienten hierbei gesunde männliche Probanden. Das Blut wurde am Versuchstag unmittelbar vor der Perfusion, über einen venösen Zugang in die V. mediana cubiti, mit zehn 50 ml Spritzen abgenommen. Diese enthielten bereits vor Blutabnahme je 500 IE Heparin. Um einen dem physiologischen Schweine-Hämoglobinwert entsprechenden Wert von 8-10 mg/dl zu erreichen und die Gesamtmenge an Perfusat zu erhöhen, wurde das Blut nach Entnahme mit 6 %iger Hydroxyethylstärke (Vololyte 6 %) im Reservoir verdünnt. Als Kontrolle wurde schließlich das Perfusionssystem, ohne Herz, ebenfalls mit dem entsprechend verdünnten Blut der gleichen Spender perfundiert. Ein Blutspender spendete also jeweils für einen Perfusionsversuch und eine dazugehörige Kontrolle, so dass diese gepaart untersucht werden konnten.

Tabelle 2: Liste der Perfusionsversuche und der zugehörigen Kontrollen

Proband	Perfusionsversuch	Kontrolle ohne Herz
1	DV 80	WH 80
2	DV 96	WH 81
3	DV 102	WH 102
4	DV 103	WH 103
5	DV 115	WH 74
6	DV 116	WH 83
7	DV 117	WH 0

4.1.1 Anästhesie

Die Schweine wurden mit einer intramuskulären Injektion von 10 mg/kg Azaperon (Stresnil®), 10-20 mg/kg Ketamin (Ketavet®) und 0,02 mg/kg Atropinsulfat® in die Nackenmuskulatur prämediziert.

Über einen venösen Zugang am Ohr wurde die Narkose mit 1 mg/kg Propofol und 0,01 mg/kg Fentanyl Dihydrogencitrat eingeleitet. Während der Explantation wurde die Narkose mit 5-10mg/kg/h Propofol and 0,01 mg/kg/h Fentanyl aufrechterhalten.

Nach endotrachealer Intubation mit einem 4.5 Spiraltubus (Safety-FLEX), erfolgte die druckkontrollierte maschinelle Beatmung (Siemens SC 900) mit einem Sauerstoff-Luft-Gemisch von 50 %.

4.1.2 Herzexplantation

Nachdem das Tier in Rückenlage fixiert wurde, erfolgte eine mediane Sternotomie unter Erhaltung der kranial gelegenen Vasa thoracica interna. Unter Zuhilfenahme eines Wundspreizers war der Zugang zum Mediastinum und somit auch zum Thymus möglich. Dieser wurde reseziert und anschließend das Perikard longitudinal eröffnet.

Die Vena cava caudalis wurde angeschlungen und sowohl die Arteria pulmonalis als auch die Aorta ascendens, nach Ligatur des rechten Vorhofohrs, freipräpariert. Nach Präparation wurde die Aorta ascendens ebenfalls angeschlungen.

Die systemische Vollheparinisierung erfolgte mit 500 IE/kg (Heparin-Natrium-25000-Ratiopharm®), während die Muskulatur mithilfe von 4 mg Pancuroniumbromid (Pancuronium Inresa) relaxiert wurde.

Anschließend wurden die V. cava caudalis ligiert und sowohl die V. cava cranialis als auch die Aorta ascendens abgeklemmt. Über eine Kanüle wurde zur Kardioplegie 4°C kalte kardioplegische Lösung (Custodiol®) in die Aortenwurzel verabreicht. Das Herz wurde mittels Ringerlösung (Plastipur®) topisch gekühlt. Nach vollständiger Applikation von 50 ml/kg kardioplegischer Lösung wurde der Herz-Lungen-Block entnommen und in 4°C kalter Ringerlösung gekühlt und aufbewahrt.

4.1.3 Präparation des Herzens

Die Trachea und Lungen wurden nach der Explantation freipräpariert und vom Herzen abgetrennt. Die Pulmonalvenen wurden mit einer Ligatur verschlossen und das Herz anschließend gewogen.

Vier Kanülen (50 mm Innendurchmesser) wurden in die Aortenwurzel, den Truncus pulmonalis sowie beide Vorhöfe eingeführt und jeweils mithilfe einer 2-0 Ligatur fixiert. Ein 14.0 Gauge Katheter (Blue FlexTip®) wurde über die Vena cava caudalis in den Sinus Coronarius geschoben. Anschließend wurde dieser mit einer Ligatur befestigt. Ebenso wurde die Vena cava cranialis ligiert.

4.1.4 Aufbau des Perfusionssystems

In dem für die Xeno-perfusion entwickelten System war es möglich das benötigte Blutvolumen gering zu halten und gleichzeitig einen weitgehend physiologischen Blutstrom zu ermöglichen. Das System wurden aus medizintechnischen Komponenten aufgebaut, die für die Verwendung in Herz-Lungen-Maschinen und extrakorporalen Perfusionssystemen zur Verfügung stehen.

Die wichtigsten Komponenten waren ein Reservoir, ein Oxygenator (HILITE® 1000), ein 30 µm Teilchenfluss Filter, eine Zentrifugalpumpe (Deltastream®), zwei Doppler-Sensoren zur Flussmessung sowie ein dreiteiliges Windkesselsystem zur Regulierung des Flusswiderstandes und Dämpfung der Druckwellen.

Druckwandler sowie ein Glucoseperfusor (Perfusor®Space) wurden über Leitungen mit dem System verbunden. Der Wärmetauscher des Oxygenators und des Reservoirs wurden an die Wasserpumpe eines termostategesteuerten Wasserbads angeschlossen, um das Perfusat während des gesamten Versuchs auf einer Temperatur von 37°C zu halten.

4.1.5 Vorbereitung des Perfusionssystems

Nachdem das Schlauchsystem mit Natriumchlorid gespült und erwärmt wurde, wurde das heparinisierte Spenderblut in das System eingebracht, um darin zu zirkulieren. Natriumhydrogencarbonat und Glucose wurden hinzugegeben, um eine Basenabweichung von -2 bis +2 mmol/l und eine Glucosekonzentration von 120 bis 140 mg/dl zu erhalten. Das zirkulierende Perfusat wurde dabei oxygeniert und

carboxyliert bis ein pO_2 von 100-150 mmHg und eine pCO_2 von 35-40 mmHg erreicht wurden.

Nach sorgfältiger Entlüftung und Entfernung aller Luftblasen konnte anschließend das Herz mit Aorta, Pulmonalarterie und beiden Vorhöfen an das Schlauchsystem angeschlossen werden (siehe Abbildung 2).

Anschließend wurde das Herz mit Perfusat gefüllt und entlüftet. Während der anschließenden Perfusion wurden dem Blut kontinuierlich 2ml/h Glucose und 0,2 IE/h Insulin beigefügt.

Nach dem Erreichen einer 150-minütigen Ischämiezeit wurden das Herz initial durch retrograden Fluss durch die Aorta mit einem konstanten Druck von 65 mmHg reperfundiert wurde. Die elektrische Aktivität des Myokards setzte wieder ein. Trat schließlich Kammerflimmern auf, wurde das Herz mit einem manuellen Defibrillator (Hewlett Packard Codemaster XL+®) mit fünf bis zehn Joule defibriert.

4.1.6 Reperfusion im Langendorff-Modus

Zunächst wurde das Herz weiter im „Langendorff-Modus“ perfundiert: Der Blutfluss erfolgte ausgehend vom Reservoir über den rechten Umgehungskreislauf in den pulmonalen Kreislauf, der sich aus der Zentrifugalpumpe, dem Oxygenator und dem Filter zusammensetzte. Anschließend führte der Blutfluss über den linken Umgehungskreislauf zur Aorta. Da bedingt durch das Widerstandssystem und die Rotationspumpe ein Druckgradient zwischen der Aorta und dem linken Ventrikel entstand, blieb die Aortenklappe verschlossen und es fand ein retrograder Fluss des Blutes durch die Aorta in die Koronararterien statt. Nach Durchfließen der Koronararterien, gelangte das Blut zunächst in die Mikrozirkulation des Myokards und dann über die Koronarvenen in den Koronarsinus. Der Blutfluss erfolgte weiter über den rechten Vorhof in das Schlauchsystem, durch welches das Blut schließlich in das Reservoir zurückgeleitet wurde und damit der Kreislauf geschlossen war. Der retrograde Fluss durch die Aorta (Langendorff-Modus) wurde bei einem Mitteldruck von 65 mmHg in der Aorta für 15 Minuten lang aufrechterhalten.

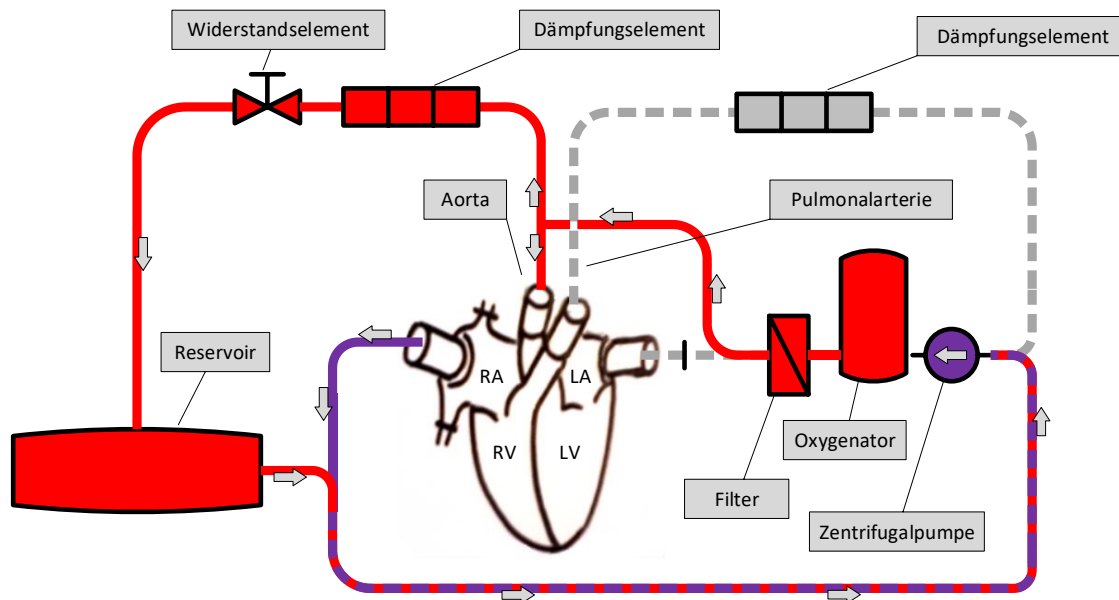


Abbildung 2: Perfusion im Langendorff-Modus

Ausgehend vom Reservoir erfolgte der Blutfluss über den rechten Umgehungskreislauf zur Zentrifugalpumpe, dem Oxygenator und Filter. Anschließend gelangte das Blut über den linken Umgehungskreislauf zur Aorta. Bei verschlossener Aortenklappe verursachte der retrograde Fluss des Blutes durch die Aorta eine Perfusion der Koronararterien und der Mikrozirkulation des Myokards. Letztendlich gelangte das Perfusat über die Koronarvenen in den Sinus coronarius. Über den rechten Vorhof führte der Blutfluss zurück in das Schlauchsystem, wo sich das Blut mit dem Restblut aus dem Reservoir vermengte und somit der Kreislauf sich schloss.

4.1.7 Perfusion im Working-Heart-Modus

Nach erfolgter Perfusion im Langendorff-Modus wurden die Umgehungskreisläufe geschlossen und die Perfusion des Herzens auf den Working-Heart Modus umgestellt.

Zunächst wurde das Reservoir auf ein im Vergleich zum rechten Vorhof höheres Niveau gebracht, so dass die Vorlast des rechten Vorhofs 6 mmHg betrug. Das Blut floss der Schwerkraft folgend vom Reservoir in den rechten Vorhof und anschließend über den rechten Ventrikel über die Arteria pulmonalis weiter in den pulmonalen Kreislauf. Um den Mitteldruck und die Druckamplituden in der Pulmonalarterie auf physiologische Werte herabzusetzen, wurde das Dämpfungselement in den pulmonalen Kreislauf eingebaut sowie die Unterstützung durch die Zentrifugalpumpe reguliert. Das Perfusat floss anschließend oxygeniert und von Mikrothromben gefiltert in den linken Vorhof, weiter in den linken Ventrikel und wurde schließlich vom Herzen selbst über die Aorta zurück in das Reservoir gepumpt.

Dabei wurden der Mitteldruck und die Blutdruckamplitude der Aorta über ein dreiteiliges Windkesselsystem reguliert. So waren während des gesamten Perfusionsversuches ein

Mitteldruck von ca. 65 mmHg und ein systolischer Druck von ca. 100 mmHg gewährleistet.

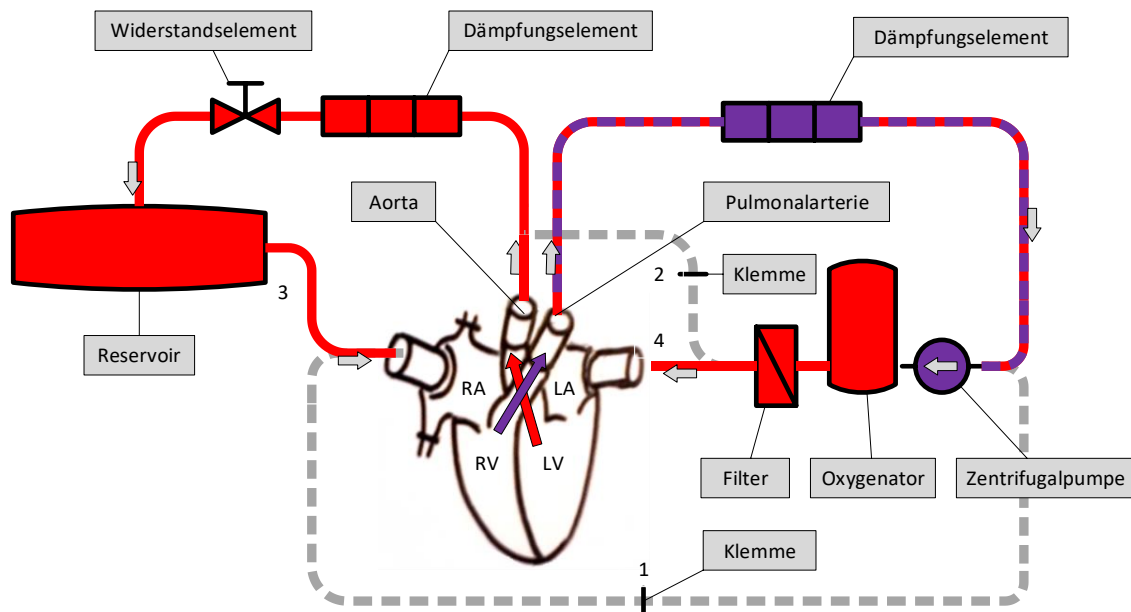


Abbildung 3: Perfusion im Working-Heart-Modus

Ausgehend vom Reservoir erfolgte der Blutfluss in den rechten Vorhof und über den rechten Ventrikel weiter in die Arteria pulmonalis. Das Blut durchfloss im pulmonalen Kreislauf zunächst das Dämpfungselement und schließlich die Zentrifugalpumpe, den Oxygenator und den Filter. Oxygeniert und von Mikrothromben gefiltert floss das Blut dann in den linken Vorhof und Ventrikel und wurde schließlich vom Herzen selbst über die Aorta durch das dreiteilige Windkesselsystem gepumpt. Der Kreislauf war durch das anschließende Zurückfließen des Blutes zum Reservoir geschlossen.

4.1.8 Regulation des biventrikulären Working-Heart-Modells

Folgende Parameter wurden während der Versuche gemessen und konstant gehalten:

- Blutdruck:

Mithilfe von Druckwandlern in den zuführenden Leitungen zum System wurden der Druck in der Aorta, der Arteria pulmonalis sowie dem rechten und linken Vorhof, kontinuierlich gemessen werden. Aus den Druckkurven wurden systolische und diastolische Blutdruckwerte ermittelt. Während des gesamten Perfusionsversuches wurden die Einstellungen des Perfusionssystems adjustiert, um die Drücke konstant zu halten: Der Druck im rechten Vorhof wurde durch die hydrostatische Höhe des Reservoirs reguliert, der Mitteldruck in der Aorta konnte durch das Widerstandssystem beeinflusst werden und der Druck im pulmonalen System durch die Rotationsgeschwindigkeit der Pumpe.

- Temperatur:

Das Reservoir und der Oxygenator wurden auf 38°C aufgeheizt, um eine mittlere Temperatur des Herzens von 37°C zu gewährleisten. Die epikardiale Temperatur wurde mithilfe eines Infrarotthermometers (Votcraft VC110) gemessen.

- Blutgase und Elektrolyte:

Während des gesamten Perfusionsversuches wurden Blutgasanalysen des Spenderblutes durchgeführt. Zu Beginn erfolgten Analysen des venösen Blutes, direkt nach Entnahme vom Spender, und anschließend in regelmäßigen Abständen nach Einbringen in das Perfusionssystem, des arteriellen und koronarvenösen Blutes.

So war es möglich pO₂, pCO₂, pH und BE des Perfusates während des gesamten Zeitraumes durch Veränderung des O₂ und CO₂ Gasflusses durch den Oxygenator sowie durch Substitution von Natriumhydrogencarbonat konstant zu halten. Des Weiteren wurden bei Bedarf Calciumgluconat und Glucose substituiert. Der Zielwerte betragen: pO₂ 150 mmHg, CO₂ 38 mmHg, pH 7,4, BE 0, Glukose 140 mg/dl, Ca⁺⁺ 1,1 mmol/l

4.1.9 Kontrollen

In einem zeitlichen Abstand von mindestens einem Monat wurden Kontrollen zu allen Perfusionsversuchen durchgeführt. Für diese wurde von denselben Blutspendern, die für die Perfusionsversuche herangezogen wurden, nochmals 500 ml Blut abgenommen. Das Blut wurde anschließend wie für die oben beschriebenen Perfusionsversuche antikoaguliert, verdünnt und in ein Zirkulationssystem eingefüllt. In den Kontrollversuchen befand sich im Unterschied zur Untersuchungsgruppe jedoch kein Herz im Zirkulationssystem.

Entsprechend des oben beschriebenen Versuchsaufbaus wurde das Blut für einen Zeitraum von 180 Minuten durch die gleichen oben beschriebenen Komponenten, wie Oxygenator, Filter und Widerstandssystem, mittels Zentrifugalpumpe zirkuliert. Für Perfusionsexperimente und Kontrollen konnte so ein vergleichbarer Kontakt zwischen Blut und den Fremdoberflächen des Perfusionssystems mit vergleichbaren Kontaktzeiten erreicht werden.

4.1.10 Messzeitpunkte im Versuchsverlauf

Die Blutgasanalysen während des Perfusionsversuches wurden in regelmäßigen Abständen durchgeführt. Die zellbiologische Untersuchung des Blutes erfolgte unmittelbar nach Abnahme vom Spender (T0) und nach 180 Minuten ex-vivo Perfusion des Herzens(T1). In den Kontrollen war der Zeitpunkt (T1) nach 180 Minuten ex-vivo Zirkulation des Blutes ohne Herzperfusion festgelegt.

4.2 Zellbiologische Methoden

4.2.1 Isolation mononukleärer Zellen aus humanem Vollblut

Durch Ficoll-Dichtegradientenzentrifugation wurden mononukleäre Zellen (Mono- und Lymphozyten) aus venösem heparinisiertem Vollblut der Blutspender zum Zeitpunkt T0 und T1 des Perfusionsversuches und der Kontrolle gewonnen. Hierzu wurden 3 ml Ficoll-Lösung (Histopaque®) in einem 13ml-Reagenzröhrchen vorgelegt und mit 3 ml Vollblut überschichtet.

Nach anschließender fünfzehnminütiger Zentrifugation bei Raumtemperatur und bei 3000 rpm waren aufgrund der unterschiedlichen Dichteverhältnisse der Zellbestandteile und Lösungen mehrere Phasen erkennbar. Die mononukleären Zellen waren hierbei zahlreich in der weißen Interphase, zwischen der obersten Schicht aus Plasma und Thrombozyten und der darunter befindlichen Ficoll-Schicht, zu finden. Am Boden des Röhrchens setzten sich die Erythrozyten und Granulozyten als rote Phase ab.

Die weiße Interphase wurde vorsichtig abpipettiert und in ein neues Reagenzröhrchen überführt. Schließlich wurden die mononukleären Zellen zweimal gewaschen, indem die Röhrchen mit der Interphase mit HBSS-Lösung aufgefüllt und bei Raumtemperatur für fünf Minuten bei 2000 rpm zentrifugiert wurden. Die mononukleären Zellen waren nach Zentrifugation als Zellpellet am Boden des Röhrchens erkennbar. Der Überstand wurde bis auf 1ml verworfen und das Pellet darin resuspendiert. Schlussendlich konnte die Zellzahl und Zellviabilität bestimmt werden.

4.2.2 Bestimmung der Zellzahl und der Zellviabilität

Am Vi-Cell™ XR Cell Viability Analyzer war es möglich die Zellzahl durch ein integriertes elektronisches Zählgerät und die Zellviabilität mittels einer Trypanblaufärbung zu bestimmen. Tote und beschädigte Zellen färben wegen der

aufgehobenen Integrität der Zellmembran blau, während die lebenden Zellen ungefärbt erscheinen. So ermittelt das Gerät das prozentuale Verhältnis von ungefärbten vitalen Zellen zur Gesamtzahl der Zellen. Dies entspricht der Zellviabilität. Hierfür wurden in einem ViCell™ Analysengefäß 480 μ l HBSS mit 20 μ l Zellsuspension vermennt und durch das Gerät zur Analyse aufgenommen.

4.2.3 Magnetische Pan-T-Zell-Separation

Nach Bestimmung der Zellzahl konnten mit dem MACS® Pan T Cell Isolation Kit II Pan T-Zellen (primäre humane CD3⁺/CD28⁺ T-Lymphozyten) durch Negativselektion aus mononukleären Zellen isoliert werden. Bei der Negativselektion wurden B-Zellen, NK-Zellen, Monozyten, Granulozyten, dendritische Zellen und möglicherweise verbliebene Erythrozyten über spezifische Oberflächenproteine an Antikörper (anti-CD14, anti-CD16, anti-CD19, anti-CD36, anti-CD56, anti-CD123 und anti-Glycophorin A) gebunden und ferromagnetisch aussortiert.

Zunächst wurden dafür die mononukleären Zellen erneut mit HBSS für fünf Minuten bei 1200 rpm zentrifugiert und der Überstand verworfen. Das Zellpellet wurde in Puffer A (4 μ l/10⁶ Zellen) resuspendiert und ein Biotin-gebundenes Antikörper-Gemisch (1 μ l / 10⁶) hinzugegeben. Die Zellsuspension wurde vorsichtig vermennt und für zehn Minuten bei 4°C inkubiert. Anschließend wurde erneut Puffer A (3 μ l / 10⁶ Zellen) und ein ferromagnetisches Anti-Biotin-Microbeads-Gemisch (2 μ l / 10⁶ Zellen) hinzugegeben. Nach vorsichtigem Mischen wurde die Lösung für fünfzehn Minuten bei 4°C inkubiert.

Um überschüssige MicroBeads zu entfernen, wurde die Zellsuspension anschließend nochmals mit Puffer A gewaschen. Dafür wurde das Reagenzröhrchen mit der Zellsuspension mit dem zehn- bis zwanzigfachen Volumen an Puffer A aufgefüllt und mit 1200 rpm für fünf Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde abgesaugt und das Zellpellet in 1000 μ l Puffer A gelöst.

Zur Vorbereitung der Zellseparation wurde jeweils eine MACS® Separation LS Säule pro 10⁷ Zellen in das Magnetfeld des Quadro MACS® Separator eingebracht und mit 3 ml Puffer A gespült. Schließlich wurde die Zellsuspension auf die Säulen gegeben und mit 3 ml Puffer A nachgespült. Nach oben beschriebener Negativselektion wurden die ferromagnetisch markierten Zellen durch das magnetische Feld an die Säulen gebunden und die gewünschten Pan-T-Zellen isoliert und in einem Reagenzröhrchen aufgefangen. Der Waschvorgang mit Puffer A wurde noch zweimal wiederholt, um möglichst viele T-

Lymphozyten zu erhalten. Das gesammelte Effluat wurde schließlich fünf Minuten bei 1200 rpm zentrifugiert und der Überstand auf 1 ml abgesaugt und die Zellzahl und Zellviabilität bestimmt.

Die Hälfte der Zellen wurde zur späteren RNA-Isolation in mirVana Zell-Lysepuffer gelöst. Dafür wurden je 3×10^6 T-Zellen in ein steriles 2 ml Eppendorf Reagenzröhrchen überführt und drei Minuten bei 2000 rpm zentrifugiert. Das Zellpellet wurde anschließend in 300 μ l mirVana Lysepuffer gelöst.

Der Rest der isolierten T-Zellen wurde in RPMI1640-Medium mit 10 % DMSO gelöst (3×10^6 Zellen pro 1 ml Medium) und für spätere Versuche kryokonserviert.

4.3 Molekularbiologische Methoden

4.3.1 RNA-Extraktion

Um später neben der mRNA-Expression auch die microRNA-Expression in den nach dem Perfusionsversuch isolierten T-Zellen quantifizieren zu können, wurde Gesamt-RNA mit dem mirVana™ miRNA Isolation Kit nach Herstellerprotokoll extrahiert. Nach Denaturierung der Zellen in mirVana™-Lysepuffer wurden diese nach Protokoll weiter bearbeitet und das RNA-haltige Lysat unter Zugabe von Acid-Phenol/Chloroform isoliert. Durch Zugabe von 100 %-igem Ethanol konnte die Gesamt-RNA anschließend an einen mirVana™-Glasfaser-Filter gebunden und mit drei Waschschritten mit mirVana™-Puffern nach Protokoll aufgereinigt werden. Schließlich wurde die extrahierte Gesamt-RNA mit 30 μ l auf 95°C erhitztem Nuklease-freiem Wasser eluiert.

Nach erfolgreicher RNA-Extraktion wurde ein DNase-Verdau durchgeführt, um die RNA von sämtlichen noch enthaltenen DNA-Resten zu befreien. Hierfür wurde den RNA-Proben jeweils 3 μ l 10 x DNase Puffer und 1 μ l TURBO-DNase beigemischt und die Proben dann für 30 Minuten bei 37°C inkubiert. Die DNase wurde durch Zugabe von 3 μ l DNase Inactivation Reagent wieder inaktiviert und die Proben nach sorgfältigem Mischen für zwei Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Schließlich wurden die Proben für 90 Sekunden bei 10 000 rpm zentrifugiert und der die RNA enthaltende Überstand in ein steriles 0,5 ml Eppendorf-Reagenzröhrchen überführt.

Die RNA-Konzentration (ng/ μ l) wurde am Nano Drop 2000-Spectrophotometer gemessen.

4.3.2 RNA-Amplifikation

Um später für die Quantifizierung der mRNA-Expression genug cDNA zu erhalten, musste die isolierte RNA zunächst amplifiziert werden. Dies geschah unter Verwendung des TargetAmp 1-Round aRNA Amplification Kit 103 nach Herstellerprotokoll, einer Weiterentwicklung des Prinzips von Eberwine [80]. Die Amplifikation erfolgte in mehreren Inkubationsschritten im Thermocycler und es entstand zur isolierten mRNA komplementäre aRNA.

In einem ersten Schritt wurde die in der Gesamt-RNA enthaltene Poly(A)-RNA in eine Erststrang-cDNA revers transkribiert. Hierfür wurde folgender Reaktionsansatz benötigt:

RNA-Probe	2 μ l
T7-Oligo(dT) Primer A	1 μ l
Reverse Transkription PreMix-SS	1,5 μ l
DTT	0,25 μ l
Super Script III Reverse Transcriptase (20U/ μ l)	0,25 μ l

Zunächst wurde zu der RNA-Probe der T7-Oligo(dT) Primer A hinzugefügt, der neben dem Oligo(dT)-Primer auch den T7 RNA Polymerase Promoter an seinem 5'-Ende enthielt und die Probe für fünf Minuten bei 65°C im Thermocycler inkubiert. Die Probe wurde für eine Minute auf Eis gelagert und kurz anzentrifugiert. Dann wurden die restlichen Reagenzien und die Super Script III Reverse Transkriptase hinzugegeben und für 30 Minuten bei 50°C inkubiert.

In einem zweiten Schritt erfolgte, mit untenstehendem Reaktionsansatz, die cDNA-Zweitstrangsynthese.

DNA-Polymerase PreMix-SS1	4,5 μ l
DNA-Polymerase SS1	0,5 μ l

Die Reagenzien wurden der Probe beigemischt und zunächst für zehn Minuten bei 65°C inkubiert. Nach kurzer Zentrifugation wurde die Probe für drei Minuten bei 80°C inkubiert, nochmals kurz anzentrifugiert und schließlich auf Eis gestellt.

Der ursprüngliche RNA-Strang wurde dabei durch die im DNA-Polymerase PreMix SS1 enthaltene RNase H abgebaut und der cDNA-Zweitstrang durch die DNA-Polymerase SS1 synthetisiert.

Die so entstandene doppelsträngige cDNA wurde in einem letzten Schritt, der In-vitro-Transkription, mit folgendem Reaktionsansatz transkribiert und somit die Ausgangs-RNA amplifiziert:

RNase-freies Wasser	13,6 µl
T7 Transcription buffer	4,0 µl
DTT	4,0 µl
ATP	3,6 µl
CTP	3,6 µl
GTP	3,6 µl
UTP	3,6 µl
T7 RNA-Polymerase	4,0 µl

Nach Zugabe aller Reagenzien und der T7 RNA-Polymerase wird die Probe für exakt vier Stunden bei 42°C im Thermocycler inkubiert.

Aufgrund der Lage des T7 RNA Polymerase Promoters in der cDNA entsteht während dieser In-vitro-Transkription zur Ausgangs-RNA revers komplementäre antisense-RNA (aRNA).

Anschließend wurde durch Zugabe von 2,0 µl DNase und anschließender Inkubation für 15 Minuten bei 37°C, ein DNase-Verdau durchgeführt, um die aRNA von sämtlichen in der Probe enthaltenen cDNA-Bestandteilen zu befreien.

Mittels des Qiagen RNeasy Mini Kits wurde die aRNA nach Herstellerprotokoll noch weiter aufgereinigt. Dafür wurde zunächst die aRNA-Probe (52 µl) mit 48 µl Nuklease-freiem Wasser verdünnt und folgende Lösungen hergestellt:

RLT-β-ME-Solution	1000 µl Buffer RLT 10 µl β-Mercaptoethanol
80 % -Ethanol	16 ml 100 % -Ethanol 4 ml Nuklease-freies Wasser
RPE Solution	11 ml Buffer RPE 44ml 100 % Ethanol

Zu den 100 μl aRNA-Lösung wurden 350 μl RLT- β -ME-Solution und 250 μl 100% - Ethanol hinzugegeben und das Gemisch auf einen RNeasy-Filter pipettiert. Durch das 100 % -Ethanol war eine gute Bindung der aRNA an die Membran des Filters möglich. So konnte die aRNA durch mehrere Waschschrte nach Protokoll unter Zugabe von 650 μl RPE-Solution und später 80 % -Ethanol aufgereinigt und schlussendlich mit 30 μl Nuklease-freiem Wasser eluiert werden.

Die Konzentration der aRNA (ng/ μl) wurde am Nano Drop 2000-Spectrophotometer gemessen.

4.3.3 cDNA-Synthese

Durch Reverse Transkription wurde die aRNA, unter Verwendung des SuperScript III Reverse Transcriptase Kits, in komplementäre cDNA, wenn möglich mit einer Konzentration von 50 ng/ μl , umgeschrieben. Dafür wurden zunächst Verdünnungen der aRNA mit Nuklease-freiem Wasser hergestellt, so dass in 10 μl Verdünnung möglichst 1000 ng aRNA, jedoch mindestens 500 ng aRNA, enthalten waren. Die Umschrift erfolgte dabei nach Herstellerangaben in zwei Inkubationsschritten in einem Thermocycler und die Reaktionsansätze setzten sich aus folgenden Bestandteilen zusammen:

Reaktionsansatz 1

Verdünnung der aRNA (500 – 1000 ng)	10 μl
Random Hexamer Primer (50 ng/ μl)	2 μl
dNTP-Mix (10 mM)	1 μl

Die Mischung aus aRNA, Random Hexamer Primer und dNTPs wurde für fünf Minuten bei 65°C inkubiert und anschließend für eine Minute auf Eis gestellt.

Reaktionsansatz 2

5x First-Strand-Buffer	4 μl
0.1 M DTT	1 μl
RNaseOUT Recombinant Ribonuclease Inhibitor (40 U/ μl)	1 μl
Superscript III Reverse Transkriptase (20 U/ μl)	1 μl

Nach Zugabe des Reaktionsansatzes 2 wurden die Proben in drei Zyklen erneut im

Thermocycler inkubiert. Zunächst für fünf Minuten bei 25°C, dann für 45 Minuten bei 50°C und schließlich für 15 Minuten bei 70°C. Die fertig synthetisierte cDNA wurde für die späteren Versuche bei -80°C weggefroren.

Die Konzentration der cDNA (ng/μl) wurde am Nano Drop 2000-Spectrophotometer gemessen.

4.4 Real-time quantitative PCR (RT-qPCR)

Die real-time quantitative PCR ist eine Methode, die neben der Amplifikation von Nukleinsäuren ihre absolute und relative Quantifizierung in Echtzeit ermöglicht. Die Quantifizierung erfolgt durch Messung von Fluoreszenzsignalen. Diese wird dabei immer in der exponentiellen Phase der PCR am Crossing-Point (Cp-Wert) bzw. Cycle-Threshold (Ct-Wert) durchgeführt, also in dem Zyklus, in dem das Fluoreszenzsignal erstmals größer als die Hintergrundfluoreszenz ist. Da das PCR-Produkt mit der Fluoreszenz proportional zunimmt wird eine Quantifizierung möglich.

Die Versuche zur Quantifizierung der mRNA- und miRNA-Expression erfolgten in Doppelbestimmung am Light Cycler® 480. Die relative Expression wurde dabei jeweils auf ein Referenzgen als Kontrolle normalisiert und schließlich mit der Light Cycler® 480 Relative Quantification Software effizienzkorrigiert errechnet.

4.4.1 Quantifizierung der mRNA-Expression

Die relative Quantifizierung der mRNA-Expression der Zielgene FoxP3, GZMβ, ICOS, IFN-γ, IL-2, IL-4, IL-8, IL-10, OX40, PD1, PRF1, TGFβ, TIM3, und TNFα und der Referenzgene TBP und SDHA erfolgte in Doppelbestimmung unter Verwendung von UPL-Sonden (Universal Probes Library Sonden) und sequenzspezifischen Primern durch real-time qPCR.

Für die Entstehung des Fluoreszenzsignals sind hierbei die UPL-Sonden von besonderer Bedeutung, die sich dabei des Fluoreszenz-Resonanzenergie-Transfers (FRET) bedienen. Am 3'-Ende der Sonde ist ein Dark-Quencher gebunden während das 5'-Ende mit Fluorescein markiert ist. Dabei stellt der Dark-Quencher eine Art Löschesubstanz dar, die in der Lage ist die Energie von benachbarten Molekülen zu übernehmen und so die Fluoreszenz des Moleküls zu inhibieren. Ist die UPL-Sonde intakt, so verhindert der Dark-Quencher die Emission des Fluorescein-Lichtsignals. Während der real-time qPCR

bindet neben den Primern auch die UPL-Sonde an den cDNA-Strang und wird durch die Exonuklease-Aktivität der Taq-Polymerase gespalten. So werden das Fluorescein und der Dark-Quencher während der qPCR voneinander getrennt und es wird eine erhöhte Lichtemission des Fluorescein-Moleküls messbar.

Um die T-Lymphozyten-cDNA amplifizieren zu können musste sie abhängig von ihrer ursprünglichen Konzentration zunächst mit Nuklease-freiem Wasser verdünnt werden, so dass die Verdünnung eine Konzentration von 2 ng/μl hatte. So konnten anschließend für die quantitative real-time PCR 10 ng cDNA pro Well eingesetzt werden. Hierfür war folgender Reaktionsansatz nötig:

cDNA-Verdünnung (2 ng/μl)	5,0 μl
Nuklease-freies Wasser	4,4 μl
Primer forward	0,2 μl
Primer reverse	0,2 μl
UPL-Sonde	0,2 μl
Light Cycler® 480 Probes Master	10 μl

Die Quantifizierung der mRNA-Expression des Zielgens Interleukin-8 wurde nicht mit oben dargestelltem Reaktionsansatz durchgeführt, sondern mit dem Real Time Ready Single Assay IL-8 (Assay 103136). Dafür wurden den 5 μl cDNA-Verdünnung 4 μl Nuklease-freies Wasser, 1 μl des Single Assays und 10 μl Light Cycler® 480 Probes Master beigemischt.

Die jeweiligen Reaktionsansätze wurden in Doppelbestimmung auf 96-Well Light Cycler® 480 Multiwell Platten pipettiert und die Platte mit einer Light Cycler® 480 Sealing Foil verschlossen. Anschließend wurden die Reaktionsansätze nach Enzymaktivierung durch zehn Minuten Erhitzen auf 95°C im Light Cycler® 480 in 50 Zyklen amplifiziert. Dies geschah unter folgenden Bedingungen:

95°C	10 Sekunden	Denaturierung
60°C	30 Sekunden	Annealing
72°C	1 Sekunde	Elongation

4.4.2 Quantifizierung der microRNA-Expression

Die Quantifizierung der microRNA-Expression (miR-16, miR-31, miR-93, miR-150, miR-155, miR-223) erfolgte unter Verwendung des TaqMan® microRNA Assays und der U47-Referenz-RNA in Doppelbestimmung durch real-time qPCR.

Die hierfür verwendeten TaqMan®-MGB-Sonden arbeiten wie die UPL-Sonden ebenfalls nach dem FRET-Prinzip. Zusätzlich zu der Fluorescein-Markierung am 5'-Ende der Sonde und dem Quencher am 3'-Ende ist am 3'-Ende ein Minor Groove Binder (MGB) gebunden, der die Sonde nach Binden an den cDNA Strang noch zusätzlich am Strang stabilisiert. Somit wird das Verwenden kürzerer Sondensequenzen möglich. Durch ihre Exonuklease-Aktivität spaltet die Taq-Polymerase die Sonde während der real-time PCR und das Fluoreszenzsignal wird messbar.

Zunächst musste für die Quantifizierung der microRNA-Expression eine Umschrift der mittels des mirVana™ miRNA Isolation Kits isolierten Gesamt-RNA in cDNA erfolgen. Hierfür wurde unter Verwendung des TaqMan® MicroRNA Reverse Transkription Kits die Gesamt-RNA gemeinsam mit der U47-Referenz-RNA nach Herstellerprotokoll revers transkribiert. Hierfür wurde die Gesamt-RNA anhängig von ihrer ursprünglichen Konzentration mit Nuklease-freiem Wasser so verdünnt, dass sie eine Konzentration von 2 ng / µl hatte. Für die cDNA-Umschrift wurde schließlich folgender Reaktionsansatz gebraucht:

Gesamt-RNA-Verdünnung	3,0 µl
dNTP's (mM)	0,09 µl
MultiScribe™ Reverse Transcriptase (50 U/µl)	0,6 µl
10x Reverse Transcriptase Buffer	0,9 µl
RNase Inhibitor (20 U/µl)	0,114 µl
Nukleasefreies Wasser	0,696 µl
RT-Primer für die jeweilige microRNA	1,8 µl
RT-Primer für U47	1,8 µl

Nach fünfminütiger Inkubation auf Eis wurde die RNA in drei Schritten im Thermocycler zu komplementärer cDNA revers transkribiert:

16°C	30 Minuten
42°C	30 Minuten
85°C	5 Minuten

Die fertigen cDNA-Proben wurden anschließend auf Eis gestellt.

Für die anschließende Quantifizierung der microRNA-Expression durch real-time qPCR wurden zunächst 9 µl der cDNA mit 24,8 µl Nuklease-freiem Wasser verdünnt. Anschließend erfolgte die Amplifikation der cDNA mithilfe des nachfolgenden Reaktionsansatzes:

cDNA-Verdünnung	5,0 µl
TaqMan® MicroRNA Assay der jeweiligen zu quantifizierenden microRNA bzw. der U47-Referenz-RNA	1,0 µl
LightCycler® 480 Probes Master	10,0 µl
Nuklease-freies Wasser	4,0 µl

Die jeweiligen Reaktionsansätze (20 µl) wurden in Doppelbestimmung auf 96-Well Light Cycler® 480 Multiwell Platten pipettiert und die Platte mit einer Light Cycler® 480 Sealing Foil verschlossen. Die Platte wurde bei Raumtemperatur und 3000 rpm für zwei Minuten zentrifugiert. Anschließend wurden die Reaktionsansätze im Light Cycler® 480, nach Enzymaktivierung durch zehn Minuten Erhitzen auf 95°C, in 50 Zyklen unter folgenden Bedingungen amplifiziert:

95°C	15 Sekunden	Denaturierung
60°C	60 Sekunden	Annealing/Elongation

4.5. Durchflusszytometrie

Mit Hilfe der Durchflusszytometrie können einzelne Zellen anhand von Oberflächenantigenen und Eigenschaften, wie ihrer Größe und ihrer Granularität untersucht und differenziert werden. Dabei dient eine Antigen-Antikörper-Reaktion mit Fluoreszenzfarbstoff-markierten Antikörpern als Grundlage. Die mit den Antikörpern markierten Zellen werden an einem gebündelten Laserstrahl vorbeigeleitet und dabei beleuchtet und optisch angeregt. Hierbei entstehen zellspezifisch Streu- und Fluoreszenzlichter, die durch einen Photodetektor aufgenommen und in elektrische

Signale umgewandelt werden. Das Vorwärtsstreulicht, auch als forward scatter bzw. FSC bezeichnet, wird axial zum Laserstrahl von den Zellen gestreut und dient dabei als Maß für die Größe der Zellen. Mit einem Ablenkungswinkel von 90° gestreutes Licht wird hingegen als Seitwärtsstreulicht oder auch als sideward scatter bzw. SSC bezeichnet und gilt als Maß für die Zellgranularität und Oberflächenbeschaffenheit der Zellen. Zusätzlich wird die Fluoreszenz der an die Zellen gebundenen Antikörper gemessen. Diese verhält sich proportional zur Anzahl der zellgebundenen Fluoreszenzfarbstoff-markierten Antikörper und macht hiermit quantitative Aussagen möglich.

Da sich die Spektren der Fluoreszenzfarbstoffe teilweise überlappen, kann es zu falsch positiven Messungen kommen. Dies wird mit Hilfe sogenannter Kompensationsbeads korrigiert. Hierfür werden im Vorfeld Einzelfärbungen der Farbstoffe angefertigt und ein durch die Detektoren registriertes Überstrahlen in den Fluoreszenzbereich anderer Farbstoffe berechnet und kompensiert.

Um die zuvor immunomagnetisch negativselektierten T-Zellen auf die Oberflächenantigene CD4, CD8, CD25, CD69, CD134, CD137 und CD154 zu untersuchen, wurden die T-Zellen mit dem BD™ LSR II Flow Cytometer durchflusszytometrisch untersucht. Hierfür wurden zunächst die T-Zellen erneut mit PBS gewaschen und bei 1500 rpm vier Minuten zentrifugiert. Anschließend wurden je $0,2 \times 10^6$ Zellen auf drei verschiedene Tubes verteilt. Dabei wurden den T-Zellen in den einzelnen Tubes wie folgt Blue Dye und Fluoreszenzfarbstoff-markierte Antikörper beigemischt:

Unstained	----
Allstained 1	Blue Dye, CD4- APC, CD8-Alexa Fluor 700, CD25 Percp- Cy 5.5, CD69- FITC, CD154 PE
Allstained 2	Blue Dye, CD4-APC, CD8-AF 700, CD134-FITC, CD137- PE

Zunächst erfolgte die Anfärbung mit Blue Dye, die die Differenzierung zwischen lebenden und toten Zellen ermöglicht. Hierfür wurden 1 µl Blue Dye in 50 µl PBS gemischt und 10 µl der Mischung pro $0,2 \times 10^6$ Zellen in die Tubes beigemischt. Nach einer Inkubation für 30 Minuten im Dunkeln bei Raumtemperatur wurden die Zellen mit PBS gewaschen, bei 1500 rpm vier Minuten zentrifugiert und der Überstand verworfen.

Anschließend wurden die Antikörper wie oben beschrieben in folgenden Konzentrationen den drei Tubes beigemischt und 30 Minuten bei 4°C inkubiert:

CD4 APC	4 µl
CD8- Alexa Fluor 700	1 µl
CD25 PerCp-Cy5.5	1 µl
CD69 FITC	4 µl
CD154 PE	4 µl
CD134 FITC	4 µl
CD137 PE	4 µl

Durch die ungefärbte Probe (unstained) konnten die Detektoren auf die Eigenfluoreszenz der T-Zellen eingestellt werden. Da die zu quantifizierenden Oberflächenantigene teilweise nur schwach exprimiert werden, wurden zusätzlich FMO-Kontrollen (Fluoreszenz Minus One) angefertigt, in denen jeweils genau der durchflusszytometrisch zu quantifizierende Antikörper fehlte. Somit konnten schwach gefärbte Zellen und negative Zellen besser differenziert werden und die Marker besser getaget werden.

Abschließend wurden die Proben erneut mit PBS gewaschen, bei 1500 rpm vier Minuten zentrifugiert, der Überstand verworfen und die angefärbten Zellen in 100µl PBS resuspendiert. Die durchflusszytometrische Messung erfolgte an dem BD™ LSR II Flow Cytometer mit dem Programm BD™ Diva. Je nach Absorptions- und Emissionsmaximum der Fluorochrome wurden die Fluoreszenzfarbstoff-markierten Antikörper durch unterschiedliche Laser erfasst:

Tabelle 3: Absorptions- und Emissionsmaximum der Fluorochrome

Fluorochrom	Absorptionsmaximum	Emissionsmaximum	Laser
APC	650 nm	660 nm	Roter Laser (640nm)
Alexa Fluor 700	696 nm	719 nm	Roter Laser (640nm)
PE	496 nm	578 nm	Blauer Laser (488nm)
PerCP-Cy 5.5	482 nm	695 nm	Blauer Laser (488nm)
FITC	494 nm	520 nm	Blauer Laser (488nm)

Die durchflusszytometrischen Messwerte wurden mithilfe des Programmes FlowJo ausgewertet. Hierbei wurden zunächst die Daten kompensiert und durch die Blue Dye Färbung die lebenden Zellen von den toten Zellen unterschieden. Anschließend konnten spezifische Zellpopulationen eingegrenzt und die jeweiligen Oberflächenantigene quantifiziert werden.

4.6 Statistische Auswertung

Die statistische Auswertung sämtlicher im Rahmen der vorliegenden Arbeit erhobenen Daten erfolgte mit Hilfe des Programms SigmaPlot 11.0.

Alle Versuche wurden mindestens in Duplikaten durchgeführt und die Ergebnisse, soweit nicht anders angegeben als Mittelwerte \pm Standardabweichung (SD) angeführt.

Für die rechnerische Auswertung und graphische Darstellung wurde die Expression des jeweils untersuchten Targets zum Zeitpunkt T1 in Relation zum Zeitpunkt T0 gestellt. Es wurde also ermittelt, inwiefern sich die Expression des Targets zu dem Zeitpunkt T1 im Vergleich zu der Expression zu dem Zeitpunkt T0 verändert hat. Das Ergebnis wurde schließlich mit der Kontrolle verglichen, um festzustellen, ob ein signifikanter Unterschied besteht.

Zunächst erfolgte unter Verwendung des Shapiro-Wilk-Tests die Überprüfung auf Normalverteilung der Mittelwerte. Waren die Mittelwerte normalverteilt, so wurde die statistische Signifikanz mit Hilfe des Student's t-test für verbundene Stichproben überprüft. Um statistisch signifikante Unterschiede bei nicht normalverteilten Werten zu evaluieren, wurde der Wilcoxon-Signed-Rank-Test für verbundene Stichproben angewandt. Das Signifikanzniveau wurde in allen Fällen als $p < 0,05$ festgelegt.

5 ERGEBNISSE

5.1 Expressionsmuster verschiedener Oberflächenantigene auf primären humanen T-Zellen im kardialen Xenotransplantationsmodell

Pan T-Zellen (primäre humane $CD3^+/CD28^+$ T-Lymphozyten) wurden durch Negativselektion mit dem MACS® Pan T Cell Isolation Kit II aus venösem Vollblut gesunder männlicher Probanden zum Zeitpunkt T0 (direkt nach Blutentnahme vom Spender) und jeweils zum Zeitpunkt T1 (180 Minuten nach Perfusionsbeginn) während des Perfusionsversuches mit Herz und des Kontrollversuches ohne Herz isoliert und die Viabilität der Zellen durch Blue Dye Färbung durchflusszytometrisch bestimmt.

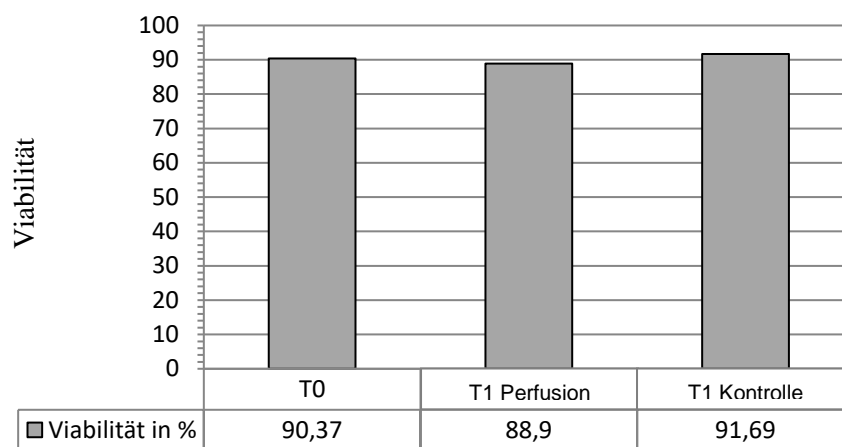


Abbildung 4: Durchflusszytometrische Bestimmung der Viabilität von Pan T-Zellen

Primäre humane $CD3^+/CD28^+$ T-Lymphozyten wurden durch MACS®-Negativselektion aus dem Blut gesunder männlicher Probanden ($n=7$) zum Zeitpunkt T0 (direkt nach Blutentnahme vom Spender) und jeweils zum Zeitpunkt T1 (nach 180 Minuten Perfusion) während des Perfusionsversuches mit Herz und der Kontrolle ohne Herz isoliert. Die Viabilität wurde durch Blue Dye Färbung durchflusszytometrisch bestimmt. Dabei zeigte sich eine durchschnittliche Viabilität der Zellen zum Zeitpunkt T0 von 90,37 %, zum Zeitpunkt T1 während des Perfusionsversuches mit Schweineherz von 88,90 % und zum Zeitpunkt T1 während des Kontrollversuches ohne Schweineherz von 91,69 %.

Innerhalb der nachweislich lebenden Zellen konnten anschließend verschiedene Zellpopulationen eingegrenzt und die zu untersuchenden Oberflächenantigene quantifiziert werden. Dabei wurde zwischen $CD4^+$ T-Zellen und $CD8^+$ T-Zellen unterschieden, die die untersuchten Oberflächenantigene exprimieren. Es wurde die Expression der T-Zell-spezifischen Aktivierungsmarker CD25, CD69, CD134, CD137 und CD154 bestimmt.

Tabelle 4: Relative Expression der Oberflächenantigene auf CD4+ T-Lymphozyten zum Zeitpunkt T1

(auf den Zeitpunkt T0 normalisierter Mittelwert \pm SD, n=7)

Antigen	Zeitpunkt T1 Perfusion	Zeitpunkt T1 Kontrolle
CD 25	0,85 \pm 0,18	0,85 \pm 0,14
CD 69	4,53 \pm 1,52	4,00 \pm 2,06
CD 134	1,19 \pm 0,70	1,19 \pm 0,41
CD 137	1,97 \pm 2,76	1,31 \pm 0,65
CD 154	0,95 \pm 0,30	0,91 \pm 0,30

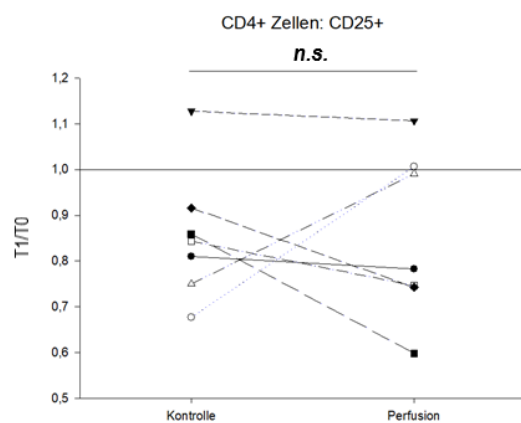
Tabelle 5: Relative Expression der Oberflächenantigene auf CD8+ T-Lymphozyten zum Zeitpunkt T1

(auf den Zeitpunkt T0 normalisierter Mittelwert \pm SD, n=7)

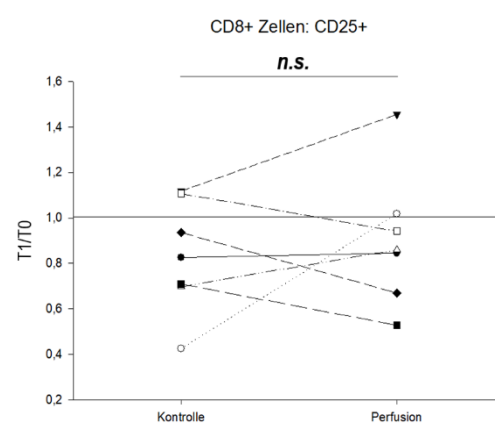
Antigen	Zeitpunkt T1 Perfusion	Zeitpunkt T1 Kontrolle
CD 25	0,90 \pm 0,29	0,83 \pm 0,25
CD 69	2,50 \pm 0,93	1,79 \pm 0,91
CD 134	1,40 \pm 1,17	1,12 \pm 0,39
CD 137	3,42 \pm 5,12	2,14 \pm 1,49
CD 154	1,05 \pm 0,33	0,87 \pm 0,30

Die Expression der T-Zell-spezifischen Oberflächenantigene zum Zeitpunkt T1 während des Perfusionsversuches mit Herz und zum Zeitpunkt T1 während des Kontrollversuches ohne Herz wurden auf den Zeitpunkt T0 normalisiert. Somit konnte eine Veränderung der Expression der Aktivierungsmarker im Laufe der Perfusion mit Herz und der Kontrolle ohne Herz bestimmt werden (siehe Abbildung 5).

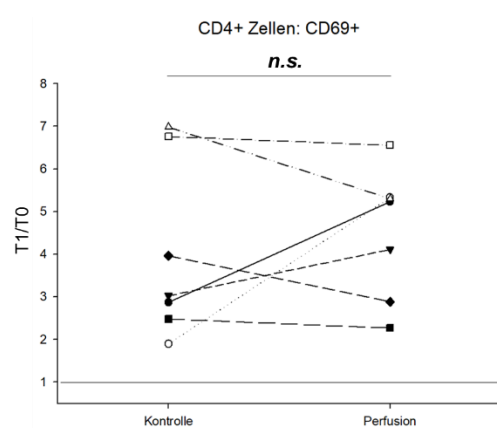
A)



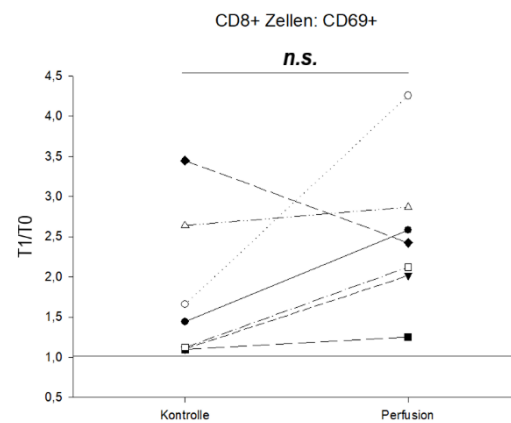
B)



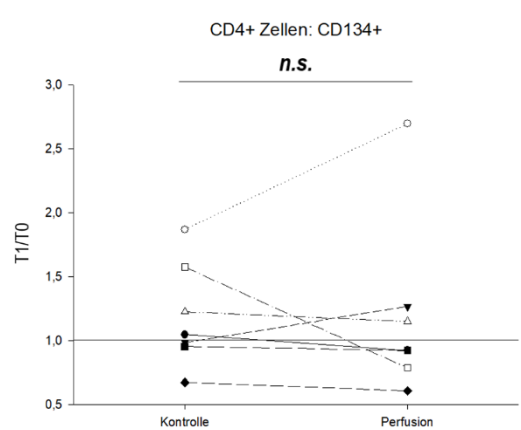
C)



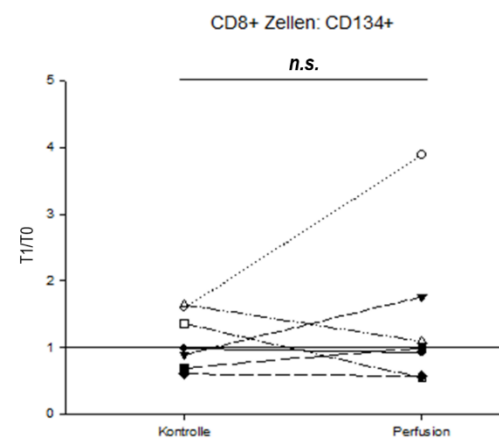
D)



E)



F)



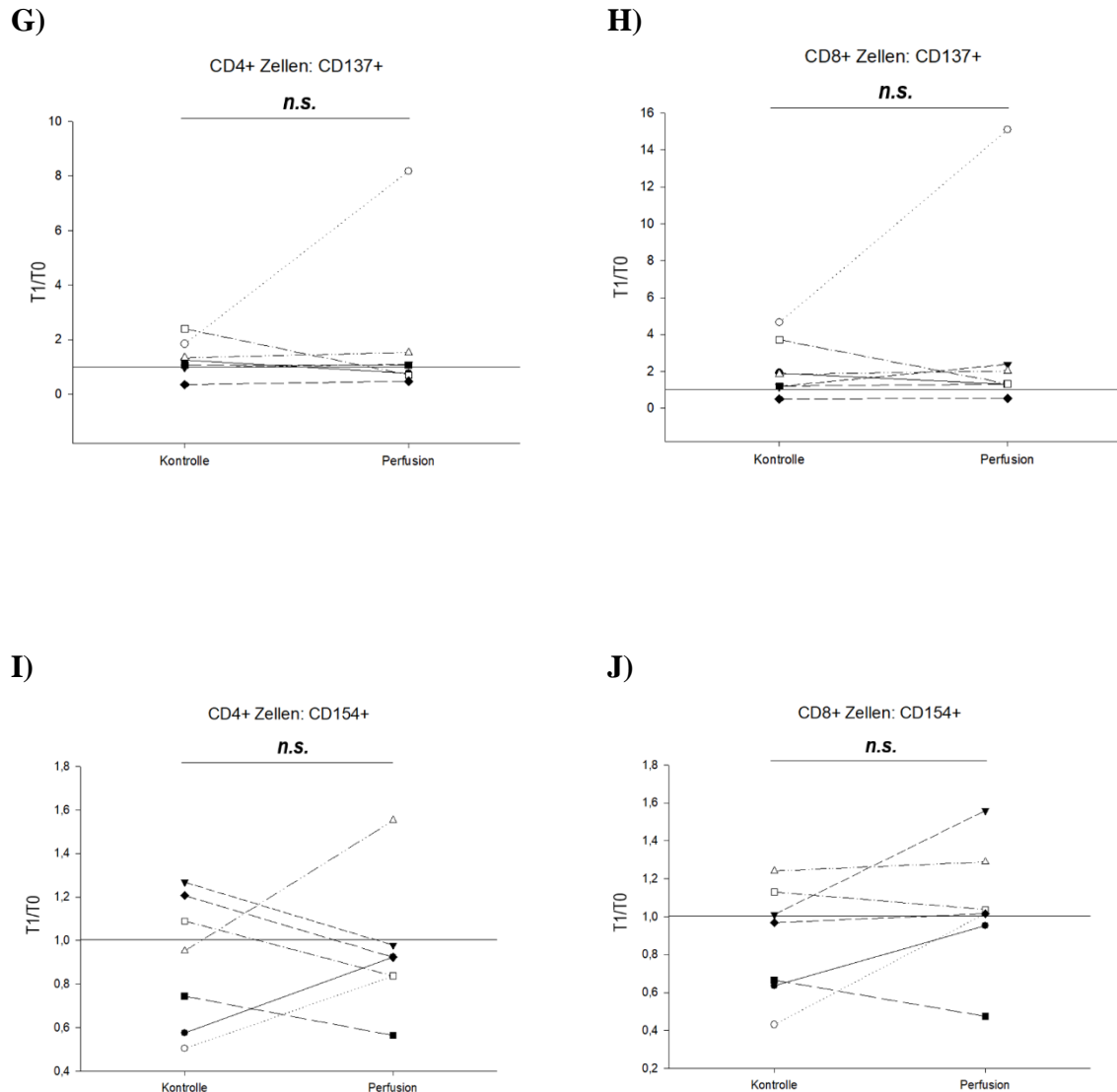


Abbildung 5: Veränderung der Expression verschiedener Oberflächenantigene auf primären humanen T-Zellen im Laufe des Perfusions- und Kontrollversuches

CD3⁺/CD28⁺ T-Lymphozyten wurden durch MACS®-Negativselektion aus venösem Vollblut gesunder männlicher Probanden (n=7) zum Zeitpunkt T0 und jeweils zum Zeitpunkt T1 während des Perfusionsversuches mit Herz und des Kontrollversuches ohne Herz isoliert. Die Expression der Oberflächenantigene CD25, CD69, CD134, CD137 und CD154 wurde durchflusszytometrisch bestimmt. Dargestellt ist die Expression der Antigene (Einzelwerte der sieben Probanden) jeweils auf CD4⁺ T-Lymphozyten und CD8⁺ T-Lymphozyten zum Zeitpunkt T1 während der Perfusion mit Herz und während der Kontrolle. Die Werte wurden auf den Zeitpunkt T0 normalisiert (entspricht der Linie bei 1,0). (A) Expression von CD25 auf der Oberfläche CD4⁺ T-Lymphozyten; (B) Expression von CD25 auf der Oberfläche CD8⁺ T-Lymphozyten; (C) Expression von CD69 auf der Oberfläche CD4⁺ T-Lymphozyten; (D) Expression von CD69 auf der Oberfläche CD8⁺ T-Lymphozyten; (E) Expression von CD134 auf der Oberfläche CD4⁺ T-Lymphozyten; (F) Expression von CD134 auf der Oberfläche CD8⁺ T-Lymphozyten; (G) Expression von CD137 auf der Oberfläche CD4⁺ T-Lymphozyten; (H) Expression von CD137 auf der Oberfläche CD8⁺ T-Lymphozyten; (I) Expression von CD154 auf der Oberfläche CD4⁺ T-Lymphozyten; (J) Expression von CD154 auf der Oberfläche CD8⁺ T-Lymphozyten. Paired Student's t-test, n.s. = nicht signifikant

Sowohl im Laufe des Perfusionsversuches mit Herz als auch des Kontrollversuches zeigte sich bei den CD4⁺ T-Zellen und den CD8⁺ T-Zellen die Tendenz zur Reduktion der CD25-Expression um etwa 10 bis 17 Prozent (s. Tabelle 4 und 5). Zudem war ein Anstieg der CD69- und CD137-Expression zu verzeichnen, der bei Perfusion stärker ausgeprägt war als bei der zugehörigen Kontrolle. So stieg die CD69-Expression auf den CD4⁺ T-Zellen während der Perfusion auf das 4,50-Fache an, die CD137-Expression auf das 1,97-Fache und bei der zugehörigen Kontrolle CD69 auf das 4,0-Fache und CD137 auf das 1,31-Fache. Vor allem auf den CD8⁺ T-Zellen zeigt sich im Laufe des Perfusionsversuches eine vermehrte Expression von CD69 und CD137. Während die CD69-Expression auf den CD8⁺ T-Zellen bei der Kontrolle zum Zeitpunkt T1 auf das 1,79-Fache angestiegen ist und die CD137-Expression auf das 2,14-Fache, steigen diese im Laufe des Perfusionsversuches sogar auf das 2,50-Fache (CD69) und das 3,42-Fache (CD137) an. Hier ist ein Unterschied zwischen den CD4⁺ T-Zellen und den CD8⁺ T-Zellen zu erkennen. Betrachtet man die CD134- und CD154-Expression im Laufe des Perfusionsversuches mit Herz und der Kontrolle so bleiben diese auf den CD4⁺ T-Zellen nahezu konstant. Jedoch kommt es auf den CD8⁺ T-Zellen im Laufe des Perfusionsversuches zu einer stärkeren Expression von CD134 und CD154 als auf den CD4⁺ T-Zellen (s. Tabelle 4 und 5). Vor allem bei Proband 2 (96/81), Proband 3 (102) und Proband 6 (116/83) waren die Veränderungen in der Expression der Oberflächenproteine bei der Perfusion mit Herz stärker ausgeprägt als bei der zugehörigen Kontrolle ohne Herz. Es zeigten sich zwischen Perfusions- und Kontrollversuch jedoch keine statistisch signifikanten Unterschiede in der Expression der Oberflächenantigene.

5.2 mRNA-Expression in primären humanen T-Zellen im kardialen Xenotransplantationsmodell

Nachdem auf durchflusszytometrischer Ebene keine signifikanten Veränderungen im Laufe des Perfusionsversuches gemessen werden konnten, stellte sich in einem weiteren Schritt die Frage, ob auf mRNA-Ebene Unterschiede in der Expression verschiedener T-Zell-Aktivierungsmarker auftraten.

Um die mRNA-Expression verschiedener T-Zell-spezifischer Zielgene quantifizieren zu können, wurde zunächst Gesamt-RNA aus primären humanen T-Lymphozyten isoliert. Dies geschah zum Zeitpunkt T0 und zum Zeitpunkt T1 des Perfusions- und des Kontrollversuches. Nach anschließender Amplifikation der Gesamt-RNA und reverser

Transkription der gewonnenen aRNA wurde die mRNA-Expression mittels real-time qPCR bestimmt.

5.2.1 mRNA-Expression costimulatorischer und coinhibitorischer Zielgene in primären humanen T-Zellen

Es erfolgte zunächst die Quantifizierung der mRNA-Expression des coinhibitorischen Zielgens PD1 (siehe Abbildung 6) und der costimulatorischen Zielgene ICOS, TIM3 und OX40 (siehe Abbildung 7). Dies geschah zum Zeitpunkt T0 und jeweils zum Zeitpunkt T1 des Perfusions- und des Kontrollversuches mittels qPCR.

A)

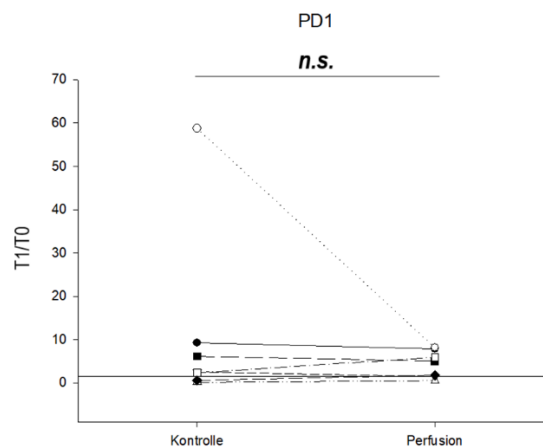


Abbildung 6: PD1-mRNA-Expression im Laufe des Perfusions- und Kontrollversuches

Gesamt-RNA wurde aus primären Pan-T-Zellen gesunder männlicher Probanden ($n=7$) zum Zeitpunkt T0 und jeweils zum Zeitpunkt T1 während des Perfusionsversuches mit Herz und des Kontrollversuches ohne Herz isoliert. Nach anschließender Amplifikation der Gesamt-RNA und reverse Transkription der gewonnenen aRNA wurde die mRNA-Expression mittels real-time qPCR bestimmt. Dargestellt ist die mRNA-Expression des Zielgens PD1 (Einzelwerte der sieben Probanden) zum Zeitpunkt T1 während der Perfusion mit Herz und während der Kontrolle. Die Werte wurden auf den Zeitpunkt T0 normalisiert (entspricht der Linie bei 1,0). Median: Kontrolle 2,51; Perfusion 5,03; Wilcoxon-Signed-Rank-Test, n.s. = nicht signifikant.

Sowohl bei Perfusion mit Herz als auch bei der zugehörigen Kontrolle stieg die mRNA-Expression des coinhibitorischen Zielgens PD1 leicht an. Jedoch war kein signifikanter Unterschied zwischen der Perfusion und der Kontrolle messbar, so dass davon ausgegangen werden muss, dass diese Erhöhung nicht durch den Kontakt zum porcinen Endothel induziert wurde.

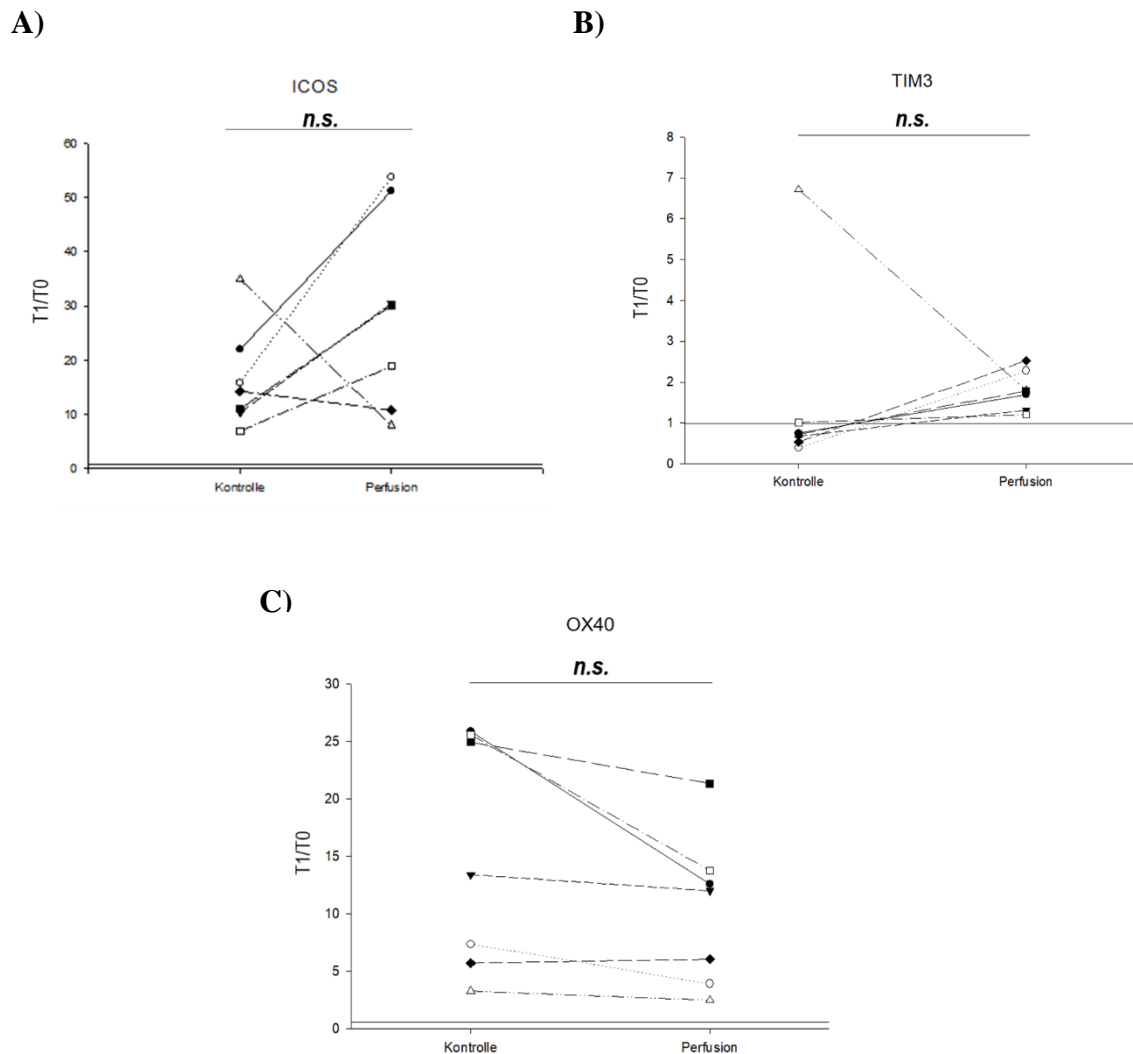


Abbildung 7: mRNA-Expression costimulatorischer Zielgene in T-Zellen im Laufe des Perfusions- und Kontrollversuches

Gesamt-RNA wurde aus primären Pan-T-Zellen gesunder männlicher Probanden ($n=7$) zum Zeitpunkt T0 und jeweils zum Zeitpunkt T1 während des Perfusionsversuches mit Herz und des Kontrollversuches ohne Herz isoliert. Nach anschließender Amplifikation der Gesamt-RNA und reverser Transkription der gewonnenen aRNA wurde die mRNA-Expression mittels real-time qPCR bestimmt. Dargestellt ist die mRNA-Expression costimulatorischer Zielgene in T-Zellen (Einzelwerte der sieben Probanden) zum Zeitpunkt T1 während der Perfusion mit Herz und während der Kontrolle. Die Werte wurden auf den Zeitpunkt T0 normalisiert (entspricht der Linie bei 1,0). (A) ICOS Mittelwert \pm SD: Kontrolle $16,46 \pm 9,44$; Perfusion $29,02 \pm 18,19$; Paired Student's *t*-test, *n.s.* = nicht signifikant; (B) TIM3 Median: Kontrolle 0,72; Perfusion 1,79; Wilcoxon-Signed-Rank-Test, *n.s.* = nicht signifikant; (C) OX40 Mittelwert \pm SD: Kontrolle $15,16 \pm 10,11$; Perfusion $10,30 \pm 6,61$; Paired Student's *t*-test, *n.s.* = nicht signifikant.

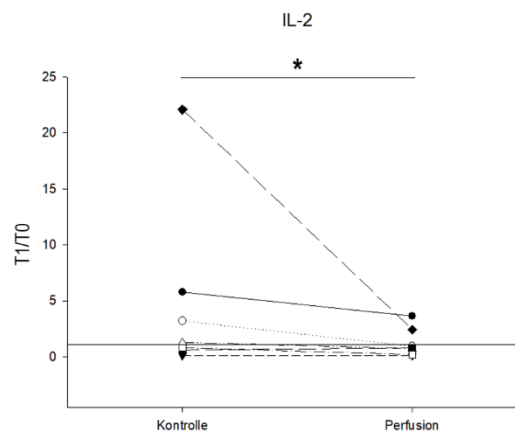
Die Quantifizierung der mRNA-Expression der Zielgene ICOS und TIM3 zeigten bei Perfusion mit Herz einen stärkeren Anstieg im Laufe des Versuchs als bei der Kontrolle (siehe Abbildung 7). Dies deutet darauf hin, dass auf den T-Lymphozyten durch den Kontakt mit dem kardialen Gewebe die Expression dieser Zielgene gefördert wird, jedoch war der Anstieg statistisch nicht signifikant.

Die OX40 mRNA-Expression hingegen stieg während der Kontrolle im Mittel auf das 15,2-Fache an, während sie bei der Perfusion mit Herz im Mittel nur auf das 10,3-Fache anstieg. Daraus lässt sich folgern, dass durch den Kontakt mit dem Herz während des Versuches die OX40 mRNA-Expression supprimiert wird. Jedoch war der Unterschied zwischen Perfusion und Kontrolle statistisch nicht signifikant.

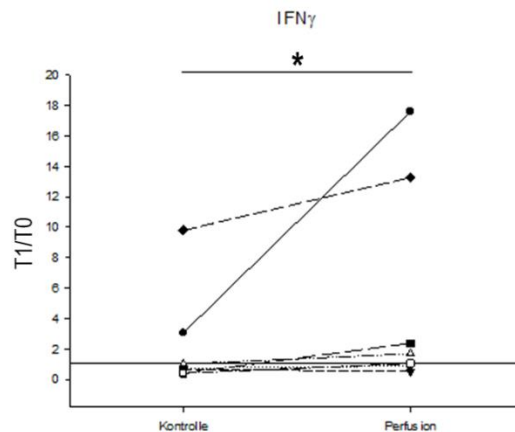
5.2.2 mRNA-Expression in Th1-Zellen

Die Quantifizierung der mRNA-Expression des Th1-Zytokins IL-2 und der proinflammatorischen Th1-Zytokine IFN γ und TNF α , zum Zeitpunkt T0 und jeweils zum Zeitpunkt T1 des Perfusions- und des Kontrollversuches, erfolgte ebenfalls mittels real-time qPCR (siehe Abbildung 8).

A)



B)



C)

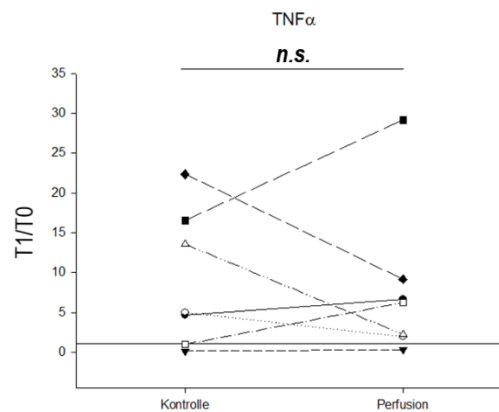


Abbildung 8: mRNA-Expression verschiedener Th1-Zytokine in primären humanen T-Zellen im Laufe des Perfusions- und Kontrollversuches

Gesamt-RNA wurde aus primären Pan-T-Zellen gesunder männlicher Probanden ($n=7$) zum Zeitpunkt T0 und jeweils zum Zeitpunkt T1 während des Perfusionsversuches mit Herz und des Kontrollversuches ohne Herz isoliert. Nach anschließender Amplifikation der Gesamt-RNA und reverse Transkription der gewonnenen aRNA wurde die mRNA-Expression mittels real-time qPCR bestimmt. Dargestellt ist die mRNA-Expression der Th1-Zytokine (Einzelwerte der sieben Probanden) zum Zeitpunkt T1 während der Perfusion mit Herz und während der Kontrolle. Die Werte wurden auf den Zeitpunkt T0 normalisiert (entspricht der Linie bei 1,0). (A) IL-2 Median: Kontrolle 1,30; Perfusion 0,79; Wilcoxon-Signed-Rank-Test, * $p < 0,05$; (B) IFN γ Median: Kontrolle 0,74; Perfusion 1,68; Wilcoxon-Signed-Rank-Test, * $p < 0,05$; (C) TNF α Mittelwert \pm SD: Kontrolle $9,03 \pm 8,50$; Perfusion $7,96 \pm 9,86$; Paired Student's t-test n.s. = nicht signifikant.

Hierbei ließ sich sowohl im Laufe des Kontrollversuches ohne Herz als auch des Perfusionsversuches mit Herz, ein Anstieg der IL-2 und der IFN γ mRNA-Expression bestimmen, der einen statistisch signifikanten Unterschied zwischen Perfusion und Kontrolle aufzeigte. So stieg die IL-2 mRNA während der Kontrolle im Mittel auf das 4,9-Fache an, während sie bei der Perfusion mit Herz im Mittel auf das 1,3-Fache anstieg. Daraus lässt sich folgern, dass durch den Kontakt mit dem Herz während des Versuches die IL-2 mRNA-Expression supprimiert wird und es somit insgesamt zu einer Reduktion der Expression kommt. Hingegen zeigte sich eine zur Kontrolle signifikant erhöhte IFN γ mRNA-Expression im Rahmen der Perfusion mit Herz. Diese ist bei Perfusion mit Herz zum Zeitpunkt T1 auf das 1,68-Fache erhöht. Dies lässt darauf schließen, dass der Kontakt der T-Lymphozyten mit dem Herz einen Anstieg der IFN γ -Expression fördert. Die TNF α mRNA-Expression zeigte dagegen keinen statistisch signifikanten Unterschied zwischen Perfusion und Kontrolle auf.

5.2.3 mRNA-Expression in Th2-Zellen und des Chemokins IL-8

Nachdem bereits in Th1-Zellen Veränderungen der mRNA-Expression gezeigt werden konnten, wurde anschließend die mRNA-Expression der anti-inflammatorischen Th2-Zytokine IL-4 und IL-10 (siehe Abbildung 9) und des Chemokins IL-8 (siehe Abbildung 10) zum Zeitpunkt T0 und jeweils zum Zeitpunkt T1 des Perfusions- und des Kontrollversuches, mittels real-time qPCR, ermittelt.

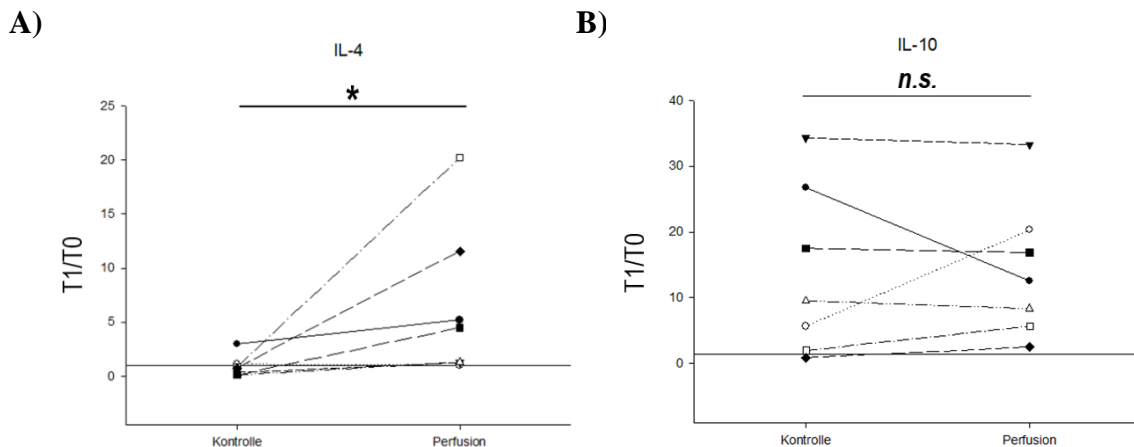


Abbildung 9: mRNA-Expression verschiedener Th2-Zytokine in primären humanen T-Zellen im Laufe des Perfusions- und Kontrollversuches

Gesamt-RNA wurde aus primären Pan-T-Zellen gesunder männlicher Probanden ($n=7$) zum Zeitpunkt T0 und jeweils zum Zeitpunkt T1 während des Perfusionsversuches mit Herz und des Kontrollversuches ohne Herz isoliert. Nach anschließender Amplifikation der Gesamt-RNA und reverser Transkription der gewonnenen aRNA wurde die mRNA-Expression mittels real-time qPCR bestimmt. Dargestellt ist die mRNA-Expression der Th2-Zytokine (Einzelwerte der sieben Probanden) zum Zeitpunkt T1 während der Perfusion mit Herz und während der Kontrolle. Die Werte wurden auf den Zeitpunkt T0 normalisiert (entspricht der Linie bei 1,0). (A) IL-4 Median: Kontrolle 0,79; Perfusion 4,49; Wilcoxon-Signed-Rank-Test, $*p < 0,05$; (B) IL-10 Mittelwert \pm SD: Kontrolle $13,30 \pm 12,89$; Perfusion $14,22 \pm 10,47$; Paired Student's t -test, n.s. = nicht signifikant.

Die Perfusion im System mit Herz führte hierbei zu einem Anstieg der IL-4 mRNA-Expression auf das 4,49-Fache zum Zeitpunkt T1 verglichen zum Zeitpunkt T0, während die IL-4 mRNA-Expression bei der zugehörigen Kontrolle zum Zeitpunkt T1 um 21% abfiel. Es kam somit zu einem in Vergleich zur Kontrolle statistisch signifikanten Anstieg der IL-4 mRNA-Expression. Hingegen war bei der IL-10 mRNA-Expression kein statistisch signifikanter Unterschied zwischen Perfusion und Kontrolle erkennbar.

Die Quantifizierung der mRNA-Expression des Chemokins IL-8 zeigte bei Perfusion mit Herz einen stärkeren Anstieg im Laufe des Versuchs als bei der Kontrolle (siehe Abbildung 9). Dies deutet darauf hin, dass in den T-Lymphozyten durch den Kontakt mit dem kardialen Gewebe die IL-8-Produktion gefördert wird, jedoch war der Anstieg statistisch nicht signifikant.

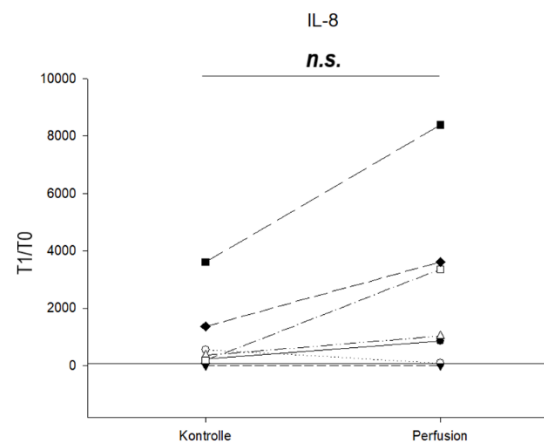


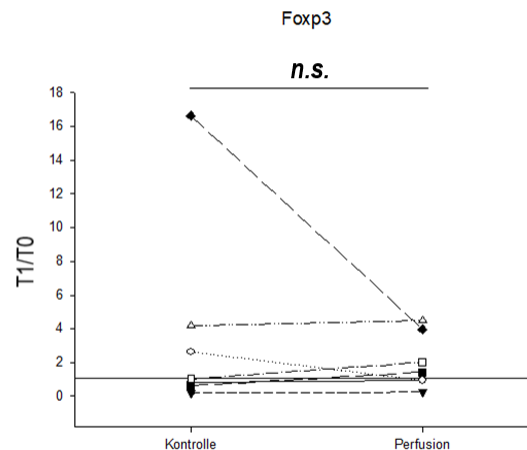
Abbildung 10: mRNA-Expression des Chemokins IL-8 in primären humanen T-Zellen im Laufe des Perfusions- und Kontrollversuches

Gesamt-RNA wurde aus primären Pan-T-Zellen gesunder männlicher Probanden ($n=7$) zum Zeitpunkt T0 und jeweils zum Zeitpunkt T1 während des Perfusionsversuches mit Herz und des Kontrollversuches ohne Herz isoliert. Nach anschließender Amplifikation der Gesamt-RNA und reverser Transkription der gewonnenen aRNA wurde die mRNA-Expression mittels real-time qPCR bestimmt. Dargestellt ist die mRNA-Expression des Chemokins IL-8 (Einzelwerte der sieben Probanden) zum Zeitpunkt T1 während der Perfusion mit Herz und während der Kontrolle. Die Werte wurden auf den Zeitpunkt T0 normalisiert (entspricht der Linie bei 1,0). IL-8 Mittelwert \pm SD: Kontrolle $903,16 \pm 1273,33$; Perfusion $2477,75 \pm 2993,21$; Paired Student's t-test, n.s. = nicht signifikant.

5.2.4 mRNA-Expression in regulatorischen T-zellen (T_{regs})

Es wurde bereits in Studien beschrieben, dass natürliche regulatorische T-Lymphozyten eine überschießende Immunreaktion im Rahmen der Transplantation dämpfen [81]. So erfolgte auch im Rahmen dieser Arbeit eine Quantifizierung der mRNA-Expression in regulatorischen T-Zellen, um zu untersuchen welchen Effekt das kardiale Xenotransplantationsmodell auf die T_{regs} hat. Hierbei wurden die Zielgene FoxP3 und TGF β , zum Zeitpunkt T0 und jeweils zum Zeitpunkt T1 des Perfusions- und des Kontrollversuches, untersucht. Es zeigten sich jedoch keine statistisch signifikanten Unterschiede zwischen der Perfusion mit Herz und der Kontrolle ohne Herz (siehe Abbildung 11).

A)



B)

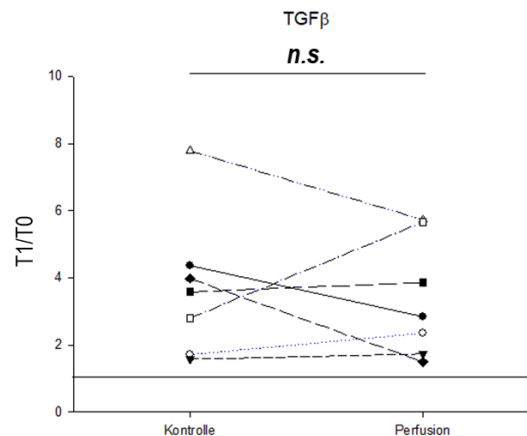


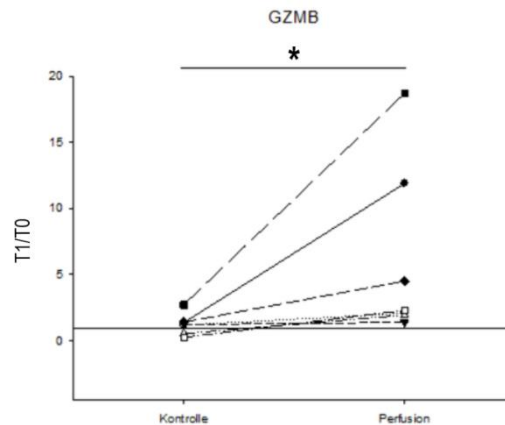
Abbildung 11: mRNA-Expression verschiedener Zielgene in regulatorischen T-Zellen im Laufe des Perfusions- und Kontrollversuches

Gesamt-RNA wurde aus primären Pan-T-Zellen gesunder männlicher Probanden ($n=7$) zum Zeitpunkt T0 und jeweils zum Zeitpunkt T1 während des Perfusionsversuches mit Herz und des Kontrollversuches ohne Herz isoliert. Nach anschließender Amplifikation der Gesamt-RNA und reverse Transkription der gewonnenen aRNA wurde die mRNA-Expression mittels real-time qPCR bestimmt. Dargestellt ist die mRNA-Expression der T_{reg} -Zielgene (Einzelwerte der sieben Probanden) zum Zeitpunkt T1 während der Perfusion mit Herz und während der Kontrolle. Die Werte wurden auf den Zeitpunkt T0 normalisiert (entspricht der Linie bei 1,0). (A) FoxP3 Median: Kontrolle 1,03; Perfusion 1,43; Wilcoxon-Signed-Rank-Test, n.s. = nicht signifikant; (B) TGFβ Mittelwert \pm SD: Kontrolle $3,68 \pm 2,10$; Perfusion $3,38 \pm 1,76$; Paired Student's t-test, n.s. = nicht signifikant.

5.2.5 mRNA-Expression in zytotoxischen T-Zellen

Nachdem bereits in Th1-Zellen und Th2-Zellen Veränderungen der mRNA-Expression gezeigt werden konnten, wurde anschließend die mRNA-Expression der für zytotoxische T-Zellen spezifischen Zielgene GZMB und PRF1 zum Zeitpunkt T0 und jeweils zum Zeitpunkt T1 des Perfusions- und des Kontrollversuches bestimmt (siehe Abbildung 12).

A)



B)

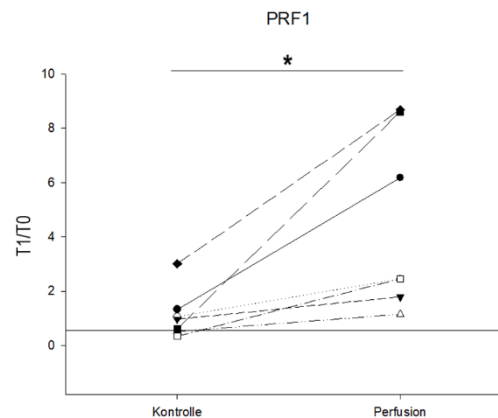


Abbildung 12: mRNA-Expression in zytotoxischen T-Zellen im Laufe des Perfusions- und Kontrollversuches

Gesamt-RNA wurde aus primären Pan-T-Zellen gesunder männlicher Probanden ($n=7$) zum Zeitpunkt T0 und jeweils zum Zeitpunkt T1 während des Perfusionsversuches mit Herz und des Kontrollversuches ohne Herz isoliert. Nach anschließender Amplifikation der Gesamt-RNA und reverser Transkription der gewonnenen aRNA wurde die mRNA-Expression mittels real-time qPCR bestimmt. Dargestellt ist die mRNA-Expression in zytotoxischen T-Zellen (Einzelwerte der sieben Probanden) zum Zeitpunkt T1 während der Perfusion mit Herz und während der Kontrolle. Die Werte wurden auf den Zeitpunkt T0 normalisiert (entspricht der Linie bei 1,0). (A) GZMB Median: Kontrolle 1,20; Perfusion 2,27; Wilcoxon-Signed-Rank-Test, * $p < 0,05$ (B) PRF1 Mittelwert \pm SD: Kontrolle $1,12 \pm 0,90$; Perfusion $4,48 \pm 3,27$; Paired Student's t -test * $p < 0,05$.

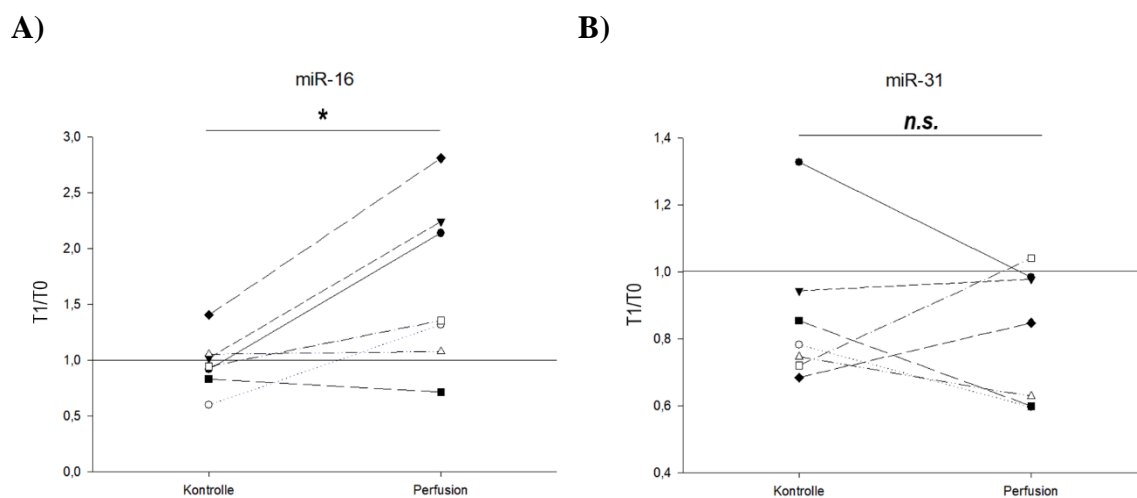
Hierbei zeigte sich im Laufe der Perfusion mit Herz ein statistisch signifikanter Anstieg der GZMB mRNA-Expression. Der Median lag hierbei zum Zeitpunkt T1 der Perfusion auf den Zeitpunkt T0 normalisiert bei 2,27, bei der zugehörigen Kontrolle zum Zeitpunkt T1 jedoch nur bei 1,20. Ebenso stieg im Laufe der Perfusion die PRF1 mRNA-Expression statistisch signifikant an. Dabei war während der Perfusion mit Herz bis zum Zeitpunkt T1 im Mittel ein Anstieg der PRF1 mRNA-Expression auf das 4,48-Fache zu

verzeichnen, während sie bei der zugehörigen Kontrolle kaum anstieg (siehe Abbildung 12). Da es sich bei GZMB und PRF1 um für zytotoxische T-Zellen spezifische und wichtige Zielgene handelt, weisen die Ergebnisse folglich darauf hin, dass die zytotoxischen T-Zellen bei der Abstoßungsreaktion im Rahmen der kardialen Xenotransplantation eine bedeutende Rolle spielen.

5.3 microRNA-Expression in primären humanen T-Zellen im kardialen Xenotransplantationsmodell

Nachdem im Rahmen des kardialen Xenotransplantationsmodells bereits Veränderungen in der mRNA-Expression in humanen T-Lymphozyten gezeigt werden konnten, wurde schließlich die microRNA-Expression in T-Lymphozyten untersucht. Wie bereits beschrieben, spielen microRNAs eine wichtige Rolle in zahlreichen physiologischen und inflammatorischen Prozessen[72, 73]. Auch deuten aktuelle Studien darauf hin, dass microRNAs im Rahmen der Xenotransplantation eine zentrale Rolle spielen[78]. So wurde auch im Rahmen unseres kardialen Xenotransplantationsmodells die Expression einiger T-Zell-spezifischer microRNAs untersucht.

Hierfür wurde zunächst Gesamt-RNA zum Zeitpunkt T0 und jeweils zum Zeitpunkt T1 des Perfusions- und des Kontrollversuches aus primären humanen T-Lymphozyten isoliert. Nach anschließender reverser Transkription der Gesamt-RNA in cDNA, wurde die Expression der microRNA miR-16, miR-31, miR-93, miR-150, miR-155 und miR-223 mittels real-time quantitativer TaqMan®-PCR, quantifiziert.



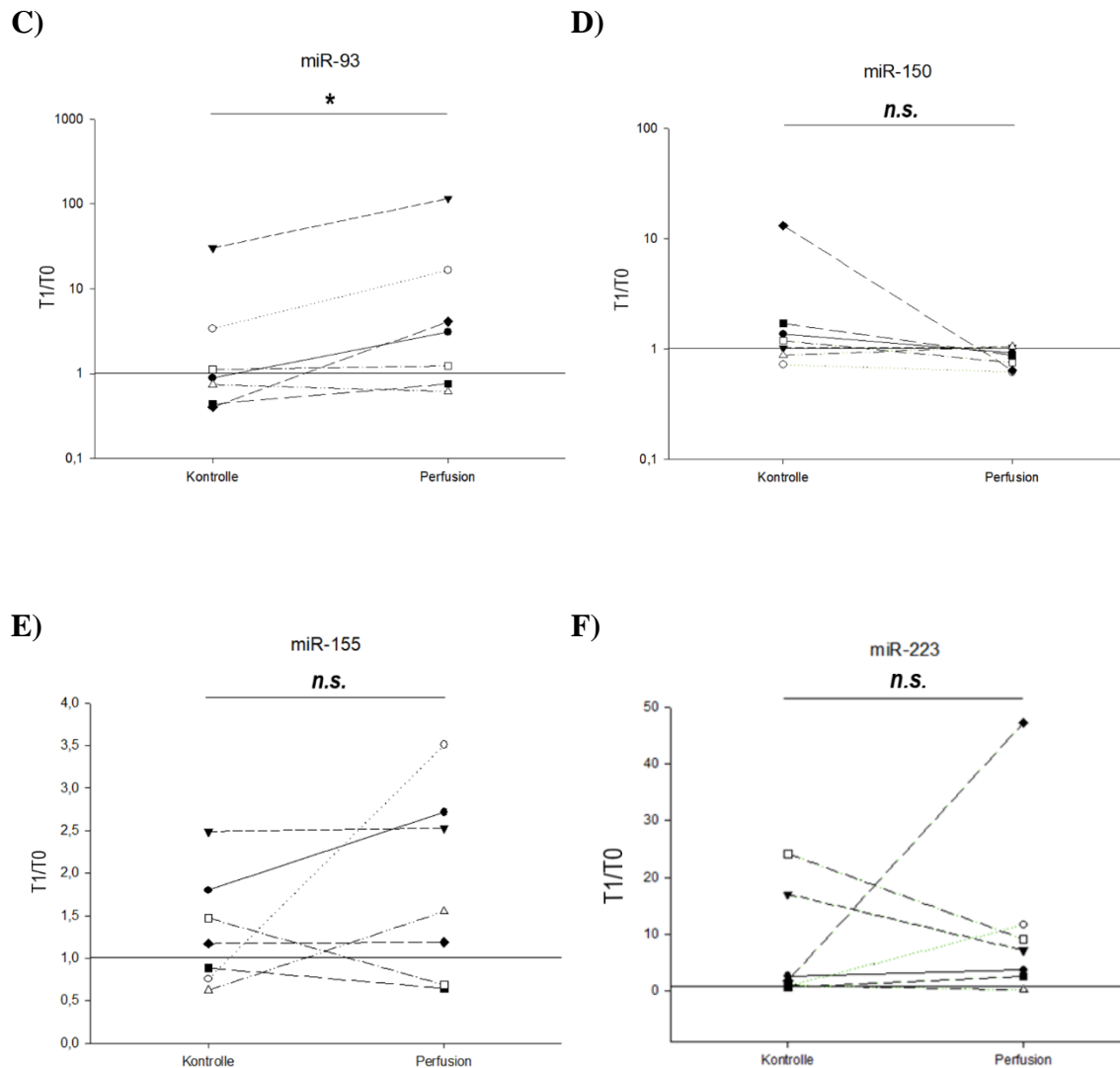


Abbildung 13: miRNA-Expression in primären humanen T-Zellen im Laufe des Perfusions- und Kontrollversuches

Gesamt-RNA wurde aus primären Pan-T-Zellen gesunder männlicher Probanden ($n=7$) zum Zeitpunkt T0 und jeweils zum Zeitpunkt T1 während des Perfusionsversuches mit Herz und des Kontrollversuches ohne Herz isoliert. Nach Amplifikation der Gesamt-RNA und anschließender reverser Transkription in cDNA wurde die miRNA-Expression mittels real-time quantitativer TaqMan®-PCR bestimmt. Dargestellt ist die miRNA-Expression in T-Zellen (Einzelwerte der sieben Probanden) zum Zeitpunkt T1 während der Perfusion mit Herz und während der Kontrolle. Die Werte wurden auf den Zeitpunkt T0 normalisiert (entspricht der Linie bei 1,0). (A) miR-16 Mittelwert \pm SD: Kontrolle $0,97 \pm 0,25$; Perfusion $1,67 \pm 0,75$; Paired Student's t-test, * $p < 0,05$; (B) miR-31 Mittelwert \pm SD: Kontrolle $0,87 \pm 0,22$; Perfusion $0,81 \pm 0,20$; Paired Student's t-test, n.s. = nicht signifikant; (C) miR-93 Median: Kontrolle 0,89; Perfusion 3,09; Wilcoxon-Signed-Rank-Test, * $p < 0,05$; (D) miR-150 Median: Kontrolle 1,19; Perfusion 0,87; Wilcoxon-Signed-Rank-Test, n.s. = nicht signifikant; (E) miR-155 Mittelwert \pm SD: Kontrolle $1,31 \pm 0,66$; Perfusion $1,83 \pm 1,10$; Paired Student's t-test, n.s. = nicht signifikant; (F) miR-223 Mittelwert \pm SD: Kontrolle $6,89 \pm 9,62$; Perfusion $11,66 \pm 16,20$; Paired Student's t-test, n.s. = nicht signifikant.

Während des Perfusions- und auch des Kontrollversuches nahm die miR-31-Expression bis zum Zeitpunkt T1 um etwa 10 bis 20 Prozent ab. Die Expression der miR-150 verringerte sich im Verlauf der Perfusion mit Herz leicht, während in der zugehörigen

Kontrolle bis zum Zeitpunkt T1 ein leichter Anstieg zu verzeichnen war. Die miR-155-Expression stieg während der Perfusion mit Herz auf das 1,83-Fache an während sie im Lauf der Kontrolle nur auf das 1,31-Fache anstieg. Auch die miR-223 stieg während der Perfusion mit Herz stärker an als bei der zugehörigen Kontrolle. So erhöhte sich die miR-223-Expression nach Kontakt mit porcinem Endothel auf das 11,66-Fache, bei der zugehörigen Kontrolle jedoch nur auf das 6,89-Fache. Allerdings waren bei der Messung der miR-31-, miR-150-, miR-155- und der miR-223-Expression keine signifikanten Unterschiede zwischen Perfusion mit Herz und der zugehörigen Kontrolle messbar.

Hingegen war im Laufe des Perfusionsversuches mit Herz bis zum Zeitpunkt T1 eine signifikante Erhöhung der miR-16-Expression messbar. Durch den Kontakt mit dem kardialen Gewebe stieg die Expression im Mittel um 67 % an, bei der zugehörigen Kontrolle reduzierte sich die Expression im Mittel um 3 %. Auch bei der Untersuchung der miR-93-Expression zeigte sich im Laufe des Perfusionsversuches ein statistisch signifikanter Anstieg. Der Median lag hierbei zum Zeitpunkt T1 der Perfusion auf den Zeitpunkt T0 normalisiert bei 3,09, bei der zugehörigen Kontrolle zum Zeitpunkt T1 jedoch nur bei 0,89. In dem von uns entwickelten kardialen Xenotransplantationsmodell zeigte sich somit sowohl in der miR-16- als auch der miR-93-Expression ein signifikanter Unterschied zwischen Perfusion und Kontrolle.

6 DISKUSSION

Eine Herztransplantation stellt meist die Ultima Ratio für Patienten mit terminaler Herzinsuffizienz dar [3]. Jedoch besteht seit Jahren ein weltweiter Spenderorganmangel. So steht der stetig wachsenden Zahl an benötigten Spenderherzen weiterhin nur eine unzureichende Zahl an Organspendern entgegen [11]. Aufgrund dieses Mangels verlängert sich die Wartezeit der Patienten für eine Herztransplantation und die Mortalität auf der Warteliste steigt [9].

Xenotransplantationen könnten eine Möglichkeit werden, diesem extremen Spenderorganmangel entgegenzuwirken. Damit könnte bei erfolgreicher klinischer Anwendung der Xenotransplantation insbesondere auch die Mortalität auf der Warteliste gesenkt werden.

Trotz der zunehmenden Erfolge bei präklinischen Xenotransplantationsversuchen bleiben Fragen zu Mechanismen der Abstoßung von Xenotransplantaten. Lange Zeit lag der Fokus der Xenotransplantations-Forschung auf der Hyperakuten Abstoßungsreaktion, die Minuten bis Stunden nach Transplantation erfolgt. Diese erschien als größte Barriere in der experimentellen Xenotransplantation. Das Verständnis der HAR ist gewachsen und Möglichkeiten zur Überwindung dieser immunologischen Barriere konnten erfolgreich etabliert werden. Bei einer Xenotransplantation von Schwein zu Mensch reagieren im Rahmen der HAR präformierte Antikörper mit dem auf der Endothelzelle des Schweins befindliche Galactose- $\alpha(1,3)$ -Galactose-Epitop (Gal) und führen somit zu einer Aktivierung des Komplementsystems und folglich zu einer Abstoßung und Schädigung des Transplantates. [34-36] Inzwischen ist es durch gezielte genetische Modifikation möglich Knock-out-Schweine zu züchten, die das entsprechende Gal-Epitop nicht mehr exprimieren und somit die HAR abzuwenden [42, 43].

Die HAR stellt jedoch nur das erste Hindernis im Rahmen der kardialen Xenotransplantation dar. Ist dieses überwunden so stellt sich die Frage welche immunologischen Vorgänge auf zellulärer und mikrobiologischer Ebene stattfinden. Es ist bereits bekannt, dass während der Akutphase nach Allotransplantation T-Lymphozyten eine wichtige Rolle für die Transplantatabstoßung spielen [82]. Diese akut zelluläre Abstoßung ist gut erforscht und kann in der Allotransplantation durch die Gabe von Immunsuppressiva wie Calcineurininhibitoren gut kontrolliert werden [58, 59]. Kellersmann et al. zeigen in ihrem kardialen Maus-zu-Ratte-Xenotransplantationsmodell, dass es bei xenogen transplantierten Organen ebenso wie bei einer Allotransplantation zu

einer Infiltration des Organes mit Makrophagen, NK-Zellen, CD4⁺-Zellen und CD8⁺-Zellen kommt und diese zelluläre Abstoßungsreaktion sogar um einiges stärker ist, als bei einer Allotransplantation [45, 47, 50, 79]. Es gibt bisher jedoch kaum Studien, die eine durch T-Zellen vermittelte akute Abstoßung im Xenotransplantationsmodell untersuchen.

In den vergangenen Jahren ist ein wachsendes Interesse an der Erforschung von microRNAs und ihrer regulatorischen Aufgabe im Rahmen verschiedenster Erkrankungen entstanden. microRNAs sind kurze, einsträngige RNA-Moleküle, die durch sequenzspezifische, komplementäre Basenpaarbindung an eine mRNA die Expression von Zielgenen auf posttranskriptionaler Ebene regulieren. Aktuelle Studien zeigen, dass microRNAs in der xenogenen Abstoßungsreaktion eine bedeutende Rolle spielen. Dennoch sind die microRNA-Expressionsprofile während der akuten Immunantwort nach Xenotransplantation nur wenig erforscht. [78]

Im Rahmen dieser Dissertation lag der Fokus auf der Charakterisierung der T-Zellantwort im kardialen Xenotransplantationsmodell. Hierfür wurde ein Schweineherz in einem extrakorporalen Modell mit humanem Vollblut perfundiert und anschließend die Immunreaktion bei Kontakt des Blutes mit porcinem Endothel untersucht. Nach unserem Kenntnisstand ist es das erste Mal, dass die T-Zellantwort nach Xenotransplantation anhand eines ex-vivo Perfusionsmodells untersucht wurde. Die T-Zellvermittelte Immunantwort nach xenogener Herztransplantation zu kennen und abwenden zu können, stellt nach Überwinden der HAR den nächsten bedeutenden Schritt für ein erfolgreiches Langzeitüberleben des Transplantates dar. [83]

Eine Rejektion des Transplantates findet statt, da zelluläre Strukturen des Spenderorgans durch die Immunzellen des Empfängers als fremd erkannt werden und eine entsprechende Immunreaktion ausgelöst wird [84]. Eine entscheidende Schlüsselrolle bei der Entstehung dieser Reaktion spielt die T-Zell-Aktivierung. Um die für die Schädigung des Spenderorgans notwendigen Effektorfunktionen zu erhalten, müssen naive CD4⁺- und CD8⁺- T-Zellen zunächst aktiviert werden [85]. Dies erfolgt in zwei Schritten: In einem ersten Schritt erhält die T-Zelle durch Binden des T-Zell-Rezeptors (TCR) an einen MHC-Peptid-Komplex auf der Oberfläche Antigenpräsentierender Zellen (APC) ein erstes Signal. Die vollständige T-Zell-Aktivierung erfolgt jedoch erst, wenn die Zelle ein zweites Signal durch das Binden co-stimulatorischer Adhäsionsmoleküle auf der T-Lymphozytenoberfläche an die entsprechenden Liganden auf den APC erhält. Fehlt das

costimulatorische Signal, so kann es zu einer Inaktivierung der T-Zelle, der sogenannten Anergie oder zur Apoptose kommen. Eine Aktivierung durch den TCR allein reicht somit nicht aus, um eine Immunantwort auszulösen. [86]

Um die funktionelle Bedeutung dieser costimulatorischen Adhäsionsmoleküle im Hinblick auf die T-Zellantwort im Rahmen der kardialen Xenotransplantation zu untersuchen, wurde mittels Durchflusszytometrie die Expression der T-Zell spezifischen co-stimulatorischen Moleküle CD25, CD69, CD134, CD137 und CD154 auf der Oberfläche CD4⁺- und CD8⁺-T-Lymphozyten bestimmt. Diese Antigene werden nach Stimulation des Antigenrezeptors auf der Oberfläche der T-Lymphozyten meist transient oder verstärkt exprimiert. Somit ermöglichen sie es T-Zellaktivierung, unabhängig von anderen Effektoren, wie z.B. Zytokinen, zu charakterisieren. [87]

CD25 ist die α -Untereinheit des IL-2-Rezeptorkomplexes, der aus insgesamt drei Untereinheiten besteht und wird auf aktivierten CD4⁺- und CD8⁺-T-Lymphozyten und regulatorischen T-Zellen exprimiert. [88] Aktuelle Studien zeigen, dass eine Blockade des IL-2-Rezeptors mit anti-CD25-Antikörpern (Basiliximab) eine Abstoßung in der Akutphase hinauszögern und somit das Transplantatüberleben verlängern können. [89, 90] Dies zeigt, dass CD25 im Rahmen der Transplantation eine wichtige Rolle spielt und auch für die Charakterisierung der T-Zellantwort im kardialen Xenotransplantationsmodell einen aussagekräftigen Marker darstellen könnte.

CD69 ist ein Zelladhäsionsmolekül, das häufig zur Analyse von antigenspezifischen CD4⁺- und CD8⁺- T-Lymphozyten eingesetzt wird. Es handelt sich um einen der frühesten Marker für eine T-Zellaktivierung und wird in etwa 3 bis 15 Stunden nach Antigenkontakt von aktivierten T-Zellen, aber auch von B-Zellen, NK-Zellen und Makrophagen exprimiert. Jedoch kann CD69 auch auf nicht spezifisch aktivierten T-Zellen exprimiert werden und somit eine Einschätzung der tatsächlichen Stärke der T-Zellaktivierung durch spezifische Antigene erschweren. [87]

CD134 (OX-40) und CD137 (4-1BB) sind Mitglieder der Tumor Necrosis Factor Superfamily Rezeptoren und stellen ebenfalls häufig verwendete Marker für die T-Zell-Aktivierung dar. Die CD134-Expression erreicht nach Antigenstimulation der Zelle ihr Maximum nach 24 bis 48 Stunden und spielt eine wichtige Rolle für die Expansion primärer T-Zellen und die Aufrechterhaltung der CD4⁺-T-Zellpopulation.[86] CD137 (4-1BB) besitzt eine hohe Spezifität für durch Antigene stimulierte T-Zellen und wird 16 bis

24 Stunden nach Antigenstimulation auf der Oberfläche von aktivierten CD4⁺- und CD8⁺-T-Lymphozyten exprimiert. Auf aktivierten regulatorischen T-Zellen ist bereits 6 Stunden nach Stimulation eine verstärkte Expression messbar. [87] CD137 ist an der Apoptose-Induktion beteiligt und scheint vor allem einen bedeutenden Einfluss auf die Proliferation von CD8⁺-T-Zellen zu haben. Aktuelle Studien zeigen, dass unter anderem in murinen Herztransplantationsmodellen eine Gabe von monoklonalen anti-4-1BB-Antikörpern zu einer Inhibition der akuten Transplantatabstoßung durch CD8⁺-T-Zellen führt. [91, 92]

Bei CD154 (CD40L) handelt es sich um einen Liganden der Tumor Necrosis Factor Superfamily Rezeptoren. Als wichtiger Vermittler der Funktion von T-Helferzellen wird CD154 vor allem auf CD4⁺-T-Lymphozyten und zum Teil auch auf CD8⁺-T-Lymphozyten exprimiert. Es handelt sich um einen spezifischen Marker für die T-Zellaktivierung nach Antigenkontakt, da es auf nicht stimulierten T-Zellen kaum exprimiert wird. Das Maximum der CD154-Expression ist 4 bis 12 Stunden nach Antigenkontakt erreicht.[87] In mehreren tierexperimentellen Studien konnte bereits gezeigt werden, dass durch eine Blockade des CD40-CD40L(CD154)-Signalweges mit monoklonalen Antikörpern die akute Abstoßung sowohl bei kardialer als auch bei renaler Allotransplantation abgewendet werden kann [93, 94]. Iwase et al. konnten auch in einem heterotopen kardialen Schwein-zu-Pavian Xenotransplantationsmodell zeigen, dass eine Blockade mit anti-CD154-Antikörpern eine Abstoßungsreaktion verzögern und somit das Transplantatüberleben verlängern kann [95]. Somit spielt CD154 eine entscheidende Rolle im Rahmen der akuten xenogenen Abstoßungsreaktion.

Betrachtet man die oben genannten Daten zu den co-stimulatorischen Molekülen CD25, CD69, CD134, CD137 und CD154 so wird deutlich, dass diese nicht nur als Marker für eine frühzeitige Erfassung der T-Zellaktivierung, sondern auch als diagnostische und therapeutische Ansatzpunkte eine bedeutende Rolle spielen. Die Ergebnisse in unseren Versuchen zeigen hingegen nur leichte Veränderungen in der Expression der mittels Durchflusszytometrie gemessenen Moleküle. So war bei den CD4⁺- und CD8⁺-T-Lymphozyten ein Anstieg der Expression von CD69 und CD137 zu verzeichnen, der im Perfusionsversuch mit Herz stärker ausgeprägt war als bei der zugehörigen Kontrolle. Zudem ist dieser Anstieg auf den CD8⁺-T-Zellen stärker ausgeprägt als auf den CD4⁺-T-Zellen. Sowohl im Perfusionsversuch als auch in der zugehörigen Kontrolle war eine Tendenz zur Reduktion der CD25-Expression festzustellen, während die Marker CD134 und CD154 nach Antigenkontakt auf den CD8⁺-T-Zellen vermehrt exprimiert wurden

und auf den CD4⁺-T-Zellen nahezu konstant blieben. Insgesamt fällt auf, dass es vor allem auf den CD8⁺-T-Zellen im Laufe des Perfusionsversuches zu einer Veränderung der Expression der Oberflächenantigene kommt. Dies deutet darauf hin, dass durch den Kontakt der humanen T-Lymphozyten mit dem porcinen kardialen Gewebe vor allem eine zytotoxische Abstoßungsreaktion, mit Aktivierung der CD8⁺-T-Zellen, ausgelöst wird.

Jedoch war für keines der untersuchten Oberflächenproteine ein statistisch signifikanter Unterschied zwischen Perfusion mit Herz und Kontrolle feststellbar. Eine mögliche Erklärung dafür, dass wir kaum Effekte in unseren Versuchen gesehen haben, obwohl in der Literatur mehrfach die bedeutende Rolle dieser Marker in der T-Zellaktivierung und der Abstoßungsreaktion nach Transplantation beschrieben ist könnte in der Zeit liegen, die vom Antigenkontakt der T-Zellen bis zur Induktion der verstärkten Expression der Moleküle vergeht. In unserem Perfusionsmodell wurden die explantierten Schweineherzen 180 Minuten lang im Working-Heart-Modus mit humanem Vollblut perfundiert und unmittelbar nach Beendigung des Versuches die T-Zellen isoliert und untersucht. Die Zeit der Stimulation beträgt somit drei Stunden. Wie oben bereits beschrieben, ist CD69 einer der frühesten Marker für eine T-Zellaktivierung und wird 3 bis 15 Stunden nach Antigenkontakt auf aktivierten T-Zellen exprimiert. CD154 wird nach 4 bis 12 Stunden exprimiert und die anderen Marker teilweise erst nach 16 bis 48 Stunden. Dies zeigt sich auch in unseren Ergebnissen. Nach drei Stunden Perfusion ist bereits ein Anstieg der CD69-Expression, eines frühen Markers, zu verzeichnen. Dass sich jedoch auch die CD69-Expression im Rahmen des Kontrollversuches verstärkt, ist damit zu erklären, dass die CD69-Expression nicht nur nach TCR-abhängiger Aktivierung induziert wird und auch auf nicht antigenspezifisch stimulierten T-Zellen exprimiert werden kann [87]. Daher lässt es sich nicht ausschließen, dass die vermehrte Expression mechanisch induziert ist oder auf andere Effekte als den Antigenkontakt mit dem Schweinendothel zurückzuführen ist. Dies zeigt, dass CD69 als alleiniger Marker nicht geeignet ist, um eine Aussage über die tatsächliche Stärke der T-Zellaktivierung zu treffen. Um jedoch die Expression der anderen costimulatorischen Moleküle auch erfassen zu können ist es notwendig die durchflusszytometrische Bestimmung zu einem späteren Zeitpunkt durchzuführen. Vergeht ausreichend Zeit zwischen Antigenkontakt und Messung, so ist es vielleicht möglich, die Stärke der T-Zellaktivierung anhand der anderen Marker zu bestimmen und eine therapeutische Möglichkeit zur Eindämmung zu finden.

Nachdem mittels Durchflusszytometrie keine signifikanten Veränderungen der Expression oben genannter T-Zell-Aktivierungsmarker gemessen werden konnten, stellte sich die Frage, ob auf mRNA-Ebene bereits Unterschiede in der Expression verschiedener T-Zell-Marker feststellbar waren. Daher wurde in einem nächsten Schritt die mRNA-Expression weiterer Zielgene zum Zeitpunkt T0 und jeweils zum Zeitpunkt T1 des Perfusions- und des Kontrollversuches mittels real-time qPCR quantifiziert. Untersucht wurden hierbei die co-stimulatorischen Zielgene ICOS, TIM-3 und OX40 und das co-inhibitorische Zielgen PD1. Die Zielgene ICOS und TIM3 zeigten bei Perfusion mit Herz einen stärkeren Anstieg im Laufe des Versuchs als bei der zugehörigen Kontrolle. Es ist also anzunehmen, dass es durch den Kontakt zum Schweineendothel zu einer Aktivierung der T-Zellen kommt. Jedoch ergaben auch diese Messungen keine statistisch signifikanten Ergebnisse. Im Widerspruch hierzu war der Anstieg der OX40-mRNA-Expression bei der Perfusion mit Herz geringer ausgeprägt als bei der zugehörigen Kontrolle. Der Kontakt der T-Lymphozyten mit dem kardialen Gewebe supprimiert somit scheinbar die Expression des co-stimulatorischen Zielgens OX40, jedoch waren auch diese Ergebnisse nicht signifikant. Ebenso wie bei den durchflusszytometrisch untersuchten T-Zell-Aktivierungsmarkern ist auch hier anzunehmen, dass der Zeitpunkt der Messung zu früh gewählt ist. Um eine eindeutige Tendenz der T-Zellaktivierung und signifikante Ergebnisse erheben zu können, ist ein ausreichend langer Kontakt der T-Lymphozyten zum porcinen kardialen Gewebe notwendig. Während in unseren Versuchen eine Stimulation der T-Zellen für 180 Minuten stattfindet, werden viele Aktivierungsmarker erst einige Stunden nach Antigenkontakt vermehrt exprimiert.[87]

Im weiteren experimentellen Verlauf stellten wir uns die Frage, ob in den zum Zeitpunkt T1 isolierten T-Zellen bereits eine antigeninduzierte Zytokinproduktion stattgefunden hat, die es uns ermöglicht, die T-Zellantwort im kardialen Xenotransplantationsmodell zu charakterisieren. Hierfür betrachteten wir zunächst mittels real-time qPCR die mRNA-Expression in CD4⁺-T-Lymphozyten.

CD4⁺-Zellen können in verschiedene Subpopulationen differenzieren, unter anderem die Th1-Zellen und Th2-Zellen. Diese Subpopulationen produzieren verschiedene Zytokine und können damit eine Immunreaktion auf unterschiedliche Art und Weise regulieren.[96] Auch im Rahmen der akuten Abstoßungsreaktion können Zytokine über mehrere Wege zur Destruktion des Transplantates führen. Dies kann beispielsweise zytotoxisch über die Wirkung von TNF- α oder IFN- γ geschehen. Einige Zytokine, wie IL-2 und IL-4, können die Proliferation und klonale Expansion reifer zytotoxischer T-

Zellen fördern. Des Weiteren können Zytokine an der Reifung von B-Zellen und der Produktion spezifischer Antikörper gegen das Transplantat beteiligt sein und die lokale Abstoßungsreaktion verstärken, indem sie periphere, noch nicht sensibilisierte Lymphozyten rekrutieren. [97]

Bei der Quantifizierung der mRNA-Expression der Th1-Zytokine IL-2, INF- γ und TNF- α war es uns möglich, eine im Vergleich zum Kontrollversuch signifikant reduzierte IL-2 und eine erhöhte INF- γ -mRNA-Expression nachzuweisen. Bei der Messung der TNF- α -mRNA ergaben sich jedoch keine signifikanten Unterschiede zwischen Perfusion mit Herz und Kontrolle. Während TNF- α und INF- γ zu den proinflammatorischen Th1-Zytokinen gehören, kann IL-2 sowohl pro- als auch antiinflammatorische Funktionen übernehmen. So fördert IL-2 einerseits die Lymphoproliferation und kann aktuellen Studien zufolge auch überschießende Immunreaktionen eindämmen [98, 99]. Daher ist eine Reduktion der IL2-mRNA-Expression, wie in unseren Perfusionsversuchen nachgewiesen, durchaus mit einem proinflammatorischen Prozess wie der akuten Organabstoßung vereinbar.

Cunningham et al. untersuchten in ihrer Studie die TNF- α -mRNA-Expression während der kardialen Xenotransplantation und verglichen dabei Transplantatbiopsien von Transplantationen, bei denen eine starke akute Abstoßung stattgefunden hatte mit Biopsien von Transplantaten, die nicht akut abgestoßen wurden. Sie konnten dabei keinen signifikanten Unterschied zwischen abgestoßenen und nicht-abgestoßenen Biopsien feststellen. [100] Dies deckt sich mit den von uns erhobenen Daten und deutet darauf hin, dass TNF- α im Rahmen der kardialen Xenotransplantation keine bedeutende Rolle spielt.

Nachdem in unserem Perfusionsmodell signifikante Veränderungen in der mRNA-Expression der Th1-Zytokine im Rahmen der Xenotransplantation gezeigt werden konnten, wurde im weiteren Verlauf die mRNA-Expression der Th2-Zytokine IL-4 und IL-10 bestimmt, um zu untersuchen welche Rolle diese für die akute Abstoßung spielen. IL-4 und IL-10 sind anti-inflammatorische Zytokine, die die Transplantatabstoßung regulieren können. Mehrere tierexperimentellen Studien deuten darauf hin, dass eine erhöhte IL-4- und IL-10-mRNA-Expression eine Transplantattoleranz induzieren und somit zu einem verlängerten Transplantatüberleben führen können. [101, 102] Jedoch konnten Cunningham et. al im Gegensatz dazu in ihren Versuchen eine signifikant erhöhte IL-4- und IL-10-mRNA-Expression in Transplantatbiopsien nachweisen, die klinische und histopathologische Anzeichen für eine akute Abstoßung zeigten. [100]

Auch weitere Studien deuten darauf hin, dass IL-4 im Rahmen der Transplantation sowohl immunsuppressiv als auch immunstimulierend wirken kann. [103] Wir konnten in unseren Perfusionsversuchen mit Herz eine im Vergleich zur Kontrolle signifikant erhöhte IL-4-mRNA-Expression feststellen. Bei der Quantifizierung der IL-10-mRNA-Expression waren hingegen keine signifikanten Unterschiede zwischen Perfusion und Kontrolle feststellbar. Um herauszufinden, welche Rolle die Th2-Zytokin-Expressionsprofile im Rahmen einer möglichen Transplantatabstoßung oder -toleranz spielen, wäre es interessant, in einem weiteren Schritt anhand klinischer Parameter und Transplantatbiopsien den Grad der Organabstoßung zu bestimmen und zu untersuchen, ob zum Beispiel eine Korrelation zur IL-4-Expression besteht.

Chemokine beeinflussen als entscheidende Mediatoren der Transplantatabstoßung die Migration, Adhäsion und Effektorfunktion von Leukozyten. Mehrere tierexperimentelle Studien konnten zeigen, dass Chemokine eine signifikante Rolle in der akuten Abstoßungsreaktion spielen und dass eine verminderte Chemokin-Expression mit verlängertem Transplantatüberleben assoziiert ist. [104] Auch in unserer Studie haben wir durch Quantifizierung der IL-8-mRNA-Expression untersucht, welche Rolle Chemokine in der kardialen Xenotransplantation und der dabei induzierten T-Zellantwort spielen. Zwar konnten wir während der Perfusion mit Herz eine im Vergleich zur Kontrolle höhere IL-8-mRNA-Expression feststellen, jedoch war diese statistisch nicht signifikant. Dennoch deutet der Anstieg darauf hin, dass Chemokine eine wichtige Rolle im Rahmen der akuten Abstoßungsreaktion spielen und möglicherweise einen therapeutischen Ansatzpunkt darstellen könnten.

Die Ergebnisse zeigen, dass der Kontakt der humanen T-Lymphozyten mit dem Schweineendothel zur Expression komplexer Zytokinmuster führt. Es stellte sich im weiteren Verlauf die Frage, auf welche Weise die Abstoßung des Transplantates durch die Zytokine beeinflusst wird. INF- γ ist beispielsweise an vielen grundlegenden Entzündungsprozessen beteiligt und fördert die Differenzierung der CD8⁺-T-Zellen zu zytotoxischen Effektorzellen [105]. Daher war es für uns von Interesse, spezifische Aktivierungsmarker für zytotoxische T-Zellen im Laufe des Perfusionsversuches zu untersuchen und ihre Rolle für die akute Abstoßungsreaktion zu erfassen. Es wurden hierfür die Granzyme B- und Perforin-1-mRNA-Expressionen mittels q-PCR quantifiziert. GZMB und PRF1 sind zytolytische Proteine, die in Granula der zytotoxischen T-Zellen gespeichert sind und bei ihrer Freisetzung die Apoptose in der Zielzelle induzieren. PRF1 erleichtert dabei das Eindringen des GZMB in das Zytoplasma

der Zielzelle. Als Serinprotease induziert GZMB schließlich durch Caspase-abhängige Signalwege den Zelltod in der Zielzelle. [106]

Es war uns möglich, während der Perfusion mit Herz eine im Vergleich zur Kontrolle signifikante Hochregulation der GZMB- und PRF1-mRNA-Expression festzustellen und somit einen wichtigen direkten und akuten zytotoxischen Abstoßungsmechanismus nach kardialer Xenotransplantation nachzuweisen. Unsere Ergebnisse stimmen diesbezüglich mit mehreren Studien überein, die zeigen, dass GZMB und PRF1 im Rahmen der akuten Abstoßung nach Organtransplantation vermehrt freigesetzt werden und somit eine zytotoxische Abstoßungsreaktion gegen das Transplantat auslösen [106, 107]. So untersuchten Sabek et al. in ihrer Studie die GZMB- und PRF1-mRNA-Expression in peripheren mononukleären Zellen von Patienten nach allogener Nierentransplantation. Der Grad der Abstoßung wurde dabei durch histopathologische Untersuchung von Transplantatbiopsien bestimmt und mit der GZMB- und PRF1-mRNA-Expression korreliert. Bei Patienten in deren Transplantatbiopsien die akute Abstoßung histopathologisch nachgewiesen werden konnte war auch in den peripheren Lymphozyten eine, im Vergleich zu den Biopsien ohne Nachweis einer Abstoßungsreaktion, signifikant erhöhte GZMB- und PRF1-mRNA-Expression messbar.[108]

Nachdem wir zeigen konnten, dass sowohl die Th1- und Th2-Zellen, als auch die zytotoxischen T-Zellen an der akuten Xeno-Transplantatabstoßung beteiligt sind, stellte sich im weiteren experimentellen Verlauf die Frage, ob auch die regulatorischen T-Zellen (T_{regs}) einen Einfluss auf die Abstoßungsreaktion haben. Humane T_{regs} sind Subtypen der $CD4^{+}$ -T-Zellen und sind für die Aufrechterhaltung des Immungleichgewichts zuständig [109]. Auf ihrer Oberfläche werden vermehrt die Oberflächenantigene CD25 und forkhead box P3 (FoxP3) exprimiert. Um zu untersuchen, ob auch in unserem Modell T_{regs} durch den Kontakt zum Schweineendothel vermehrt rekrutiert und aktiviert wurden, haben wir die mRNA-Expression des Transkriptionsfaktors FoxP3 und des von den T_{regs} freigesetzten Zytokins TGF β mittels q-PCR quantifiziert. Es waren jedoch keine signifikanten Unterschiede zwischen der mRNA-Expression bei Perfusion mit Herz und der Kontrolle ohne Herz nachweisbar.

T_{regs} spielen eine bedeutende Rolle für die Aufrechterhaltung der Selbsttoleranz und die Vorbeugung von Autoimmunerkrankungen. Behandlungen mit T_{regs} ermöglichen es Allergien zu lindern, die Immun-Balance bei Autoimmunerkrankungen, wie dem Typ I

Diabetes, wiederherzustellen und Graft-versus-Host-Reaktionen (GvHR) abzuwenden. Auch im Rahmen von Transplantationsmodellen war es bereits möglich, die Induktion einer Transplantattoleranz durch T_{regs} nachzuweisen. [81, 110] Li et al. gelang es in Ihrer Studie Schwein-spezifische regulatorische T-Zellen zu erzeugen, die bei Kontakt mit xenogenem Antigen die Produktion der T-Effektorzell-Aktivierungsmarker supprimieren und die T-Effektorzellproliferation inhibieren [109].

Neben der Untersuchung verschiedener Oberflächenproteine und Zytokine, ist in den vergangenen Jahren ein wachsendes Interesse an der Rolle von microRNAs im Rahmen der Immunantwort des menschlichen Körpers entstanden. MicroRNAs binden als kurze, einsträngige RNA-Moleküle durch sequenzspezifische Basenpaarbindung an mRNAs und regulieren somit verschiedenste Zielgene auf posttranskriptionaler Ebene. Durch ihren Einfluss auf die Zell-Embryogenese, -Differenzierung, -Proliferation und -Apoptose nehmen microRNAs eine wichtige regulatorische Rolle in vielen physiologischen, aber auch pathologischen und inflammatorischen Prozessen ein. In den vergangenen Jahren wurden microRNAs vermehrt als wichtige Regulatoren von Immunzellfunktionen im humanen Organismus beschrieben [111]. Auch wurde bereits die Rolle von microRNAs in immunologischen und nicht-immunologischen Erkrankungen und Prozessen untersucht. So ist bereits bekannt, dass microRNAs an der Pathogenese einiger humaner Autoimmunerkrankungen und auch an der Tumorgenese maßgeblich beteiligt sind.[63, 72, 73]. MicroRNAs eignen sich nicht nur durch ihre hohe Stabilität, sondern vor allem aufgrund ihrer gewebe- und krankheitsspezifischen Expression als frühe Biomarker für immunologische Reaktionen und Erkrankungen [112, 113]. Auch wird ein zellartspezifisches Repertoire an microRNAs exprimiert [114].

Aktuelle Studien deuten darauf hin, dass microRNAs eine wichtige Rolle im Rahmen der Abstoßungsreaktion bei (Xeno-)Transplantation spielen [74, 76, 77]. Möglicherweise eignen sich microRNAs daher als früher Biomarker, um eine Abstoßung frühzeitig zu erkennen und abzuwenden. [76, 115].

Bisher stellt eine Gewebeanalyse nach Transplantatbiopsie die am häufigsten angewandte Methode dar, um das Ausmaß einer möglichen Abstoßungsreaktion nach Organtransplantation zu erfassen [116]. Die Analyse von microRNAs in aus Serum gewonnenen Immunzellen könnte zukünftig einen wichtigen Stellenwert in der nicht-invasiven Diagnostik einer Abstoßungsreaktion einnehmen.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde erstmals die Expression T-Zell-spezifischer microRNAs anhand eines ex-vivo Perfusionsmodells untersucht. Hierfür wurde jeweils zum Zeitpunkt T1 des Perfusions- und des Kontrollversuches in primären humanen T-Lymphozyten die Expression der microRNAs miR-16, miR-31, miR-93, miR-150, miR-155 und miR-223 mittels real-time quantitativer TaqMan®-PCR gemessen.

Dabei war eine leichte, jedoch nicht signifikante Reduktion der miR-150- und miR-31-Expression im Laufe des Perfusionsversuches zu registrieren, während die Expression der miR-155 und miR-223 während der Perfusion anstieg. Auch wenn der Anstieg der miR-155- und miR-223-Expression während des Perfusionsversuches stärker ausgeprägt war als bei der zugehörigen Kontrolle, zeigten sich hier in unseren Untersuchungen keine statistisch signifikanten Ergebnisse.

Bei der Untersuchung der miR-16- und der miR-93-Expression konnten wir in unserem Perfusionsversuch vom Zeitpunkt T0 bis zum Zeitpunkt T1 eine im Vergleich zur zugehörigen Kontrolle signifikante Hochregulierung messen. Es kommt somit durch den Kontakt der humanen T-Lymphozyten mit dem porcinen Endothel zu einer vermehrten Expression der miR-16 und miR-93.

MiR-16 und miR-93 sind im menschlichen Organismus an der Regulation immunologischer Signalwege beteiligt und wirken hierbei vor allem anti-inflammatorisch [117]. Es sind aktuell 8778 Zielgene für die miR-16 beschrieben. MiR-16 hemmt die Zellproliferation und Zellinvasion und ist an der Apoptose-Induktion beteiligt. In der Literatur wurde die miR-16 zunächst als Tumorsuppressor beschrieben. Eine Fehlregulation der miR-16-Expression konnte im Rahmen einiger Carcinomerkrankungen nachgewiesen werden. [118] Inzwischen konnten Studien zudem zeigen, dass miR-16 in der Entstehung von Autoimmunerkrankungen eine wichtige Rolle spielt. [119] Aktuelle Studien zeigen, dass es im Rahmen einiger Tumorerkrankungen zu einer Fehlregulation der miR-93-Expression kommt [120]. Zudem gibt es Hinweise darauf, dass die miR-93 die Differenzierung der Th17-Zellen supprimiert. [121]

Die Rolle der miR-16 und der miR-93 im Rahmen kardiologischer Pathologien ist in der Literatur bereits vorbeschrieben. O'Sullivan et al. untersuchten in ihrer Studie 150 Patienten (50 mit stabiler koronarer Herzkrankheit, 50 mit akutem Myokardinfarkt mit ST-Streckenhebung (STEMI) und eine Kontrollgruppe mit 50 gesunden Patienten) und bestimmten die Konzentration verschiedener microRNAs in deren Blutplasma. Die

Studie ergab, dass im Plasma der an einer stabilen koronaren Herzkrankheit leidenden Probanden, die Expression der miR-16 und miR-93 im Vergleich zur gesunden Kontrollgruppe signifikant erhöht ist. [122] Somit könnte eine beginnende KHK möglicherweise durch die Bestimmung der miR-16 und miR-93-Expression frühzeitig erfasst werden.

MicroRNAs sind in der Literatur bereits als wichtige Regulatoren von Immunzellfunktionen beschrieben [111]. Eine Hochregulation der anti-inflammatorischen microRNAs miR-16 und miR-93 während des ex-vivo Perfusionsversuches könnte eine physiologische Gegenregulation zur Aktivierung des Immunsystems darstellen. Im Rahmen des kardialen Xenotransplantationsmodells war es uns möglich, eine Aktivierung der CD8+-T-Zellen und somit eine zytotoxische Abstoßungsreaktion gegen das Transplantat nachzuweisen. Wird gegenregulatorisch eine vermehrte Expression der miR-16 und miR-93 induziert, könnten diese T-Zell-spezifischen microRNAs wichtige nicht-invasive Biomarker im Rahmen der kardialen Xenotransplantation darstellen und somit zu einem frühzeitigen Erkennen und Abwenden einer Abstoßungsreaktion beitragen.

Eine Limitation unseres Modells stellte vor allem die Dauer des Perfusionsversuches dar. Wie bereits zuvor beschrieben, zirkulierte das humane Vollblut 180 Minuten in unserem Perfusionsmodell, jedoch werden einige der frühesten Marker für eine T-Zellaktivierung erst 3 bis 15 Stunden nach Antigenkontakt auf aktivierten T-Zellen exprimiert. Um eine signifikante Veränderung der Expression weiterer Targets messen zu können, wäre es daher sinnvoll die Perfusionsdauer zu verlängern. Hierfür wäre es jedoch notwendig unser Modell weiter auszubauen und das Blut im Laufe des Perfusionsversuches aufzureinigen und gegebenenfalls entstehende toxische Substanzen herauszufiltern, um die Expression proinflammatorischer Targets sicher auf den Antigenkontakt zurückführen zu können.

Um genau zu definieren, welche Rolle die Expressionsprofile der von uns untersuchten signifikanten Targets im Rahmen einer Xenotransplantatabstoßung spielen, wäre es zudem interessant in einem weiteren Schritt anhand klinischer Parameter und Transplantatbiopsien den Grad der Organabstoßung zu bestimmen und mit unseren Ergebnissen zu korrelieren.

Ziel einer umfassenden Charakterisierung der T-Zellantwort ist es, im Verlauf diagnostische und therapeutische Ansatzpunkte zu finden, um eine Abstoßungsreaktion frühzeitig diagnostizieren und verhindern zu können.

7 ZUSAMMENFASSUNG

Oftmals stellt eine Herztransplantation die Ultima Ratio für Patienten mit terminaler Herzinsuffizienz dar. Insbesondere in Deutschland verlängert sich die Zeit auf der Warteliste für ein Spenderherz aufgrund eines Spenderorganmangels stetig und führt somit zu steigender Mortalität auf der Warteliste. Mithilfe von Xenotransplantationen könnte diesem Spenderorganmangel entgegengewirkt werden und eine mögliche Alternative zur kardialen Allotransplantation geschaffen werden.

Aufgrund etablierter Zucht und Haltung und der Erfahrung in der genetischen Manipulation sind Schweine besonders gut als Organspender für eine Xenotransplantation geeignet. Trotz eines dem Menschen anatomisch und in der Pumpfunktion ähnelnden Herzens handelt es sich bei der kardialen Xenotransplantation von Schwein zu Mensch um eine diskordante Transplantation, die eine starke immunologische Abstoßungsreaktion im menschlichen Körper auslöst.

Die hyperakute Abstoßungsreaktion (HAR) nach Xenotransplantation erschien lange Zeit als unüberwindbar, kann jedoch inzwischen durch gezielte genetische Modifikation der Spendertiere verhindert werden.

Bedingt durch eine zelluläre Aktivierung kommt es jedoch innerhalb von Tagen und Wochen zu einer akuten Transplantatabstoßung mit einer Infiltration des Transplantates mit Makrophagen, NK-Zellen, CD4⁺-Zellen und CD8⁺-Zellen [79]. Auch zeigen aktuelle Studien, dass microRNAs als Regulatoren von Immunzellfunktionen fungieren [111] und eine bedeutende Rolle im Rahmen der Abstoßung eines Xenotransplantates spielen [78]. Jedoch gibt es bisher nur wenige Studien, die die akute T-Zell-vermittelte Abstoßung eines Xenotransplantates auf molekularbiologischer Ebene untersuchen.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde erstmalig anhand eines ex-vivo Perfusionsmodells die T-Zellantwort im Rahmen einer kardialen Xenotransplantation charakterisiert. Hierfür erfolgte eine 180-minütige Perfusion eines porcinen Herzens mit heparinisiertem humanem Vollblut. Als Organspender dienten männliche Schweine (Deutsche Landrasse) mit einem Körpergewicht zwischen 11 und 21kg, als Blutspender dienten gesunde männliche Probanden (n=7).

Anschließend wurden im Perfusat verschiedene an einer T-Zell-Aktivierung beteiligte Targets durch Durchflusszytometrie (CD25, CD69, CD134, CD137 und CD154) und mittels Real-Time quantitativer PCR (FoxP3, GZMβ, ICOS, Interferon-γ, IL-2, IL-4, IL-

8, IL-10, OX40, PD1, PRF1, TGF β , TIM3, TNF α und die microRNAs miR-16, miR-31, miR-93, miR-150, miR-155, miR-223) untersucht.

Unsere Ergebnisse zeigen, dass der Kontakt der humanen T-Zellen mit dem porcinen Endothel zu einer komplexen immunologischen Aktivierung der T-Lymphozyten führt. Während die IL-2-mRNA-Expression im Laufe des Perfusionsversuches im Vergleich zur Kontrolle signifikant reduziert war, konnten wir eine signifikant erhöhte mRNA-Expression von INF- γ , IL-4, GZMB und PRF1 nach erfolgter Perfusion des porcinen Herzens nachweisen. Neben einer Aktivierung der Th1- und Th2-Zellen kommt es vor allem zu einer zytotoxischen Abstoßung des Transplantates durch die vermehrte Expression von INF- γ , GZMB und PRF1. Auch die Expression der anti-inflammatorischen microRNAs miR-16 und miR-93 erhöhte sich im Laufe des Perfusionsversuches signifikant. Somit wurde in unserer Arbeit erstmalig die T-Zellantwort im kardialen ex-vivo Xenotransplantationsmodell charakterisiert, und potentiell an einer xenogenen Abstoßungsreaktion beteiligte Zielgene und mögliche nicht-invasive Biomarker wurden identifiziert.

8 SUMMARY

Heart Transplantation is often the ultima ratio treatment for patients with end-stage heart failure. In particular in Germany, because of a shortage of donor organs, the time on the transplantation waiting list is expanding and there is increasing mortality of patients on the waiting list. Xenotransplantation could be a way to overcome organ shortage and be a possible alternative to cardiac allotransplantation.

Because of established breeding and keeping and the practical knowledge and experience in genetic manipulation, pigs are very suitable as organ donors for xenotransplantation. Despite the fact that the anatomy and pumping function of a porcine heart is similar to the human heart, the pig-to-human xenotransplantation remains a discordant transplantation that causes strong immune reactions.

For a long time hyperacute transplant rejection after xenotransplantation was considered to be insurmountable, yet it can now be prevented with specific genetic modification of the donor animals.

However, within days to weeks, cellular activation leads to an acute transplant rejection with an infiltration of the xenograft with macrophages, natural killer cells, CD4⁺-cells and CD8⁺-cells [79]. Recent studies indicate that microRNAs regulate immune cell function [111] and play an important role in xenograft rejection [78]. However, there are very few studies investigating acute T-cell-mediated xenograft rejection on a molecular level.

In this thesis, T-cell mediated immune responses during cardiac xenotransplantation were investigated with the aid of an ex vivo perfusion model for the first time. Therefore, a porcine heart was perfused with heparinized human whole blood for 180 minutes. Male pigs (German Landrace) with a bodyweight of 11 to 21 kg were chosen as organ donors and healthy male volunteers donated blood (n=7). In a control experiment, we perfused the perfusion system without a porcine heart with the blood of the same donors.

We investigated different targets that are involved in T-cell-activation, using flow cytometry (CD25, CD69, CD134, CD137 und CD154) and real-time quantitative PCR (FoxP3, GZM β , ICOS, Interferon- γ , IL-2, IL-4, IL-8, IL-10, OX40, PD1, PRF1, TGF β , TIM3, TNF α and the microRNAs miR-16, miR-31, miR-93, miR-150, miR-155, miR-223).

Our results show that the contact of the human T-cells with the porcine endothelia leads to a complex immunological activation of the T-lymphocytes. During the perfusion experiment the expression of IL-2-mRNA was significantly reduced in comparison to the control experiment, whereas the mRNA-expression of INF- γ , IL-4, GZMB and PRF1 was significantly increased. Besides the activation of Th1- and Th2-cells, it appears that mainly cytotoxic transplant rejection occurs due to increased expression of INF- γ , GZMB and PRF1. The expression of the anti-inflammatory microRNAs miR-16 and miR-93 was also significantly upregulated during the perfusion experiment. Thus, in our study, for the first time, T-cell mediated immune response in an ex vivo cardiac xenotransplantation model was characterized, and target genes that are potentially involved in xenograft rejection and possible non-invasive biomarkers were identified.

9 LITERATURVERZEICHNIS

1. Ströh, K., et al., *Orthotope Herztransplantation*. Zeitschrift für Herz-,Thorax- und Gefäßchirurgie, 2013. **27**(3): p. 180-186.
2. Butter, C., et al., *Kardiale Resynchronisationstherapie (CRT)*. 2008: Springer.
3. Dickstein, K., et al., *ESC Guidelines for the diagnosis and treatment of acute and chronic heart failure 2008: the Task Force for the Diagnosis and Treatment of Acute and Chronic Heart Failure 2008 of the European Society of Cardiology. Developed in collaboration with the Heart Failure Association of the ESC (HFA) and endorsed by the European Society of Intensive Care Medicine (ESICM)*. Eur Heart J, 2008. **29**(19): p. 2388-442.
4. Boeken, U. and A. Lichtenberg, *Ist die Herztransplantation auch 2015 noch der therapeutische Goldstandard bei terminaler Herzinsuffizienz?* Aktuelle Kardiologie, 2015. **4**(03): p. 160-168.
5. Barnard, C., *The operation. A human cardiac transplant: an interim report of a successful operation performed at Groote Schuur Hospital, Cape Town*. 1967.
6. Cohen, D.J., et al., *Cyclosporine: A New Immunosuppressive Agent for Organ Transplantation*. Annals of Internal Medicine, 1984. **101**(5): p. 667-682.
7. Deschamps, J.-Y., et al., *History of xenotransplantation*. 2004.
8. Eurotransplant, *Statistical Report 2017*.
<https://www.eurotransplant.org/cms/mediaobject.php?file=803150+020288+Statistical+Report+2017+%28online%29131.pdf>.
9. Khush, K.K., et al., *Longer Waiting Time Increases Mortality in Heart Transplantation: An Instrumental Variable Analysis*. The Journal of Heart and Lung Transplantation, 2015. **34**(4): p. S71.
10. *Bundesministerium für Gesundheit: Pressemitteilung am 25. Juli 2012*.
11. *Eurotransplant 2014: Eurotransplant Foundation, Annual Report 2014, ed. by Undine Samuel, Den Haag (CIP-Gegevens Koninklijke Bibliotheek)*.
12. Cooper, D.K. and J.J. Teuteberg, *Pig heart xenotransplantation as a bridge to allotransplantation*. J Heart Lung Transplant, 2010. **29**(8): p. 838-40.
13. Calne, R. *Organ transplantation between widely disparate species*. in *Transplantation proceedings*. 1970.
14. PLATT, J.L., et al., *Immunopathology of hyperacute xenograft rejection in a swine-to-primate model*. Transplantation, 1991. **52**(2): p. 214-220.
15. Hardy, J.D., et al., *Heart transplantation in man: developmental studies and report of a case*. Jama, 1964. **188**(13): p. 1132-1140.
16. Deschamps, J.Y., et al., *History of xenotransplantation*. Xenotransplantation, 2005. **12**(2): p. 91-109.
17. Cooley, D.A., et al., *Human heart transplantation: Experience with twelve cases**. The American journal of cardiology, 1968. **22**(6): p. 804-810.
18. Bailey, L.L., et al., *Baboon-to-human cardiac xenotransplantation in a neonate*. Jama, 1985. **254**(23): p. 3321-3329.
19. Cooper, D.K., et al., *Report of the xenotransplantation advisory committee of the international society for heart and lung transplantation*. The Journal of heart and lung transplantation, 2000. **19**(12): p. 1125-1165.
20. Kennedy, I. *Xenotransplantation: ethical acceptability*. in *Transplantation proceedings*. 1997. Elsevier.
21. Cozzi, E. and E. Ancona, *Xenotransplantation, where do we stand*. J. Nephrol, 2003. **16**(Suppl 7): p. S16-S21.
22. Stadlbauer, V., et al., *Attitude toward xenotransplantation of patients prior and after human organ transplantation*. Clinical transplantation, 2011. **25**(3): p. 495-503.
23. Hammer, C., *Xenotransplantation--is it just around the corner?* Nephrology Dialysis Transplantation, 1994. **9**(12): p. 1724-1725.

24. Hammer C, L.R., Wagner F, Diefenbeck M, *Organs from animals for men*. International Archives of Allergy and Immunology, 1998. **116**: p. 5-21.
25. Langat, D.K. and J.M. Mwenda, *Potential risks of viral infections in xenotransplantation*. Acta tropica, 2000. **76**(2): p. 147-158.
26. Sykes, M., A. D'Apice, and M. Sandrin, *Position Paper of the Ethics Committee of the International Xenotransplantation Association*. Xenotransplantation, 2003. **10**(3): p. 194-203.
27. Iverson, W.O. and T. Talbot, *Definition of a Production Specification for Xenotransplantation: A European Perspective*. Annals of the New York Academy of Sciences, 1998. **862**(1): p. 121-124.
28. Onions, D., et al., *An approach to the control of disease transmission in pig-to-human xenotransplantation*. Xenotransplantation, 2000. **7**(2): p. 143-155.
29. Heneine, W., et al., *No evidence of infection with porcine endogenous retrovirus in recipients of porcine islet-cell xenografts*. The Lancet, 1998. **352**(9129): p. 695-699.
30. Tacke, S.J., R. Kurth, and J. Denner, *Porcine Endogenous Retroviruses Inhibit Human Immune Cell Function: Risk for Xenotransplantation?* Virology, 2000. **268**(1): p. 87-93.
31. Niu, D., et al., *Inactivation of porcine endogenous retrovirus in pigs using CRISPR-Cas9*. Science (New York, NY), 2017. **357**(6357): p. 1303-1307.
32. Rubaltelli, E., et al., *Strengthening acceptance for xenotransplantation: the case of attraction effect*. Xenotransplantation, 2008. **15**(3): p. 159-163.
33. Bauer, A., et al., *hDAF porcine cardiac xenograft maintains cardiac output after orthotopic transplantation into baboon - a perioperative study*. Xenotransplantation, 2005. **12**(6): p. 444-449.
34. Murthy, R., et al., *Heart Xenotransplantation: Historical Background, Experimental Progress, and Clinical Prospects*. The Annals of Thoracic Surgery, 2016. **101**(4): p. 1605-1613.
35. Zeyland, J., et al., *Transgenic pigs designed to express human α -galactosidase to avoid humoral xenograft rejection*. Journal of Applied Genetics, 2013. **54**(3): p. 293-303.
36. Kobayashi, T. and D.K. Cooper, *Anti-Gal, α -Gal epitopes, and xenotransplantation*, in *α -Gal and Anti-Gal*. 1999, Springer. p. 229-257.
37. Rose, A.G. and D.K.C. Cooper, *Venular thrombosis is the key event in the pathogenesis of antibody-mediated cardiac rejection*. Xenotransplantation, 2000. **7**(1): p. 31-41.
38. Rose, A., et al., *Histopathology of hyperacute rejection of the heart: experimental and clinical observations in allografts and xenografts*. The Journal of heart and lung transplantation: the official publication of the International Society for Heart Transplantation, 1990. **10**(2): p. 223-234.
39. Stussi, G., et al., *ABO-incompatible allotransplantation as a basis for clinical xenotransplantation*. Xenotransplantation, 2006. **13**(5): p. 390-399.
40. Platt, J.L., *Xenotransplantation: recent progress and current perspectives*. Current Opinion in Immunology, 1996. **8**(5): p. 721-728.
41. Galili, U., et al., *Interaction between human natural anti-alpha-galactosyl immunoglobulin G and bacteria of the human flora*. Infection and immunity, 1988. **56**(7): p. 1730-1737.
42. Alexandre, G., et al., *Plasmapheresis and splenectomy in experimental renal xenotransplantation*. Xenograft, 1989. **25**: p. 259-266.
43. Taniguchi, S., et al., *In vivo immunoadsorption of antipig antibodies in baboons using a specific Gala1-3Gal column*. Transplantation, 1996. **62**(10): p. 1379-1384.
44. Leventhal, J.R., et al., *The immunopathology of cardiac xenograft rejection in the guinea pig-to-rat model*. Transplantation, 1993. **56**(1): p. 1-8.
45. Platt, J.L., *Acute vascular rejection*. Transplantation Proceedings, 2000. **32**(5): p. 839-840.
46. Blakely, M.L., et al., *Activation of intragraft endothelial and mononuclear cells during discordant xenograft rejection*. Transplantation, 1994. **58**(10): p. 1059-1066.

47. Schuurman, H.-J., J. Cheng, and T. Lam, *Pathology of xenograft rejection: a commentary*. Xenotransplantation, 2003. **10**(4): p. 293-299.
48. Bach, F.H., et al., *Delayed xenograft rejection*. Immunology Today, 1996. **17**(8): p. 379-384.
49. Goddard, M.J., et al., *Histopathology of rejection in the pig-to-primate cardiac xenograft model*. The Journal of Heart and Lung Transplantation, 2001. **20**(2): p. 216.
50. Pino-Chavez, G., *Differentiating acute humoral from acute cellular rejection histopathologically*. Graft, 2001. **4**(1): p. 60.
51. Chen, G., et al., *Acute rejection is associated with antibodies to non-Gal antigens in baboons using Gal-knockout pig kidneys*. Nat Med, 2005. **11**(12): p. 1295-1298.
52. Lin, S.S., et al., *The role of antibodies in acute vascular rejection of pig-to-baboon cardiac transplants*. Journal of Clinical Investigation, 1998. **101**(8): p. 1745-1756.
53. Knosalla, C., et al., *Renal and Cardiac Endothelial Heterogeneity Impact Acute Vascular Rejection in Pig-to-Baboon Xenotransplantation*. American Journal of Transplantation, 2009. **9**(5): p. 1006-1016.
54. Fujiwara, I., et al., *The molecular mechanism of apoptosis induced by xenogeneic cytotoxicity*. Xenotransplantation, 1998. **5**(1): p. 50-56.
55. Goodman, D.J., et al., *DIRECT ACTIVATION OF PORCINE ENDOTHELIAL CELLS BY HUMAN NATURAL KILLER CELLS1*. Transplantation, 1996. **61**(5): p. 763-771.
56. Itescu, S., et al., *Role of Natural Killer Cells, Macrophages, and Accessory Molecule Interactions in the Rejection of Pig-to-Primate Xenografts Beyond the Hyperacute Period*. Human Immunology, 1998. **59**(5): p. 275-286.
57. Platt, J.L., *Immunobiology of xenotransplantation*. Transplant International, 2000. **13**(1): p. S7-S10.
58. Eisen, H. and H. Ross, *Optimizing the immunosuppressive regimen in heart transplantation*. J Heart Lung Transplant, 2004. **23**(5 Suppl): p. S207-13.
59. Soderlund, C. and G. Radegran, *Immunosuppressive therapies after heart transplantation--The balance between under- and over-immunosuppression*. Transplant Rev (Orlando), 2015. **29**(3): p. 181-9.
60. Ekser, B. and D.K. Cooper, *Overcoming the barriers to xenotransplantation: prospects for the future*. Expert Rev Clin Immunol, 2010. **6**(2): p. 219-230.
61. Schmid, C., S. Hirt, and H.H. Scheld, *Leitfaden Herztransplantation*. 2009: Springer Science & Business Media.
62. He, L. and G.J. Hannon, *MicroRNAs: small RNAs with a big role in gene regulation*. Nature Reviews Genetics, 2004. **5**(7): p. 522-531.
63. Bartel, D.P., *MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function*. cell, 2004. **116**(2): p. 281-297.
64. Lee, R., R. Feinbaum, and V. Ambros, *The C. elegans heterochronic gene lin-4 encodes small RNAs with antisense complementarity to lin-14*. Cell, 1993. **75**(5): p. 843-854.
65. Reinhart, B., et al., *The 21-nucleotide let-7 RNA regulates developmental timing in Caenorhabditis elegans*. Nature, 2000. **403**(6772): p. 901-906.
66. Kozomara, A., M. Birgaoanu, and S. Griffiths-Jones, *miRBase: from microRNA sequences to function*. Nucleic Acids Research, 2018: p. gky1141-gky1141.
67. Lewis, B., C. Burge, and D. Bartel, *Conserved seed pairing, often flanked by adenosines, indicates that thousands of human genes are microRNA targets*. Cell, 2005. **120**(1): p. 15-20.
68. Schetter, A., N. Heegaard, and C. Harris, *Inflammation and cancer: interweaving microRNA, free radical, cytokine and p53 pathways*. Carcinogenesis, 2010. **31**(1): p. 37-49.
69. Singh, S.K., et al., *MicroRNAs--micro in size but macro in function*. The FEBS journal, 2008. **275**(20): p. 4929-4944.
70. Murchison, E. and G. Hannon, *miRNAs on the move: miRNA biogenesis and the RNAi machinery*. Current opinion in cell biology, 2004. **16**(3): p. 223-229.

71. Krol, J., I. Loedige, and W. Filipowicz, *The widespread regulation of microRNA biogenesis, function and decay*. Nature Reviews Genetics, 2010. **11**(9): p. 597.
72. O'Connell, R., D. Rao, and D. Baltimore, *microRNA regulation of inflammatory responses*. Annual review of immunology, 2012. **30**: p. 295-312.
73. Montano, M., *MicroRNAs: miRRORS of health and disease*. Translational research: the journal of laboratory and clinical medicine, 2011. **157**(4): p. 157-162.
74. Harris, A., S.M. Krams, and O.M. Martinez, *MicroRNAs as immune regulators: implications for transplantation*. American Journal of Transplantation, 2010. **10**(4): p. 713-719.
75. Anglicheau, D., et al., *MicroRNA expression profiles predictive of human renal allograft status*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2009. **106**(13): p. 5330-5335.
76. Duong Van Huyen, J.-P., et al., *MicroRNAs as non-invasive biomarkers of heart transplant rejection*. European heart journal, 2014. **35**(45): p. 3194-3202.
77. Givens, R., et al., *Profiling of Circulating Micrnas After Heart Transplantation and During Acute Cellular and Antibody-mediated Rejection*. Circulation, 2014. **130**(Suppl_2): p. A20164.
78. Li, C., et al., *Analysis of intragraft microRNA expression in a mouse-to-rat cardiac xenotransplantation model*. Microsurgery, 2014. **34**(1): p. 44-50.
79. Kellersmann, R., et al., *Comparison of in vivo lymphocyte proliferation between allogeneic and xenogeneic heart transplantation in mice*. Microsurgery: Official Journal of the International Microsurgical Society and the European Federation of Societies for Microsurgery, 2003. **23**(5): p. 498-502.
80. Van Gelder, R., et al., *Amplified RNA synthesized from limited quantities of heterogeneous cDNA*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 1990. **87**(5): p. 1663.
81. Whitehouse, G., A. Hope, and A. Sanchez-Fueyo, *Regulatory T-cell therapy in liver transplantation*. Transplant international: official journal of the European Society for Organ Transplantation, 2017. **30**(8): p. 776.
82. Sayegh, M.H. and L.A. Turka, *The role of T-cell costimulatory activation pathways in transplant rejection*. New England Journal of Medicine, 1998. **338**(25): p. 1813-1821.
83. Higginbotham, L., et al., *Preventing T cell rejection of pig xenografts*. International Journal of Surgery, 2015. **23**: p. 285-290.
84. Lun, A. and U. Sack, *Monitoring organtransplantierter Patienten*, in *Zelluläre Diagnostik*. 2007, Karger Publishers. p. 759-784.
85. Kinnear, G., N.D. Jones, and K.J. Wood, *Costimulation blockade: current perspectives and implications for therapy*. Transplantation, 2013. **95**(4): p. 527.
86. Yamada, A., A.D. Salama, and M.H. Sayegh, *The role of novel T cell costimulatory pathways in autoimmunity and transplantation*. Journal of the American Society of Nephrology, 2002. **13**(2): p. 559-575.
87. Scheffold, A., Bacher, Petra and Kern, Florian *Durchflusszytometrische Analysen zur Detektion antigenspezifischer T-Zellen*, in *Zelluläre Diagnostik und Therapie*, U. Sack, Editor. 2015, De Gruyter: Germany. p. 82-99.
88. Sakaguchi, S., et al., *Immunologic self-tolerance maintained by activated T cells expressing IL-2 receptor alpha-chains (CD25). Breakdown of a single mechanism of self-tolerance causes various autoimmune diseases*. The Journal of Immunology, 1995. **155**(3): p. 1151-1164.
89. Nashan, B., et al., *Randomised trial of basiliximab versus placebo for control of acute cellular rejection in renal allograft recipients*. The Lancet, 1997. **350**(9086): p. 1193-1198.
90. Zhang, M. and Q. Tang, *Manipulating IL-2 and IL-2R in autoimmune diseases and transplantation*. 2015, Future Medicine.

91. Cho, H., et al., *Blockade of 4-1BB (CD137)/4-1BB ligand interactions increases allograft survival*. Transplant international, 2004. **17**(7): p. 351-361.
92. Wang, J., et al., *Role of 4-1BB in Allograft Rejection Mediated by CD8+ T Cells*. American Journal of Transplantation, 2003. **3**(5): p. 543-551.
93. Kirk, A.D., et al., *Treatment with humanized monoclonal antibody against CD154 prevents acute renal allograft rejection in nonhuman primates*. Nature medicine, 1999. **5**(6).
94. Yuan, X., et al., *A novel CD154 monoclonal antibody in acute and chronic rat vascularized cardiac allograft rejection*. Transplantation, 2002. **73**(11): p. 1736-1742.
95. Iwase, H., et al., *Pig-to-baboon heterotopic heart transplantation—exploratory preliminary experience with pigs transgenic for human thrombomodulin and comparison of three costimulation blockade-based regimens*. Xenotransplantation, 2015. **22**(3): p. 211-220.
96. Zhu, J., H. Yamane, and W. Paul, *Differentiation of effector CD4 T cell populations*. Annual review of immunology, 2010. **28**: p. 445-489.
97. Wu, C., et al., *Cytokine gene expression in rejecting cardiac allografts*. Transplantation, 1992. **54**(2): p. 326.
98. Malek, T., *The biology of interleukin-2*. Annual review of immunology, 2008. **26**(26): p. 453-479.
99. Tang, Q., et al., *Central role of defective interleukin-2 production in the triggering of islet autoimmune destruction*. Immunity, 2008. **28**(5): p. 687-697.
100. Cunningham, D., et al., *LOCAL PRODUCTION OF CYTOKINES IN THE HUMAN CARDIAC ALLOGRAFT: A Sequential Study*. Transplantation, 1994. **57**(9): p. 1333-1337.
101. Wan, S., et al., *Human cytokine responses to cardiac transplantation and coronary artery bypass grafting*. The Journal of Thoracic and Cardiovascular Surgery, 1996. **111**(2): p. 469-477.
102. Turner, D., et al., *Cytokine Gene Polymorphism And Heart Transplant Rejection*. Transplantation, 1997. **64**(5): p. 776-779.
103. Tay, S., K. Plain, and G. Bishop, *Role of IL-4 and Th2 responses in allograft rejection and tolerance*. Current opinion in organ transplantation, 2009. **14**(1): p. 16.
104. Gao, W., et al., *Targeting of the chemokine receptor CCR1 suppresses development of acute and chronic cardiac allograft rejection*. The Journal of Clinical Investigation, 2000. **105**(1): p. 35-44.
105. Schroder, K., et al., *Interferon- γ : an overview of signals, mechanisms and functions*. Journal of leukocyte biology, 2004. **75**(2): p. 163-189.
106. Choy, J., *Granzymes and perforin in solid organ transplant rejection*. Cell death and differentiation, 2010. **17**(4): p. 567.
107. Ponciano, V.C., et al., *Tim-3 expression in human kidney allografts*. Transplant immunology, 2007. **17**(3): p. 215-222.
108. Sabek, O., et al., *Quantitative detection of T-cell activation markers by real-time PCR in renal transplant rejection and correlation with histopathologic evaluation*. Transplantation, 2002. **74**(5): p. 701-707.
109. Li, M., et al., *A novel and effective method to generate human porcine-specific regulatory T cells with high expression of IL-10, TGF- β 1 and IL-35*. Scientific Reports, 2017. **7**.
110. Pilat, N., et al., *Treg-therapy allows mixed chimerism and transplantation tolerance without cytoreductive conditioning*. American journal of transplantation: official journal of the American Society of Transplantation and the American Society of Transplant Surgeons, 2010. **10**(4): p. 751-762.
111. Hirschberger, S., L.C. Hinske, and S. Kreth, *MiRNAs: dynamic regulators of immune cell functions in inflammation and cancer*. Cancer letters, 2018. **431**: p. 11-21.
112. Weiland, M., et al., *Small RNAs have a large impact: circulating microRNAs as biomarkers for human diseases*. RNA biology, 2012. **9**(6): p. 850-859.

113. Ludwig, N., et al., *Distribution of miRNA expression across human tissues*. Nucleic acids research, 2016. **44**(8): p. 3865-3877.
114. Leidinger, P., et al., *The human miRNA repertoire of different blood compounds*. BMC genomics, 2014. **15**(1): p. 474.
115. Shaked, A., et al., *An ectopically expressed serum miRNA signature is prognostic, diagnostic, and biologically related to liver allograft rejection*. Hepatology (Baltimore, Md.), 2017. **65**(1): p. 269-280.
116. Gradek, W., et al., *Routine surveillance endomyocardial biopsy continues to detect significant rejection late after heart transplantation*. The Journal of heart and lung transplantation: the official publication of the International Society for Heart Transplantation, 2001. **20**(5): p. 497-502.
117. Möhnle, P., et al., *MicroRNAs 143 and 150 in whole blood enable detection of T-cell immunoparalysis in sepsis*. Molecular Medicine, 2018. **24**(1): p. 54.
118. Wang, H., et al., *Evidence for serum miR-15a and miR-16 levels as biomarkers that distinguish sepsis from systemic inflammatory response syndrome in human subjects*. Clinical chemistry and laboratory medicine, 2012. **50**(8): p. 1423-1428.
119. Yan, L., et al., *The role of microRNA-16 in the pathogenesis of autoimmune diseases: A comprehensive review*. Biomedicine & Pharmacotherapy, 2019. **112**: p. 108583.
120. Zhang, H., et al., *MicroRNA-93 promotes the tumorigenesis of osteosarcoma by targeting TIMP2*. Bioscience reports, 2019. **39**(8).
121. Honardoost, M.A., et al., *Integrative computational mRNA–miRNA interaction analyses of the autoimmune-deregulated miRNAs and well-known Th17 differentiation regulators: An attempt to discover new potential miRNAs involved in Th17 differentiation*. Gene, 2015. **572**(2): p. 153-162.
122. O Sullivan, J.F., et al., *miRNA-93-5p and other miRNAs as predictors of coronary artery disease and STEMI*. International journal of cardiology, 2016. **224**: p. 310-316.

10 DANKSAGUNG

Zu der Entstehung dieser Arbeit haben viele Personen direkt oder indirekt beigetragen, denen ich an dieser Stelle meinen Dank aussprechen möchte.

Mein ganz besonderer Dank gilt meiner Doktormutter Frau Prof. Dr. Dr. Simone Kreth für die Bereitstellung des sehr interessanten Themas, sowie ihre Zeit, ihr Verständnis, die gute Betreuung und konstruktive Kritik während der Erstellung dieser Dissertation.

Ebenfalls großer Dank gilt meinem Betreuer Herrn PD Dr. Jan-Michael Abicht, der nicht nur die Durchführung des tierexperimentellen Teils dieser Dissertation ermöglicht hat, sondern mir stets mit seinem Rat zur Seite stand. Danke für die gute persönliche und fachliche Betreuung.

Ich bedanke mich bei Herrn Prof. Dr. Bernhard Zwißler für die Möglichkeit meine Doktorarbeit an der Klinik für Anaesthesiologie durchzuführen.

Herzlicher Dank gilt allen derzeitigen und ehemaligen Mitarbeitern und Doktoranden des Labors für die immer hilfsbereite und freundliche Arbeitsatmosphäre. Besonders danken möchte ich hierbei Jessica Rink, Samra Alijagic und Gabriele Gröger für ihre Zeit und die theoretische und praktische Unterstützung beim Erlernen und Durchführen einiger Methoden.

Schließlich gilt ein ganz besonderer Dank meinen Eltern und meinem Ehemann, deren Liebe, Geduld, Unterstützung und Ermutigung zur Durchführung und Vollendung der vorliegenden Arbeit wesentlich beigetragen haben.

11 ANHANG

11.1 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: microRNA Biogenese nach [61, 68, 69].....	11
Abbildung 2: Perfusion im Langendorff-Modus.....	26
Abbildung 3: Perfusion im Working-Heart-Modus.....	27
Abbildung 4: Durchflusszytometrische Bestimmung der Viabilität von Pan T-Zellen.....	42
Abbildung 5: Veränderung der Expression verschiedener Oberflächenantigene auf primären humanen T-Zellen im Laufe des Perfusions- und Kontrollversuches.....	44
Abbildung 6: PD1-mRNA-Expression im Laufe des Perfusions- und Kontrollversuches....	47
Abbildung 7: mRNA-Expression costimulatorischer Zielgene in T-Zellen im Laufe des Perfusions- und Kontrollversuches.....	48
Abbildung 8: mRNA-Expression verschiedener Th1-Zytokine in primären humanen T-Zellen im Laufe des Perfusions- und Kontrollversuches.....	49
Abbildung 9: mRNA-Expression verschiedener Th2-Zytokine in primären humanen T-Zellen im Laufe des Perfusions- und Kontrollversuches.....	51
Abbildung 10: mRNA-Expression des Chemokins IL-8 in primären humanen T-Zellen im Laufe des Perfusions- und Kontrollversuches.....	52
Abbildung 11: mRNA-Expression verschiedener Zielgene in regulatorischen T-Zellen im Laufe des Perfusions- und Kontrollversuches.....	53
Abbildung 12: mRNA-Expression in zytotoxischen T-Zellen im Laufe des Perfusions- und Kontrollversuches.....	54
Abbildung 13: miRNA-Expression in primären humanen T-Zellen im Laufe des Perfusions- und Kontrollversuches.....	55

11.2 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Versuche der kardialen Xenotransplantation am Menschen	4
Tabelle 2: Liste der Perfusionsversuche und der zugehörigen Kontrollen	22
Tabelle 3: Absorptions- und Emissionsmaximum der Fluorochrome	40
Tabelle 4: Relative Expression der Oberflächenantigene auf CD4+ T-Lymphozyten zum Zeitpunkt T1	43
Tabelle 5: Relative Expression der Oberflächenantigene auf CD8+ T-Lymphozyten zum Zeitpunkt T1	43

11.3 Abkürzungsverzeichnis

ACE-Hemmer	Angiotensin Converting Enzyme Hemmer
ACR	acute cellular rejection
ACXR	acute cellular xenogenic rejection
ADCC	antibody dependent cellular cytotoxicity
AHXR	acute humoral xenogenic rejection
AMR	Antibody-mediated Rejection
APC	Antigenpräsentierender Zellen
AR	Acute Rejection
aRNA	Antisense RNA
BE	Base Excess
CD	Cluster of Differentiation
cDNA	copy DNA
CP-Wert	Crossing-Point
Ct-Wert	Cycle-Threshold
DNA	Desoxyribonucleic Acid
dNTPs	Desoxyribonukleosidtriphosphate
DXR	delayed xenograft rejection
E-Selectin	endothelial selectin
Fc-Rezeptor	fragment crystallisable receptor
FoxP3	Forkhead-Box-Protein P3
FRET-	Fluoreszenz-Resonanzenergie-Transfer
FSC	Forward Scatter
Gal-Epitop	Galactose- α (1,3)-Galactose-Epitop
GP1b-Rezeptor	Glykoprotein-Ib-Rezeptor
GvHR	Graft-versus-Host-Reaktion
GZM β	Granzyme β
HAR	Hyperakuten Abstoßungsreaktion

HBSS	Hanks‘ Balanced Salt Solution
ICOS	Inducible T-cell Costimulator
IFN- γ	Interferon- γ
IgG	Immunglobulinklasse G
IgM	Immunglobulinklasse M
IL	Interleukin
MAC	Membrane Attack Complex
MGB	Minor Groove Binder
MHC-I	Major Histocompatibility Complex der Klasse I
MHC-II	Major Histocompatibility Complex der Klasse II
miR	microRNA
miRNA	microRNA
mRNA	messenger RNA
NK-Zellen	natürliche Killerzellen
OX40	Tumor necrosis factor receptor superfamily member 4
PAI-1	Plasminogenaktivatorinhibitor Typ 1
PBS	phosphate buffered saline
pCO ₂	Kohlendioxidpartialdruck
PD1	Programmed cell death protein 1
PERV	porcine endogene Retroviren
pO ₂	Sauerstoffpartialdruck
PRF1	Perforin1
pri-miRNA	Primär-microRNA-Transkript
P-Selectin	Platelet-Selectin
RISC-Komplex	RNA-induced silencing complex)
RNA	Ribonucleic Acid
rpm	Rounds per minute
RT-qPCR	quantitative real-Time Polymerase-Kettenreaktion

SCC	Sideward Scatter
TCR	T-Zell-Rezeptors
TF	Tissue Faktor
TGF β	Transforming growth factor β
Th1-Zellen	T-Helfer-Zellen Typ 1
Th2-Zellen	T-Helfer-Zellen Typ 2
TIM3	T-cell immunoglobulin and mucin-domain containing-3
TNF- α	Tumornekrosefaktor- α
Tregs	Regulatorische T-Zellen
UPL-Sonden	Universal Probes Library Sonden)
3'UTR	3'-untranslatierte Region



LUDWIG-
MAXIMILIANS-
UNIVERSITÄT
MÜNCHEN

Promotionsbüro
Medizinische Fakultät



Eidesstattliche Versicherung

Tariq, Maliha

Name, Vorname

Ich erkläre hiermit an Eides statt,

dass ich die vorliegende Dissertation mit dem Titel

Charakterisierung der T-Zell-Antwort im kardialen Xenotransplantationsmodell

selbständig 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

Maliha Tariq

Unterschrift Doktorandin bzw. Doktorand