

Aus dem Institut der experimentellen Chirurgie der Klinik und Poliklinik für Chirurgie,
Labor für chronische Immunpathologie, Universität Regensburg

TREM-1 als Zielstruktur zur Verlängerung des Transplantatüberlebens nach Herztransplantation

Inaugural - Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades der Biomedizinischen Wissenschaften

Dr. rer. physiol.

der

Fakultät für Medizin

der Universität Regensburg

vorgelegt von

Mag. biol. Gabriela Schiechl

aus

Salzburg (Österreich)

2012

Dekan Prof. Dr. Dr. Torsten E. Reichert

Fachmentorat

Prof. Dr. Stefan Fichtner-Feigl	(Betreuer)
Prof. Edward Geissler, PhD	(1. Mentor)
Prof. Dr. Birgit Sawitzki	(2. Mentor)

Tag der mündlichen Prüfung: 07. Februar 2013, 17:30 Uhr

SELBSTÄNDIGKEITSERKLÄRUNG

Ich, Mag. biol. Gabriela Schiechl, geboren am 04.08.1981 in Radstadt (Österreich) erkläre hiermit, dass ich die eingereichte Arbeit mit dem Titel

*TREM-1 als Zielstruktur zur Verlängerung des
Transplantatüberlebens nach
Herztransplantation*

an der Klinik und Poliklinik für Chirurgie, Labor für chronische Immunpathologie
unter der Leitung von Prof. Dr. Stefan Fichtner-Feigl
mit Unterstützung von Prof. Edward Geissler, PhD und Prof. Dr. Birgit Sawitzki

ohne unzulässige Hilfe Dritter und ohne Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel
angefertigt habe.

Die aus anderen Quellen direkt oder indirekt übernommenen Daten und Konzepte sind unter
Angabe der Quelle gekennzeichnet. Insbesondere habe ich nicht die entgeltliche Hilfe von
Vermittlungs- bzw. Beratungsdiensten (Promotionsberater oder andere Personen) in
Anspruch genommen.

Die Arbeit wurde bisher weder im In- noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer
anderen Prüfungsbehörde vorgelegt.

Regensburg, 29. Juni 2012

.....
Ort, Datum

.....
eigenhändige Unterschrift
des Promovenden

If you can dream it, you can do it.
Walt Disney (1901-1966)

INHALTSVERZEICHNIS

1.	EINLEITUNG	1
1.1.	Geschichte der Organtransplantation	1
1.2.	Grundlagen der Transplantationsimmunologie	3
1.2.1	<i>Begriffsdefinition in der Transplantation</i>	3
1.2.2	<i>Erkennung von Alloantigenen</i>	4
1.2.3	<i>Formen der Abstoßungsreaktion</i>	6
1.2.3.1	<i>Hyperakute Abstoßung</i>	6
1.2.3.2	<i>Akute Abstoßung</i>	6
1.2.3.3	<i>Chronische Abstoßung</i>	7
1.3.	Immunsuppressiva nach Organtransplantation	9
1.3.1	<i>Risiken einer immunsuppressiven Behandlung</i>	9
1.4.	Immunsystem und Abstoßung	10
1.4.1	<i>Myd88 als wichtiger Faktor in der angeborenen Immunität</i>	10
1.4.1.1	<i>Myd88 in der Organtransplantation</i>	12
1.4.2	<i>Ko-stimulatorische Rezeptoren – TREM-1</i>	12
1.4.2.1	<i>TREM-1 und dessen amplifizierende Funktion in der PRR Signalkaskade</i>	13
1.4.2.2	<i>Klinische Relevanz von TREM-1</i>	14
1.5.	Zielsetzung	16
2.	MATERIAL und METHODEN	17
2.1.	Material	17
2.1.1	<i>Allgemeines Material</i>	17
2.1.2	<i>Humanes Gewebematerial</i>	22
2.1.3	<i>Mäuse</i>	22
2.2.	Methoden	22
2.2.1	<i>Herztransplantation</i>	22
2.2.1.1	<i>Tiermodelle</i>	23
2.2.1.2	<i>Operationstechnik der heterotropen Herztransplantation</i>	24
2.2.2	<i>Antagonistisches Peptid zur Inhibierung von TREM-1</i>	27
2.2.3	<i>Histologische Untersuchungen</i>	27
2.2.3.1	<i>Hematoxylin/Eosin Färbung (H.E.)</i>	27
2.2.3.2	<i>Masson-Trichromfärbung</i>	28
2.2.3.3	<i>Immunhistologische Färbungen</i>	28
2.2.4	<i>Zellbiologische Methoden</i>	30

2.2.4.1	Isolation von infiltrierenden Leukozyten im Transplantat.....	30
2.2.4.2	Gewinnung von PBMC's aus dem Blut des Rezipienten	30
2.2.4.3	Lymphozytenisolierung aus der Milz	31
2.2.4.4	Zellzahl- und Vitalitätsbestimmung.....	31
2.2.4.5	Zellkulturbedingungen	32
2.2.4.6	Magnetische Sortierung von Zellen	32
2.2.4.7	Aktivitätsanalyse der CD11b Zellen	32
2.2.4.8	Gemischte Leukozyten Reaktion	33
2.2.4.9	“Enzyme-linked Immunosorbent Assay” (ELISA)	33
2.2.5	<i>In vivo Methoden - Adoptiver Transfer von Lymphozyten</i>	33
2.2.6	<i>Molekularbiologische Methoden</i>	34
2.2.6.1	RNA Isolation	34
2.2.6.2	RNA-Quantifizierung	35
2.2.6.3	Reverse Transkription	35
2.2.6.4	Primer.....	35
2.2.6.5	Real-Time Polymerase-Kettenreaktion (PCR).....	36
2.2.6.6	DNA-Elektrophorese	37
2.2.6.7	Isolierung von DNA-Fragmenten durch Gelextraktion.....	38
2.2.6.8	DNA-Sequenzierung	38
2.2.7	<i>Durchflusszytometrie</i>	38
2.2.7.1	FACS Färbemethode	40
2.2.8	<i>Bestimmung von Zytokinen mittels „Cytometric Bead Array“ (CBA)</i>	41
2.2.9	<i>Statistik</i>	42
3.	<i>ERGEBNISSE</i>	43
3.1.	<i>Charakteristika einer chronisch Abstoßungsreaktion nach Herztransplantation</i>	43
3.2.	<i>Myd88 in der chronischen Transplantatabstoßung</i>	54
3.3.	<i>Determinierung des Ko-Rezeptors TREM-1 im Verlauf einer Transplantatabstoßung</i>	56
3.3.1	<i>TREM-1 in der humanen Organtransplantation</i>	56
3.3.2	<i>TREM-1⁺ APC in der murinen chronischen Transplantatabstoßung</i>	57
3.4.	<i>Inhibierung von TREM-1 im Verlauf der Organabstoßung</i>	61
3.4.1	<i>Verminderung der chronischen Abstoßungsreaktion bei Blockade von TREM-1</i>	61
3.4.2	<i>Funktion alloreaktiver CD11b⁺ TREM-1⁺ APC auf die Zytokinexpression CD4⁺ T Lymphozyten</i>	68
3.4.3	<i>Spezifische Untersuchungen der adaptiven Immunantwort im Verlauf einer Inhibierung von TREM-1</i>	69
3.4.4	<i>TREM-1⁺ CD11b⁺ APC wirken zelltoxisch auf naive CD4⁺ Lymphozyten in vitro</i>	73
3.5.	<i>Initiale Inhibierung von TREM-1 im Verlauf der chronischen Abstoßungsreaktion</i>	77
3.5.1	<i>Auswirkungen einer initialen Inhibierung von TREM-1 auf die adaptive Immunantwort</i>	83

3.6.	<i>TREM-1 in der akuten Transplantatabstoßung</i>	86
3.6.1	<i>Blockade von TREM-1 im Verlauf einer subakuten Abstoßung ist insuffizient für das Überleben der Transplantate</i>	88
3.7.	<i>Zusammenfassung der Ergebnisse</i>	95
4.	<i>DISKUSSION</i>	97
4.1.	<i>Infiltration alloreaktiver Zellpopulationen im Verlauf der chronischen Abstoßungsreaktion im heterotropen Mausmodell</i>	98
4.2.	<i>Das therapeutische Potential von Myd88 in der Organtransplantation</i>	99
4.3.	<i>Detektion von TREM-1 im Spenderorgan während einer chronischen Abstoßungsreaktion im Menschen</i>	100
4.4.	<i>Funktion von TREM-1 in murinen Abstoßungsreaktionen nach kardialer Organtransplantation</i>	101
4.5.	<i>TREM-1⁺ CD11b⁺ APC aktivieren die Differenzierung von Effektor T Zellen im Verlauf der chronischen Abstoßungsreaktion</i>	104
4.6.	<i>Regulierung des fibrotischen Organumbaus in der chronischen Abstoßungsreaktion durch TREM-1</i>	106
5.	<i>ZUSAMMENFASSUNG</i>	108
6.	<i>LITERATURVERZEICHNIS</i>	110
7.	<i>ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS</i>	118
8.	<i>ABBILDUNGSVERZEICHNIS</i>	122
9.	<i>TABELLENVERZEICHNIS</i>	126
10.	<i>LEBENS LAUF</i>	127
11.	<i>WORTE des DANKES</i>	130

*Ich habe keine besondere Begabung,
sondern bin nur leidenschaftlich neugierig.*
(Albert Einstein)

1. EINLEITUNG

Die „deutsche Stiftung für Organtransplantation“ (DSO) registrierte im Jahre 2011 insgesamt 4.054 Organe, die in deutschen Transplantationszentren transplantiert wurden. Der Bedarf an Transplantationen ist aber weit größer als das Angebot. Rund 12.000 Patienten warten auf ein funktionstüchtiges Organ. Vor über 100 Jahren war die Idee des Organersatzes noch ungewöhnlich. Damals warb Otto Lanz für die Organtransplantation und definierte diese als eine Therapieform, „welche bestrebt ist, dasjenige Organ, das funktionsuntüchtig geworden ist, dem Organismus zu ersetzen“ (Otto Lanz, 1894). Es erscheint heutzutage selbstverständlich, dass komplexe innere Krankheiten auf dem Versagen eines bestimmten Organs beruhen und dass sie durch den Ersatz dieses Organs behandelt werden können. Somit überrascht umso mehr, dass vor den 1817er Jahren niemand einen belegbaren Versuch angestrebt hat, innere Krankheiten durch die Verpflanzung von Organen zu behandeln. Die Organtransplantation kam erst in der Zeit von 1817 bis 1930 auf.

1.1. Geschichte der Organtransplantation



Die Idee, fehlende Körperteile oder schwer geschädigte Organe durch Transplantation zu ersetzen, übte auf die Menschen seit jeher große Faszination aus. Zahlreiche Sagen, Mythen und Legenden, die bis 500 v. Chr. zurückverfolgt werden können, berichten von Organ- und Gewebeübertragungen. Der Legende nach sollen die beiden Schutzheiligen der Medizin, Cosmas und Damian, im 3. Jhdt. n. Chr. einem weißen Missionar, der sein Bein verloren hatte, erfolgreich das Bein eines Mohren verpflanzt haben (s. Abb. 1).

Abb. 1: Beinwunder Cosmas und Damian. Maler unbekannt, Jahr: Anfang 16. Jhdt., zur Verfügung gestellt vom Württembergischem Landesmuseum Stuttgart (1).

Die ersten belegbaren Versuche einer Organverpflanzung gehen auf die Anfänge der letzten zwei Jhdt. zurück. So fand die erste erfolgreiche Hauttransplantation am Menschen im Jahre 1817 statt und wurde von Astley Cooper am Guy's Hospital London durchgeführt. 1861 kam es in der humanen Chirurgie zur ersten Transplantation von einem Stück Stirnknochen im Rahmen einer Nasenrekonstruktion durch Louis Léopold Ollier. Seit 1861 wurde mit der Transplantation von Nervenstückchen experimentiert, zunächst am Tier unter biologischen Fragestellungen, später auch am Menschen mit therapeutischem Ziel (3). Auch vor der Verpflanzung von Hirngewebe am Tier machte man nicht halt. So versuchte 1890 der New Yorker Forscher Gilman Thompson, Großhirn-Anteile von ausgewachsenen Katzen in das Gehirn von Hunden zu verpflanzen. Ein wichtiger Teil der rekonstruktiven Chirurgie war die Chirurgie der Blutgefäße. Durch Alexis Carrel kam es zu einer technischen Weiterentwicklung der Gefäßnaht, wodurch Transplantationen von Venen und Arterien am Tier untersucht werden konnten (4, 5). 1905 wurde die erste erfolgreiche heterotope Herztransplantation bei Hunden durchgeführt, nach der das Herz ca. zwei Stunden schlug (6). Die erste erfolgreiche solide Organtransplantation am Menschen gelang 1954 Joseph Murray im Peter Bent Brigham Hospital in Boston, bei der eine langfristig erfolgreiche Übertragung einer Niere von einem Lebendspender auf seinen eineiigen Zwilling Bruder erfolgte (7). In den darauffolgenden Jahren konnten aus den USA erfolgreiche Nieren- (1954), Leber- (1967), Lungen- (1963) und Pankreastransplantationen (1976) gemeldet werden. Die erste Herztransplantation am Menschen gelang 1967 Christiaan Barnard in Südafrika, nach experimentellen Vorversuchen durch Norman Lower und Richard Shumway aus Stanford.

Im chronologischen Verlauf der Transplantationsgeschichte, erfolgten auch Bestrebungen, die alloreaktive Immunreaktion gegen das Spenderorgan zu untersuchen. Der Pathologe Görge Schöne äußerte als erster 1912 die Vermutung, dass die Abstoßung von Transplantaten auf einen immunologischen Prozess zurückzuführen ist. Im Jahre 1923 beschrieb Carl Williams die histologischen Unterschiede zwischen syngen (genetisch identisch) und allogenen (genetisch verschieden) transplantierten Nieren (8) und führte die Unterschiede auf biologische Unverträglichkeiten zurück. Durch seine tierexperimentellen Studien konnte schließlich der britische Zoologe Sir Peter Medawar 1942 die immunologische Grundlage der Abstoßungsreaktion in transplantiertem Gewebe genauer darlegen.

Mit der ersten erfolgreich durchgeführten Organtransplantation 1954, kam auch die Entwicklung von Immunsuppressiva immer mehr in das Interessensgebiet der Forscher. 1960 wurden z.B. Kortikosteroide das erste Mal bei Patienten nach Organtransplantation eingesetzt (9, 10).

Der Verbesserung von Operationstechniken und der Entwicklung potenter Immunsuppressiva ist es zu verdanken, dass Organtransplantationen heute erfolgreich in der klinischen Routine

etabliert werden konnten (s. Abb. 2). In Deutschland wurden 2011 laut der DSO 366 Herztransplantationen durchgeführt. Die Fünf-Jahres-Überlebensrate liegt etwa bei 65%. Nach erfolgreicher Transplantation müssen die Patienten aber ein Leben lang Medikamente einnehmen, die oftmals mit Risiken, Nebenwirkungen und toxischen Effekten verbunden sind. Um das Überleben der Organe durch gezielte Therapieansätze zu verlängern, ist es daher von großer Bedeutung die Pathogenese der Abstoßungsreaktion besser zu verstehen.

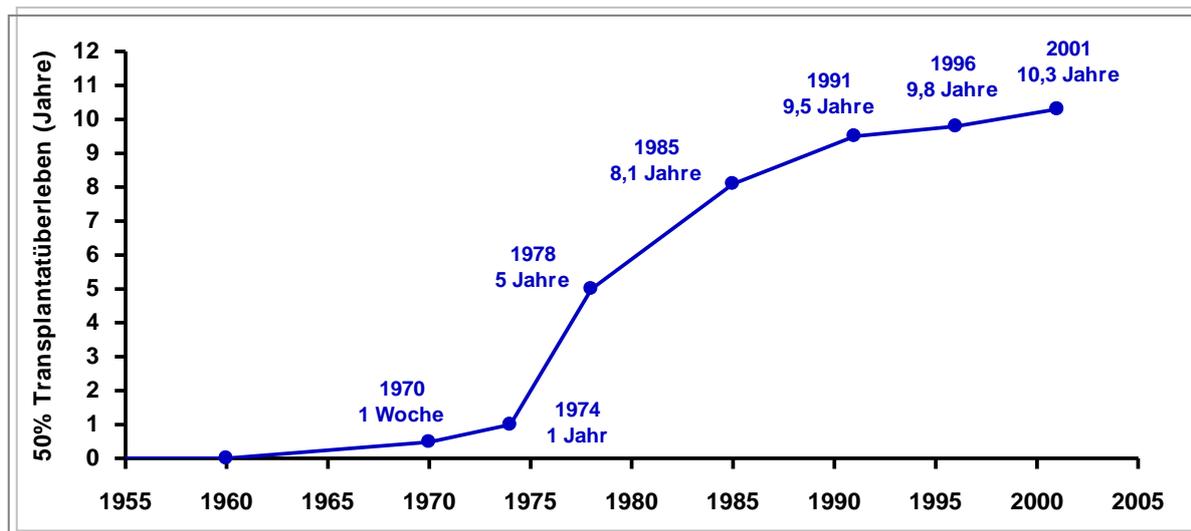


Abb. 2: Geschichtliche Perspektive in der Herztransplantation; modifiziert nach (11).

1.2. Grundlagen der Transplantationsimmunologie

Die Entstehung der Transplantationsimmunologie resultierte u.a. aus den Erkenntnissen der experimentellen und klinischen Transplantation. Sir Peter Medawar und Thomas Gibson erkannten in ihren tierexperimentellen Untersuchungen, dass die immunologische Sensibilisierung spenderspezifisch ist und legten so den Grundbaustein für das immunologische Verständnis der Abstoßungsreaktion und der Organtoleranz (12, 13). Heute weiß man, dass sich die Immunantwort gegen Transplantate aus vielen Prozessen zusammensetzt und die lokale Entzündung sowie die Antigenerkennung eine wichtige Rolle spielen.

1.2.1 Begriffsdefinition in der Transplantation

Die Übertragung von Zellen, Geweben oder Organen (den Transplantaten) von einem Spender (Donor) auf einen Empfänger (Rezipienten) wird unter dem Begriff der Transplantation zusammengefasst. Bei identischem Spender- und Empfängermaterial spricht man von einer Autotransplantation. Die Organverpflanzungen zwischen genetisch identischen Individuen (eineiige Zwillinge bzw. Inzuchtstämme) wird als syngene Transplantation bezeichnet. Bei Allotransplantationen (allogene Transplantation) wird ein sogenanntes Allotransplantat zwischen genetisch unterschiedlichen Individuen einer Spezies übertragen.

Eine xenogene Organverpflanzung hingegen, ist die Transplantation zwischen verschiedenen Spezies. Werden die Spenderorgane in ihre ursprüngliche anatomische Lage verpflanzt, wird der Begriff der orthotopen Transplantation verwendet. Bei einer heterotopen Transplantation wird das Organ in einem nicht natürlichen anatomischen Ort in den Empfänger implantiert.

1.2.2 Erkennung von Alloantigenen

Eine mögliche Komplikation bei der Organ- und Gewebetransplantation stellt die Immunreaktion des Empfängers gegen das körperfremde Transplantat dar. Dem adaptivem Immunsystem werden dabei Antigene durch den Haupthistokompatibilitätskomplex (MHC, „Major Histocompatibility Complex“) auf der Zelloberfläche präsentiert. Beim Menschen werden sie auch als HLA („Human Leukocyte Antigen“) bezeichnet. Die MHC-Moleküle sind in zwei Subklassen unterteilt, MHC-Klasse-I (MHC-I) und MHC-Klasse-II (MHC-II). Mit Hilfe des MHC-I-Signalwegs werden infizierte und entartete Zellen, die körperfremde Proteine herstellen, über zytotoxische $CD8^+$ T Zellen identifiziert und bekämpft. Für die Aktivierung der MHC-I-Moleküle müssen endogene und zytoplasmatische Antigene von Proteosomen im Zytosol umgewandelt und über das Transmembranprotein TAP („Transporter associated with Antigen Processing“) in das ER (endoplasmatisches Retikulum) eingeschleust werden. Die gebildeten Peptide werden in Verbindung mit dem MHC-I (Bildung im ER) über den Golgi-Komplex zur extrazellulären Matrix ausgeschleust und den $CD8^+$ T Lymphozyten präsentiert. MHC-II-Antigene, die nur auf Antigen-präsentierenden-Zellen (APC) exprimiert werden, können über extrazelluläre Peptide $CD4^+$ T Helfer Zellen (Th) aktivieren. Zu Beginn der Antigenerkennung erfolgt die Bildung der MHC-II Moleküle im ER. Mit Hilfe einer „Invariant Chain“ werden die Peptidbindungstaschen blockiert, solange sich der MHC-II Komplex im ER befindet. Erst bei Verschmelzung der Antigen-beinhaltenden-Phagolysosomen mit dem Vesikel des MHC-II Komplexes löst sich die Verbindung zur „Invariant Chain“, um eine Ligation mit dem MHC-II zu ermöglichen. Anschließend wird der gesamte Komplex an der Membran präsentiert und kann von $CD4^+$ T Zellen erkannt werden.

Eine T Zelle benötigt zwei synergistische Signale für ihre Aktivierung. Das erste Signal erfolgt über die Interaktion vom T-Zellrezeptor (TCR) mit dem MHC-Komplex auf APC. Das zweite Signal wird durch die Ligation ko-stimulatorischer Moleküle (z.B. CD40 und CD40L) auf derselben T Zelle vermittelt, welches die Weiterleitung des TCR verstärkt und kontrolliert. Dabei führt nur eine Bindung des TCR mit dem MHC-Peptid bei gleichzeitiger Ko-Stimulation zu einer vollen Aktivierung der T Zelle. Fehlt das ko-stimulatorische Signal, so fällt die T Zelle in einen Zustand der Anergie, d.h. funktionelle Inaktivität.

Die Erkennung von Alloantigenen, die über den MHC-Komplex präsentiert werden, kann über einen direkten oder indirekten Weg erfolgen (s. Abb. 3) (14, 15). Für die direkte Erkennung muss die T Zelle über den TCR mit dem allogenen MHC-Komplex einer sog. „passenger“

APC aus dem Transplantat reagieren (16). Es kommt zu einer schnellen Immunantwort, die in der Frühphase nach Allotransplantation und in der akuten Abstoßung eine dominante Rolle spielt. Bei der indirekten Fremderkennung nehmen körpereigene APC allogene MHC-Komplexe auf. Das prozessierte Antigen wird in Form eines Peptidfragments über eigene MHC-Moleküle präsentiert. Es folgt eine Aktivierung von alloreaktiven $CD4^+$ T Helfer Zellen, die eine Produktion von Zytokinen einleiten oder direkte Zell-Zell-Kontakte arrangieren. Dadurch werden B Zellen, $CD8^+$ T Zellen und Makrophagen aktiviert, die ihrerseits die Antikörperproduktion, antigenspezifische Zellyse und Gewebsschädigung einleiten. Die zytotoxischen $CD8^+$ T Lymphozyten wirken nach Antigenerkennung durch direkten Zell-Zell-Kontakt lytisch auf die Zielzelle. Dieses Zusammenspiel der Effektormechanismen resultiert schließlich in der Zerstörung und Abstoßung des Transplantats.

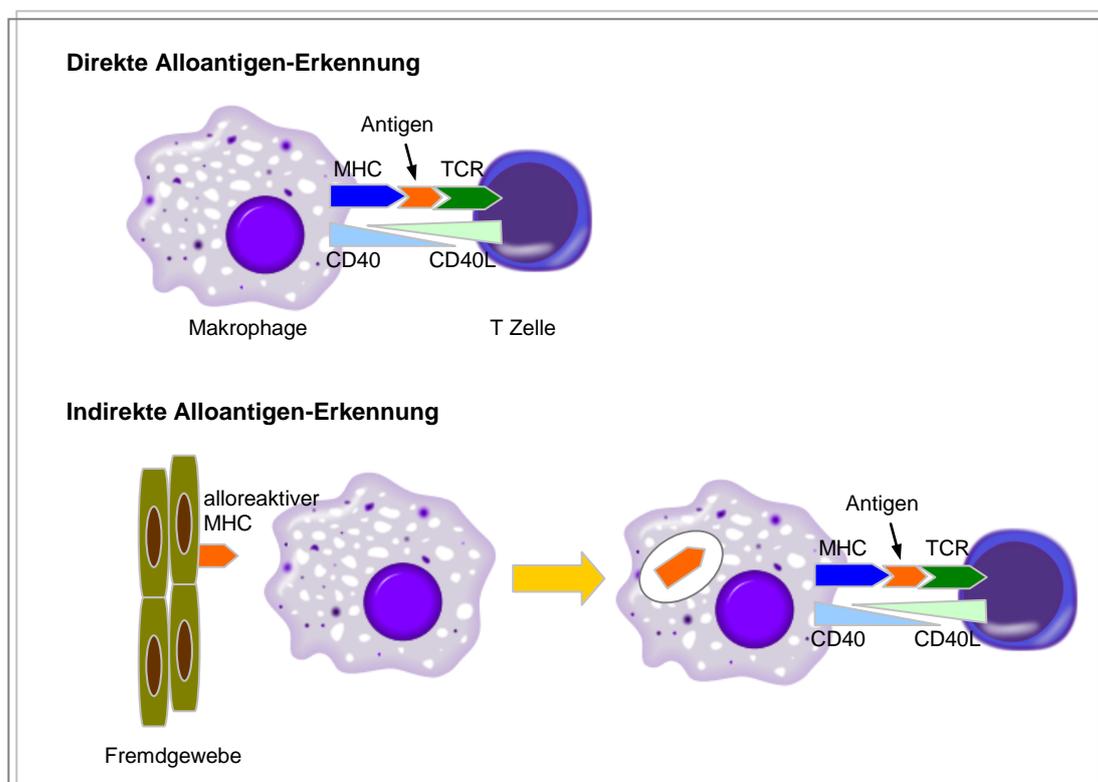


Abb. 3: Mechanismen der Transplantatabstoßung.

Bei der direkten Antigenerkennung kommt es zu einer Interaktion zwischen einem allogenen MHC-Komplex und einer T Zelle. Die indirekte Antigenerkennung erfolgt bei Aufnahme des allogenen MHC-Moleküls vom Transplantat in körpereigene APC. Die Fragmente des Peptids werden anschließend über körpereigene MHC-Komplexe präsentiert. Es folgt eine Aktivierung von T Effektorzellen, modifiziert nach (17).

Eine andere Gruppe von Proteinen, die ebenfalls eine Abstoßungsreaktion auslösen können, werden als mHAGs („Minor Histocompatibility Antigens“, Nebenhistokompatibilitätsantigene) bezeichnet. mHAGs sind polymorphe Proteine des fremden Gewebes, die von APC prozessiert und den T Zellen über MHC-Moleküle präsentiert werden. Bisher konnte die

Relevanz des mHAGs in der GvHD („Graft Versus Host Disease“) aber auch der soliden Organtransplantation beschrieben werden (18, 19).

1.2.3 Formen der Abstoßungsreaktion

Die Abstoßungsreaktion gegen das Spenderorgan stellt eine häufige und schwerwiegende Komplikation nach einer Transplantation. Sie ist, neben Nieren- und Herzinsuffizienz, Haupttodesursache bei Patienten nach Herztransplantation. Im Wesentlichen wird chronologisch zwischen hyperakuter, akuter und chronischer Abstoßungsreaktion unterschieden (s. Abb. 4).

1.2.3.1 Hyperakute Abstoßung

Diese Form der Abstoßung beruht auf einer Antikörperreaktion, die innerhalb von wenigen Minuten *post transplantationem* einsetzt und zum sofortigen Verlust des Transplantates führen kann. Die Alloantikörper im Blut des Empfängers richten sich noch während der Transplantation gegen das neue Organ. Die Folge ist ein thrombotischer Verschluss der Gefäße. Durch die Überprüfung alloreaktiver Antikörper im Empfänger noch vor der Operation, ist man in der Lage das Spenderorgan entsprechend auszuwählen um eine hyperakute Abstoßungsreaktion weitgehend auszuschließen.

1.2.3.2 Akute Abstoßung

Bei der akuten Transplantatabstoßung handelt es sich um eine rasche Immunantwort, die ohne suppressive Therapie innerhalb von 5-7 Tagen ihre volle Ausprägung erreicht. Sie wird vor allem durch alloantigenspezifische T Lymphozyten vermittelt und führt zu einem vaskulären und parenchymalen Schaden des Transplantats. Es kommt zu einer Reihe von Zell-Zell-Interaktionen, die durch die Ausschüttung von Zytokinen bewirkt werden. Der Schaden des transplantierten Organs, durch eine direkte Lyse von Endothel- und Parenchymzellen, findet im Wesentlichen durch Makrophagen und zytotoxische T Zellen statt.

1.2.3.3 Chronische Abstoßung

Da sich diese Arbeit hauptsächlich mit der chronischen Abstoßungsreaktion beschäftigt, wird dieses Kapitel ausführlicher behandelt.

Die chronische Abstoßung ist ein langsam fortschreitender Prozess und manifestiert sich erst Monate bis Jahre *post transplantationem*. Dabei kommt es zu einer myointimalen Proliferation der Arterien und Arteriolen, die sich in einer Einengung des Gefäßlumens äußert. Histologisch findet eine Zellinfiltration mit Sklerosierung und Fibrosierung des Gewebes statt. Bei Herztransplantationen äußert sich diese Transplantatvaskulopathie in einem Leistungsabfall des Donorherzens, eingeschränkter Ventrikelfunktion, Auftreten von Herzrhythmusstörungen und Myokardinfarkten. Der endgültige Funktionsverlust ist durch einen deutlich beschleunigt verlaufenden Arterioskleroseprozess und einer erhöhten Kollagenablagerung im Transplantat mit der Konsequenz eines fibrotischen Organumbaus gekennzeichnet (20-22). Diese Faktoren stellen das Hauptproblem für Langzeiterfolge der Transplantation dar.

Ursache für die chronische Abstoßung ist ein alloreaktiver Prozess, der durch das Zusammenspiel von APC mit T Lymphozyten vermittelt wird (23-25). $CD4^+$ Th Zellen können durch IL-6, IL-23 und IL- 1β zu Effektorzellen differenzieren und so ihre Funktionalität durch Expression spezifischer Zytokine ausüben. Eines der wichtigsten Zytokine in der chronischen Abstoßungsreaktion ist IL-17 (23, 26). Es wurde gezeigt, dass IL-17 neutrophile Granulozyten rekrutiert, die so ihre Funktionalität in der Transplantatabstoßung ausüben können (27). Außerdem ist in der Literatur eine Interaktion von IL-17 auf kardiale Fibroblasten beschrieben. Dies fördert die Fibrogenese im transplantierten Organ, die letztendlich zu einem Funktionsverlust des Transplantats führen kann (28, 29). Ein weiteres wichtigstes Zytokin in der chronischen Abstoßungsreaktion verkörpert IFN γ . IFN γ wird hauptsächlich von $CD4^+$ Zellen aber auch von NK, $CD8^+$ Zellen und APC produziert (10). In Anwesenheit des Zytokins IL-12 differenzieren naive $CD4^+$ T Lymphozyten zu Th1 Effektorzellen (30), die durch ihre Expression von IFN γ in verschiedensten immunregulatorischen Prozessen beschrieben wurden. Dabei konnte auch gezeigt werden, dass IFN γ die Präsentation von Antigenen auf APC regulieren kann (30).

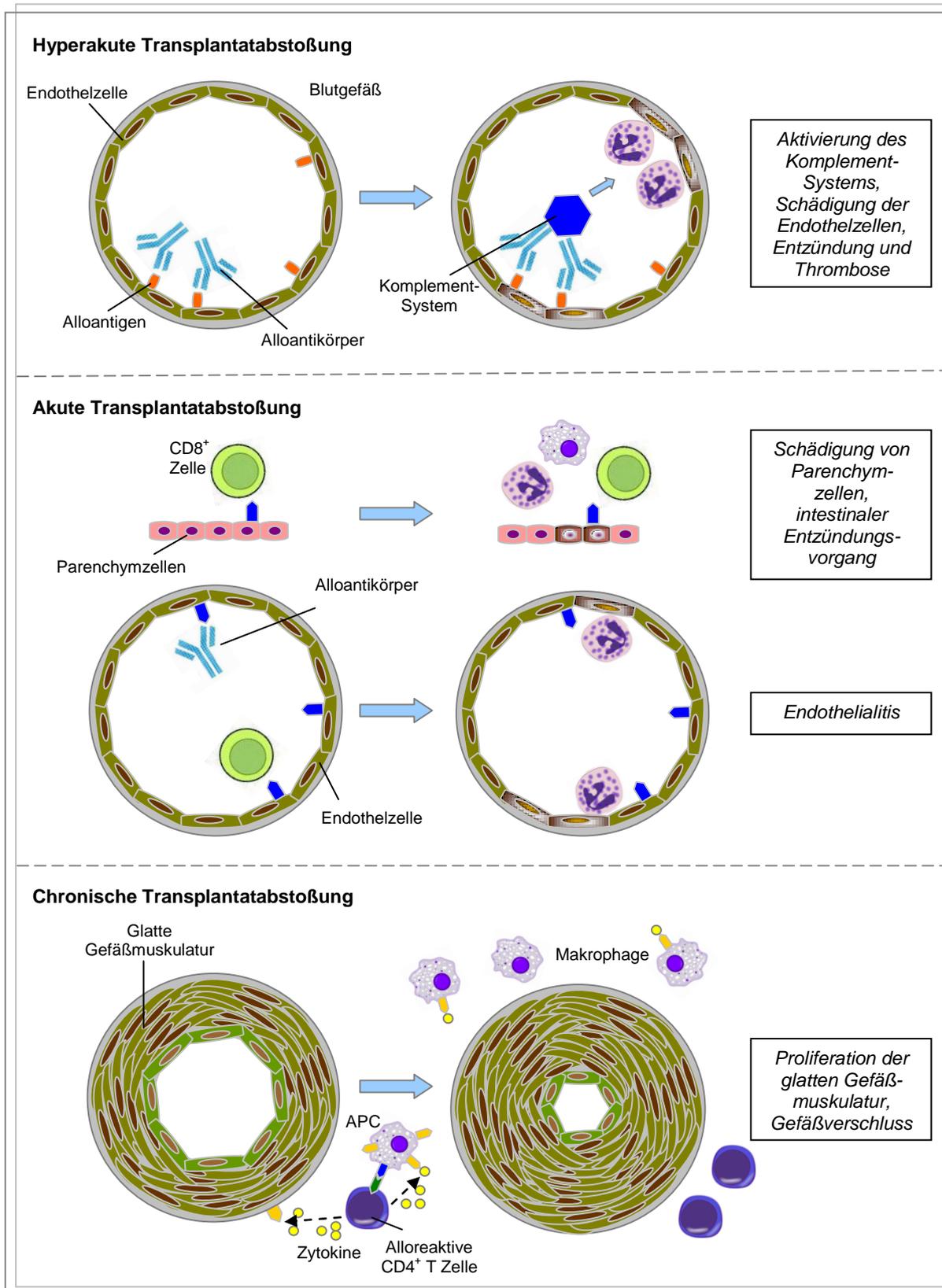


Abb. 4: Immunologische Mechanismen im Verlauf der Transplantatabstoßung.

In der hyperakuten Abstoßung, die über Alloantikörper eingeleitet wird, aktiviert sich in weiterer Folge das Komplementsystem, und führt zu einer Thrombose und Nekrose der Endothelzellen. Bei der akuten Abstoßung wird eine Schädigung der Parenchym- und Endothelzellen vor allem durch alloreaktive CD8⁺ Zellen eingeleitet. In der chronischen Abstoßung zeichnet sich der Funktionsverlust des Transplantats durch einen beschleunigten Arterioskleroseprozess aus, der in weiterer Folge zu einer Proliferation der glatten Gefäßmuskulatur und intimaalem Verschluss des Gefäßes führt. Modifiziert nach (17).

1.3. Immunsuppressiva nach Organtransplantation

Um das Transplantatüberleben und die Organfunktion langfristig zu sichern, sind moderne Immunsuppressiva unabdingbar. Die derzeit verwendeten immunsuppressiven Medikamente in der Transplantationsmedizin hemmen die Zytokinproduktion oder die Proliferation von Lymphozyten. Außerdem werden zur Therapie Antikörper eingesetzt, die Lymphozyten depletieren können (s. Tabelle 1).

Immunsuppressiva	Mechanismus
Calcineurininhibitoren	Inhibierung der Zytokinproduktion von T Zellen durch Unterdrückung des Transkriptionsfaktors NFAT.
DNA Synthesehemmer	Hemmen unspezifisch (Azathioprin) bzw. spezifisch (Mycophenolat mofetil) die DNA-Transkription.
Glukokortikoide	Entzündungshemmende Wirkung durch Inhibierung von APC sowie B und T Zellen (Zellzyklus) und deren Produktion von Zytokinen.
mTOR-Inhibitoren	Eingriff in den Zellzyklus, dadurch Blockade der Proliferation von T Zellen.
Anti-IL-2-Rezeptor-Antikörper	Wirken gezielt auf T Zellen durch Inhibierung des IL-2 Rezeptors.
Anti-CD3-Antikörper	Depletion von reifen CD3 ⁺ T Lymphozyten.
Antithymozytenglobuline	Depletion von T Zellen durch Einleitung der Lyse oder Apoptose.

Tabelle 1: Darstellung der gängigsten Immunsuppressiva mit ihrem Wirkmechanismus in der soliden Organtransplantation.

1.3.1 Risiken einer immunsuppressiven Behandlung

Die Therapiestrategien mit Immunsuppressiva und deren Kombination mit Antikörpern erzielen ausgesprochen gute Effekte in der Inhibition des erworbenen Immunsystems, insbesondere zur Unterdrückung der T und auch B Zell-abhängigen Abstoßungsreaktionen. Dennoch ist diese Therapieform mit einer großen Anzahl an schweren Nebenwirkungen, toxischen Effekten und Risiken verbunden, die die Lebensqualität des Patienten stark einschränken (31).

Eine Therapie mit Cyclosporin in zu hohen Dosen mit Leber- und Nierenschädigung verbunden und daher eine regelmäßige Kontrolle des Blutspiegels notwendig (31). Auch bei dem Arzneimittel Tacrolimus kann die falsche Dosierung eine Toxizität für das transplantierte Organ und folglich dessen Funktionsverlust hervorrufen (32). Des Weiteren kann eine verlängerte Therapiedauer mit Glukokortikoiden zu einem Cushing-Syndrom (Stammfettsucht) oder Osteoporose führen (33). Auch bei dem Immunsuppressivum Rapamycin konnten Nebenwirkungen wie Myelosuppression (Knochenmarkshemmung) oder erhöhte

Blutfettwerte beobachtet werden (31). Um die negativen Wirkungen der Immunsuppressiva eindämmen zu können, wurde ein weiteres Therapiekonzept entwickelt. Durch die Gabe von Antikörpern kann die Proliferation aber auch die Depletion der Zielzellen beeinflusst werden. Allerdings kann eine wiederholte Gabe zur Wirkungslosigkeit, anaphylaktischen Reaktionen, akutem Lungenödem oder Hypotonie führen (34).

Trotz des engmaschigen Monitorings im Verlauf einer immunsuppressiven Therapie nach Organtransplantation ist eine chronische Abstoßungsreaktion, insbesondere bei Herz- und Nierentransplantation, nicht auszuschließen. Daher wird in der Transplantationsimmunologie nach alternativen therapeutischen Möglichkeiten zur Überlebensverlängerung der Transplantate gesucht. Ein neuer Ansatz dafür ist die Beeinflussung der angeborenen Immunität, getriggert durch „Pattern Recognition Receptors“ (PRR), wie z.B. Toll-like Rezeptoren (TLR), und die folgende Aktivierung der adaptiven Immunantwort im Rahmen einer chronischen Abstoßungsreaktion. Dies könnte den Einsatz herkömmlicher Immunsuppressiva vermindern und so die Nebenwirkungen für den Patienten herabsetzen.

1.4. *Immunsystem und Abstoßung*

Ein funktionierendes Immunsystem zeichnet sich nicht nur durch die Verteidigung gegen Pathogene aus, sondern auch durch Erkennung von körperfremden Antigenen, die sich u.a. in einem Spenderorgan befinden. Die Reaktion des Immunsystems kann durch verschiedene Rezeptoren, zur Erkennung der Alloantigene und der folgenden Abstoßung des Transplantats führen. In der Forschung wird akribisch an den mechanistischen Verbindungen zwischen dem Immunsystem des Empfängers und der Verteidigung gegen Pathogenen und Alloantigenen gearbeitet. Dabei ist das Zusammenspiel von angeborener und erworbener Immunantwort essentiell.

1.4.1 *Myd88 als wichtiger Faktor in der angeborenen Immunität*

Die Reaktion des angeborenen Immunsystems auf Fremdanigene erfolgt durch die Erkennung von unspezifischen Gewebsmustern (PAMP, „Pathogen Associated Molecular Patterns“) über eine Vielzahl von Rezeptoren. Dazu gehört die Gruppe der PRR, wie z.B. TLR, NOD-like Rezeptoren und Scavenger Rezeptoren. PRR's sind vor allem auf Monozyten, dendritischen Zellen (DC), Neutrophilen und Epithelzellen exprimiert. Bei einer Aktivierung der PRR Signalkaskade können durch Proteine, wie Myd88 („Myeloid Differentiation Factor 88“) maßgeschneiderte Antwortreaktionen auf Fremdanigene generiert werden (s. Abb. 5). Myd88 ist bei der Aktivierung aller TLR-Signalwege (außer TLR3) maßgeblich beteiligt (35, 36). Nach Bindung eines Liganden erfolgt eine Konformationsänderung des Rezeptors, die zu einer Rekrutierung der Adapterproteine mit ihrer TIR-Domäne (Toll-like/IL-1

Rezeptor Domäne) führt. Das Signal wird über die Serin-Threonin-Protein-Kinase IL-1-Rezeptor-Kinase (IRAK) und TRAF6 („TNF Receptor Associated Factor 6“) weiter geleitet. TRAF6 aktiviert über TAK1 („Transforming Growth Factor β -activated Kinase 1“) die I κ B-Kinasen, welche I κ B α phosphorylieren. Das I κ B α Protein wird aktiviert und ubiquitiniert, wodurch dessen Degradation erfolgt. Dadurch kann NF κ B aus dem I κ B-NF κ B-Komplex freigesetzt werden und in den Zellkern translozieren. Der Transkriptionsfaktor AP-1 („Activating Protein-1“) wird über den MAP Kinasen-Signalweg über TAK1 aktiviert. Beide Transkriptionsfaktoren, NF κ B und AP-1 führen zur Bildung entzündungsfördernder Zytokine, Reifung von DC und zur Anreicherung ko-stimulatorischer Moleküle, wie z.B. CD40 (10). Die durch den TLR-Signalweg aktivierten DC interagieren mit naiven T Lymphozyten, initialisieren so die T Zell-Antwort und stellen damit die Verbindung zur adaptiven Immunantwort her.

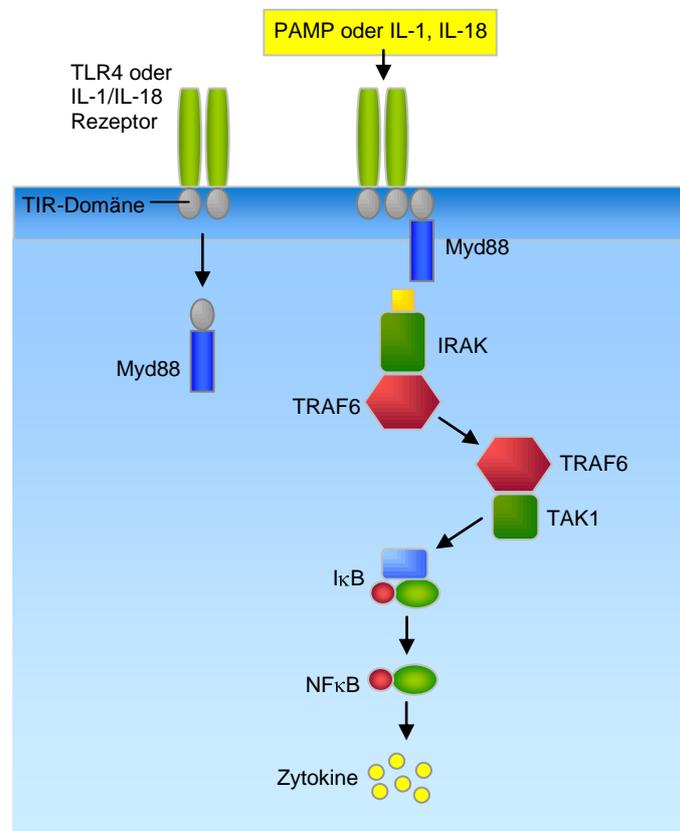


Abb. 5: TLR4- und IL-1/IL-18 Rezeptor-Signalkaskade.

Wie in Abb. 5 zu sehen, spielt Myd88 auch in der IL-1 und IL-18 Rezeptor-Signalkaskade eine wichtige Rolle. IL-1 und IL-18 binden, wie LPS, an Rezeptoren, die der IL-1 Rezeptor/Toll-Familie angehören. Die Weiterleitung des Signals erfolgt, wie bei den TLR, über Myd88 und endet in einer Aktivierung von NF κ B. Es konnte gezeigt werden, dass eine Myd88 Defizienz bei Mäusen nicht nur die TLR Signalkaskade, sondern auch die Funktion des IL-1 und IL-18 Signalwegs wesentlich beeinträchtigt, was sich auch in einer verminderten Proliferation von T Zellen zeigte (37).

Myd88, als wesentlicher Bestandteil des angeborenen Immunsystems, stellt durch seine Funktionalität in der TLR-, sowie IL-1/IL-18-Rezeptor-Signalkaskade einen wichtigen Baustein zur Aktivierung der erworbenen Immunantwort dar. Dies zeigt sich auch in der Abstoßungsreaktion nach Organtransplantation, die im nächsten Kapitel behandelt wird.

1.4.1.1 Myd88 in der Organtransplantation

Der Stellenwert von Myd88 im angeborenen Immunsystem konnte durch bisherige Untersuchungen bei Abstoßungsreaktionen im Bezug auf das Transplantatüberleben und die Transplantatfunktion aufgezeigt werden. Es konnte gezeigt werden, dass im Verlauf einer chronischen Abstoßungsreaktion ein Überleben von Hauttransplantaten von über 100 Tagen in Myd88 defizienten Mäusen gewährleistet war. In WT Kontrolltieren waren diese schon nach 16 Tagen abgestoßen. Mechanistisch zeigte sich durch eine Defizienz von Myd88 eine verminderte Migration von DC und eine reduzierte Th1 Immunantwort (38). In einer akuten Abstoßungsreaktion konnte trotz einer Defizienz des Adaptermoleküls Myd88 ein Verlust der Hauttransplantate nicht unterbunden werden (39). Andere Forschergruppen postulierten hingegen, dass Myd88 in der akuten Lungentransplantatabstoßung bei der Differenzierung von Monozyten eine wichtige Rolle spielt (40).

Die Regulierung des angeborenen Immunsystems stellt einen wichtigen Punkt in der immunologischen Forschung dar. Die Ausstattung der APC, als Bausteine des angeborenen Immunsystems, mit Schlüsselrezeptoren erregt dabei immer mehr die Aufmerksamkeit der Forscher. Hierbei weist der Oberflächenrezeptor TREM-1 („Triggering Receptor expressed on Myeloid Cells“) auf APC eine ko-stimulatorische Eigenschaft auf, die das immunregulatorische Signal der angeborenen Immunantwort, z.B. über Myd88, amplifizieren kann (41-43).

1.4.2 Ko-stimulatorische Rezeptoren – TREM-1

Viele Zellen des angeborenen Immunsystems exprimieren einen oder mehrere Mitglieder von Rezeptor-Gruppen aus der hochkonservierten Immunglobulin (Ig)-Superfamilie, die sich vermutlich vor mehr als 600 Millionen Jahren mit der Evolution der Metazoa gebildet haben (44). Alle Mitglieder der Ig-Superfamilie enthalten mindestens einen Abschnitt, der als Ig-Domäne bezeichnet wird. Proteine mit solchen Domänen erfüllen verschiedene Funktionen, sind aber im Grunde an der Erkennung eigener und fremder Moleküle, insbesondere auf der Zelloberfläche, beteiligt.

Im Jahr 2000 wurde der Transmembranrezeptor TREM der Ig-Superfamilie erstmals untersucht (45). Da TREM-Rezeptoren vor allem auf neutrophilen Granulozyten und

Monozyten exprimiert werden, wurde die Bezeichnung TREM – „Triggering Receptors Expressed on Myeloid Cells“ eingeführt (41, 42, 45-47). Die ersten identifizierten Moleküle aus der Familie der TREM-Rezeptoren waren TREM-1 und TREM-2. Während TREM-1 proinflammatorisch ist, wird für TREM-2 hauptsächlich eine inhibierende Rolle in der Entzündung beschrieben (45, 48, 49).

Für die weiteren Mitglieder der TREM Familie wurden bisher wenige Ansätze in der Literatur diskutiert. So konnte TREM-3 zwar im Menschen identifiziert werden, die Funktion ist allerdings noch unzureichend untersucht (50). Des Weiteren wird TREM-4 eine Rolle in Arteriosklerose, Tumorgenese und Spermatogenese zugeordnet (41). TREM-5 wurde bisher nur in Hautkrankheiten untersucht (41). Die chronologisch jüngste Gruppe der TREM-Familie wurde von Richard Allcock 2003 entdeckt (50). Er identifizierte TREM-like Transkripte (TLT1-3), die auf Thrombozyten und deren Vorläuferzellen, sowie auf myeloiden und lymphoiden Zellen exprimiert werden. Es wird vermutet, dass sie in der angeborenen, wie auch in der erworbenen Immunantwort eine Rolle spielen (51, 52).

1.4.2.1 TREM-1 und dessen amplifizierende Funktion in der PRR Signalkaskade

TREM-1 besteht aus einer Ektodomäne, einer transmembranen Region und einem kurzem zytoplasmatischen Ende, das zusammen etwa 30 kDa groß ist. Das zytoplasmatische Ende ist in der Lage, mit dem Signaladaptermolekül DAP12 („DNAX-Activating Protein of Molecular Mass 12 kDa“) einen Komplex zu formen (s. Abb. 6). Durch die Src Kinase kann eine Phosphorylierung vom Tyrosin der ITAM-Domäne („Immunoreceptor Tyrosine-Based Activation Motif“) am DAP12 eingeleitet werden und die Bindung der Protein-Tyrosin-Kinase Syk ermöglichen. Im weiteren Verlauf können unterschiedlichste Wege eingeschlagen werden, die zu einer Aktivierung der extrazellulär regulierenden Kinase (ERK1/2), der anti-apoptotischen Kinase (AKT) oder der Janus Kinase 2 (JAK2), aber auch zu einer Regulation des TLR-Signalweg führen kann (41, 42, 46). Dadurch kann die Proliferation, Zelldifferenzierung, Apoptose-Resistenz, Invasion und Migration oder Mobilisierung von Ca^{++} beeinflusst werden.

Der Ligand für TREM-1 wurde bisher noch nicht identifiziert. Es ist aber bekannt, dass TREM-1 ein „aktivierendes Signal“ benötigt, um eine inflammatorische Antwort auslösen zu können (45, 53, 54).

Die Amplifizierung der TLR Aktivität und die Expression inflammatorischer Zytokine durch TREM-1 führte zu einer neuen Betrachtungsweise des Ko-Rezeptors (55). Den Beginn dieser Untersuchungen lieferte die Arbeitsgruppe von Marco Colonna. Sie wiesen auf einen deutlichen Anstieg an TLR4 und TREM-1 auf COS-7 Zellen unter LPS Stimulation hin (45). Eine Ko-Stimulation von TREM-1 und TLR4 unter LPS führte zu einem 25fachen Anstieg der

pro-inflammatorischen Zytokine, die über den TLR4 Signalweg aktiviert wurden (45, 56). Der Zusammenhang zwischen dem TREM-1 und TLR Signalweg konnte auch in Tierstudien nachgewiesen werden. Initiale Untersuchungen zu TREM-1 wurden im Verlauf einer Sepsis durchgeführt. Dabei wurde über LPS ein septischer Schock ausgelöst, der mit einem synthetisch hergestellten Antagonist für TREM-1 (LP17) behandelt und verringert werden konnte. Auch die Expression pro-inflammatorischer Zytokine wurde durch die Inhibierung von TREM-1 unterbunden (54, 57).

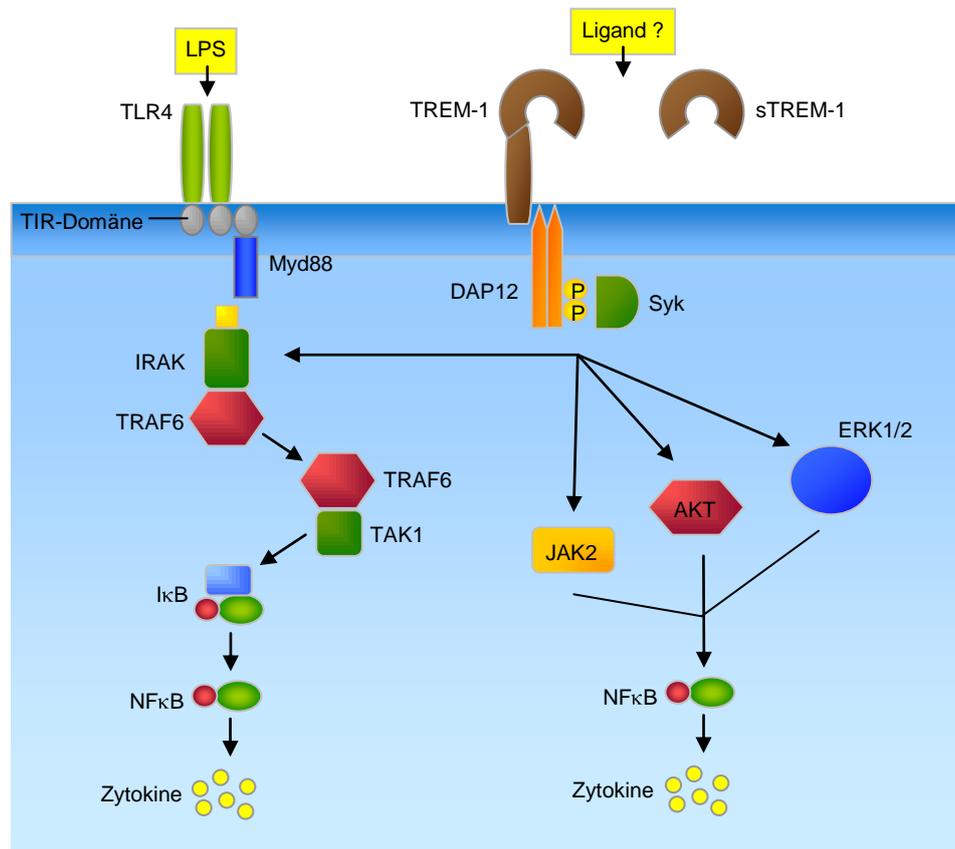


Abb. 6: TREM-1 Signalweg und dessen Einfluss auf die TLR4 Signalkaskade.

Wie in Abb. 6 dargestellt, existiert neben der membranständigen Form von TREM-1 auch eine lösliche Form von TREM-1 (sTREM-1). Dieser lösliche Anteil ist z.B. im Serum von septischen Patienten und auch in Patienten mit Pneumonie detektierbar (58, 59). Der Ursprung der löslichen Form von TREM-1 sowie dessen Funktion ist aber noch nicht endgültig aufgeklärt.

1.4.2.2 Klinische Relevanz von TREM-1

Die klinische Relevanz von TREM-1 wurde mittlerweile in einigen akuten und chronischen Krankheitsbildern untersucht. Dabei spielt die Amplifikation der Immunantwort eine wesentliche Rolle, bei der es durch eine Aktivierung von TLR in Präsenz von TREM-1 zu einer vermehrten Freisetzung von entzündungsfördernden Mediatoren kommt.

In humanen Studien zeigte sich eine Anreicherung von TREM-1 in bakteriellen Entzündungen (46, 60). In Patienten mit akuter Pankreatitis, in der u.a. Monozyten / Makrophagen eine entscheidende Rolle einnehmen, konnte ebenfalls eine erhöhte Expression von TREM-1 nachgewiesen werden (61, 62). Weitere Untersuchungen zeigten eine Funktion von TREM-1 in chronischen Krankheitsbildern. So wurde bei Patienten mit rheumatoider Arthritis TREM-1 erhöht detektiert (64). Auch in Tumor-assoziierten Makrophagen in einem entzündungsfördernden Milieu konnte eine Erhöhung von TREM-1 festgestellt werden (65). Bei Mäusen während einer chronisch entzündlichen Darmerkrankungen (IBD, „Inflammatory Bowel Disease“) wurde eine hohe Anzahl an TREM-1⁺ Makrophagen im entzündeten Gewebe analysiert und durch eine Blockade von TREM-1 die histopathologische Entzündungsreaktion im Darm reduziert. In Makrophagen der Lamina propria von einer normalen, nicht-entzündeten Darmwand, konnte kein TREM-1 gefunden werden (63).

Die experimentellen Studien zu TREM-1 zeigen einen möglichen therapeutischen Nutzen sowohl in akuten als auch in chronischen Krankheitsbildern. Die Inhibierung von TREM-1 während der Aktivierung des angeborenen Immunsystems scheint vielversprechend für verminderte Abstoßungsreaktion nach Organtransplantation. Mechanistisch könnte eine Unterdrückung der ko-stimulatorischen Funktion von TREM-1 zu einer Minderung der erworbenen Immunantwort führen.

1.5. Zielsetzung

Die chronische Abstoßungsreaktion zählt zu einer der schwerwiegenden Komplikationen nach solider Organtransplantation. Die alloreaktive Immunantwort des Empfängers auf das transplantierte Organ kann durch Immunsuppressiva vermindert werden, wirkt aber hauptsächlich auf Mechanismen des adaptiven Immunsystems und ist mit Risiken für den Patienten verbunden. Die Kontrolle und Suppression des angeborenen Immunsystems hingegen ist während einer Transplantatabstoßung bisher noch unzureichend untersucht.

In der vorliegenden Dissertation sollte durch eine Blockade des angeborenen Immunsystems über eine Inhibition des Ko-Rezeptors TREM-1 die adaptive Antwort im Verlauf einer Abstoßungsreaktion verringert und so das Überleben der Transplantate verlängert werden. Dazu wurden folgende Ziele im Besonderen untersucht.

1. Etablierung des Tiermodells zur Untersuchung des angeborenen Immunsystems

Das erste Ziel war es, ein Tiermodell für eine chronische Abstoßungsreaktion zu etablieren und zu charakterisieren. Die Wichtigkeit des angeborenen Immunsystems sollte durch die Defizienz des Adaptermoleküls Myd88 im Rahmen der chronischen Abstoßungsreaktion dargelegt werden.

2. Bestimmung der TREM-1 Expression während der Transplantationsabstoßung

Im Weiteren wurde die Expression von TREM-1 im langfristigen Verlauf in Spenderherzen bei Mäusen nach Herztransplantation untersucht.

3. Inhibierung von TREM-1

Die Blockade von TREM-1 und die damit verbundene Reduktion der Effekte des angeborenen Immunsystems wurden im Verlauf der Abstoßungsreaktion genauer dargelegt. Zusätzlich erfolgte die Untersuchung der Interaktion von alloreaktiven TREM-1⁺ APC mit infiltrierenden T Zellen.

4. Funktionsanalyse von TREM-1 in der initialen Phase des angeborenen Immunsystems

Es wird angenommen, dass für eine Langzeitakzeptanz von transplantierten Organen nicht nur das adaptive, sondern auch das angeborene Immunsystem inhibiert werden muss. Es wurde die Hypothese untersucht, ob eine temporäre Blockade von TREM-1 in der initialen Aktivierungsphase des angeborenen Immunsystems ausreichend für ein Langzeitüberleben der transplantierten Herzen im Verlauf einer chronischen Abstoßungsreaktion sein könnte.

*If I have ever made any valuable discoveries,
it has been owing more to patient attention,
than to any other talent.
(Isaac Newton)*

2. MATERIAL und METHODEN

2.1. Material

2.1.1 Allgemeines Material

Medien / Chemikalien	Bezugsquelle
Aceton	Sigma, München
Agarose: peqGOLD Universal Agarose	Peqlab Biotechnologie GmbH, Erlangen
Antikörper-Verdünnungslösung	DCS Innovative Diagnostic Systems, Hamburg
Aquatex	Merck, Darmstadt
Atropinsulfat 0,5 mg/ml	B. Braun, Melsungen
Biocoll Separating Solution	BiochromAG, Berlin
Bromphenolblau-Lösung	Sigma, München
BSA	biomol, Hamburg
Chlorophorm	Merck, Darmstadt
Citric Acid Trisodium Salt, Dihydrate	Cleveland, Ohio, USA
DAB	Merck, Darmstadt
DEPC	Ambion, Kaufungen
DNase I from bovine pancreas	Sigma, München
EDTA	PAN, Aidenbach
Enthellan	Merck, Darmstadt
Eosin Y Solution	Sigma, München
Ethanol, absolut	Merck, Darmstadt
Ethidiumbromid	Sigma, München
FCS	Biochrom, Berlin
Fluoromount	Sigma, München
Glycerin 85%	Merck, Darmstadt
Glycin	Merck, Darmstadt
HBSS	Gibco, Darmstadt

Medien / Chemikalien	Bezugsquelle
Heparin-Natrium-25000	Ratiopharm, Ulm
Isofluran	Baxter, Unterschleißheim
Ketamin	WDT, Garbsen
Kollagenase II	Roche, Mannheim
Mayers Häkalaunlösung	Merck, Darmstadt
β -Mercaptoethanol	Gibco, Darmstadt
NaCl-Lösung 0,9%	B. Braun, Melsungen
Penicillin/Streptomycin	Biochrom, Berlin
Roti [®] -Histol	Roth, Karlsruhe
RPMI Medium 1640	Gibco, Darmstadt
SensiTek HRP	ScyTec Laboratories, Logan, Utah, USA
Sodium <i>n</i> -Dodecyl Sulfate (SDS)	Calbiochem, Darmstadt
Tissue Tek	Sakura, Staufen
TRI [®] Reagenz	Sigma, München
Tris Pufferan [®]	Roth, Karlsruhe
Triton-X-100	Sigma, München
Trypanblau	Sigma, München
Tween20	Sigma, München
Wasserstoffperoxid 30%	Roth, Karlsruhe
Xylaxin	Serumwerk, Bernburg
Ziegenserum	Sigma, München
Puffer	Zusammensetzung bzw. Bezugsquelle
BSA 1%	in Aqua Dest.
Citrat Puffer	2,93 g Citric Acid Trisodium Salt in 1 L Aqua Dest., pH 6
Erythrozyten Lyse Puffer	BioWhittacker, Lonza, USA
Flow Cytometry Fixations Buffer (1x)	R&D, Minneapolis, USA
Formaldehyd 1%	Fertigprodukt von der Pathologie am Uniklinikum Regensburg
Kollagenase Puffer	RPMI, 10% FCS, 600 U/ml Collagenase II und 0,5 mg/ml DNase I
Ladepuffer	500 μ l Glycerin, 425 μ l steriles DEPC-Wasser. 75 μ l einer gesättigten Bromphenolblau-Lösung

Puffer	Zusammensetzung bzw. Bezugsquelle
Laufpuffer (TAE-Puffer) 10x	144,13 g Glycin, 60,55 g Tris, 10 g SDS (1%) in 1 L Aqua Dest.
MACS-Puffer 10x	0,74 g EDTA, 5 g BSA auf 1 L PBS
PBS 1x	PAA Laboratories GmbH, Cölbe
PBS + Triton	1x PBS + 0,3% Triton-X-100
Primärzellmedium	RPMI, 10% FCS, 1% Penicillin/Streptomycin, 0,1% β -Mercaptoethanol
TBS	60,5 g Tris, 87,6 g NaCl auf 1 L A. Dest., pH 7,5
T-TBS	1 ml Tween20 in 1 L TBS
Waschpuffer	PBS + 0,5% Triton-X-100
Kits	Bezugsquelle
AffinityScript TM QPCR cDNA Kit	Aiglent Technologies, Böblingen
BD Cytometric Bead Array Mouse Th1/Th2/Th17 Cytokine Kit	BD, Heidelberg
BD OptEIA Set Mouse IFN γ	BD, Heidelberg
BD OptEIA Set Mouse IL-6	BD, Heidelberg
BD OptEIA Set Mouse IL-12 (p70)	BD, Heidelberg
BD OptEIA Set Mouse TNF	BD, Heidelberg
CD4 Zell-Isolations-Kit	Miltenyi Biotec, Gladbach
CD11b Zell-Isolations-Kit	Miltenyi Biotec, Gladbach
DuoSet ELISA IL-17A	R&D, Wiesbaden-Nordenstadt
Flow Cytometry Fixation and Permeabilization KIT	R&D, Wiesbaden-Nordenstadt
LightCycler [®] 480 SYBR Green I Master	Roche, Mannheim
LightCycler [®] FastStart DNA Master SYBR Green I	Roche, Mannheim
MinElute [®] Gel Extraction Kit	Qiagen, Hilden
Pan Zell-Isolations-Kit II (CD3 Zellen)	Miltenyi Biotec, Gladbach
Trichrome Stain (Masson)	Sigma, München
Stimulanzen	Bezugsquelle
anti-CD3 ϵ Antikörper	BD, Heidelberg
anti-CD28 Antikörper	BD, Heidelberg
Brefeldin A (GolgiPlug)	BD, Heidelberg

Stimulanzen	Bezugsquelle
Ionomyacin	Sigma, München
Kontrollpeptid	Pepscan Systems, Lelystad, Netherlands
Lipopolysaccharid (LPS)	Sigma, München
LP17	Pepscan Systems, Lelystad, Netherlands
Peptidoglycan (PGN)	Sigma, München
Phorobol-12-Myristat-13-Acetat (PMA)	Sigma, München
Tumornekrosefaktor (TNF)	PerproTech, Hamburg

Antikörper und Detektionsreagenzien

Antikörper	Spezies	Fluorochrom/ Konjugat	Verdünnung Histo	Isotyp	Klon	Hersteller	Konzentration
CD4	Maus	-	1:50	Ratte IgG2b, κ	RM4-5	BD	31,25 µg/ml
CD4	Maus	PE	-	Ratte IgG2b, κ	GK1.5	eBioscience	0,2 mg/ml
CD8	Maus	-	1:50	Ratte IgG2a, κ	YTS169.4	Abcam	1 mg/ml
CD8	Maus	FITC	-	Ratte IgG2b, κ	H35-17.2	eBioscience	0,5 mg/ml
CD11b	Maus	Biotinyliert	1:200	Ratte IgG2b, κ	M1/70	BD	0,5 mg/ml
CD11b	Maus	PE-Cy7	-	Ratte IgG2b, κ	M1/70	BD	0,2 mg/ml
CD40	Maus	APC	-	Ratte IgG2b, κ	1C10	eBioscience	0,2 mg/ml
CD80	Maus	PE	-	Armenian Hamster IgG	16-10A1	eBioscience	0,2 mg/ml
CD86	Maus	FITC	-	Ratte IgG2b, κ	GL1	eBioscience	0,5 mg/ml
Cy TM 3	Hase	Cy3	1:200	-	-	Jackson Immuno Research	1,5 mg/ml
Cycle Dye	-	Violet	-	-	-	Invitrogen	1 µl/ml
DyLight 549	Ziege	Dy Light 549	1:1500	-	-	Jackson Immuno Research	1,5 mg/ml
F _{ab2}	Ratte	Biotinyliert	1:100	-	-	Santa Cruz	200 µg/0,5 ml
F4/80	Maus	APC	-	Ratte IgG2b, κ	BM8	eBioscience	0,2 mg/ml
Hoechst	-	-	1:7500	-	-	Sigma	100 mg
IFN _γ	Maus	APC	-	Ratte IgG1, κ	XMG1.2	BD	0,2 mg/ml
IgG	Ziege	Biotinyliert	1:200	-	-	Santa Cruz	200 µg/0,5 ml
IL-17A	Maus	PE	-	Ratte IgG1, κ	TC11-18H10	BD	0,2 mg/ml
Ki67	Maus	-	1:100	Hase IgG	SP6	Abcam	Keine Angabe
MHC-II	Maus	FITC	-	Ratte IgG2b, κ	M5/114.1 5.2	eBioscience	0,5 mg/ml
Streptavidin	-	AF488	1:1000	-	-	Invitrogen	2 mg/ml
TREM-1	Maus	-	1 : 6,7	Ziege IgG	Keine Angabe	R&D	0,1 mg/ml
TREM-1	Maus	PE	-	Ratte IgG _{2A}	Keine Angabe	R&D	25 µg/ml
TREM-1	Mensch	-	1 : 40	Ziege IgG	Keine Angabe	R&D	0,2 mg/ml

Tabelle 2: Verwendete Antikörper und Detektionsreagenzien.

Geräte	Bezugsquelle
ELISA Reader	Molecular Devices Corp., Ismaning
FACS Calibur und Canto II	BD, Heidelberg
Fluoreszenzmikroskop, Axio Observer Z1	Carl Zeiss, Oberkochen
Inhalationsnarkosegerät Vapor	Dräger AG, Lübeck
Inkubator, Serie 6000	Heraeus, Hanau
Kryotom Leica CM1900	Leica, Wetzlar
Light Cycler und Light Cycler480	Roche, Mannheim
MACS [®] Manual Cell Separator	Miltenyi Biotec, Gladbach
Mikrotom Microm HM350	Microm International, Walldorf
Operationsmikroskop Leica M651	Leica, Wetzlar
Photometer DNA Messung	eppendorf, Hamburg
Sterilisierungsgerät	F.S.T., Heidelberg
Zentrifuge Megafuge 1.0R	Heraeus, Hanau
Software und Internetdienste	Bezugsquelle
AxioVision Vs40 4.8.2.0	Carl Zeiss, Oberkochen
BD FACSDiva Software 6.0	BD, Heidelberg
BD CellQuest Pro Software BD	BD, San Jose, USA
e!Ensembl	European Bioinformatic Institute, Cambridge, GB
FlowJo 7.6.4.	TreeStar Inc., Ashland, USA
GraphPad Prism	GraphPad Software Inc., La Jolla, USA
LightCycler [®] 480 SW 1.5	Roche, Mannheim
LightCycler3 Version 3.5	Roche, Mannheim
Microsoft Office	Microsoft, Redmond, Washington, USA
Mirax Viewer 1.12	3DHISTECH Ltd., Budapest, Ungarn
Pubmed Medline	http://www.ncbi.nlm.nih.gov
Pubmed Nucleotide	http://www.pubmed.com/nucleotide
Primer3	http://frodo.wi.mit.edu/primer3
SOFTmax Version 2.34	Molecular Devices Corp., Ismaning
Universal ProbeLibrary	Roche, Mannheim
Operationsmaterialien	weitere Informationen und Bezugsquelle
Anlegezange (Klämmchenhalter)	bajonettförmig, 205 mm, (Aesculap, Tuttlingen)
Ethilon monofilament Faden 11-0	Polyamid 6/6, schwarz, nicht resorbierbar, 5 cm, BV-8 3.8 mm 3/8c (Ethicon, Norderstedt)

Operationsmaterialien	weitere Informationen und Bezugsquelle
Feine Arterienklemmen	125 mm, micro-halsted (Aesculap, Tuttlingen)
Feine Schere	110 mm, 43/8“ (Aesculap, Tuttlingen)
Knüpf-Pinzetten	gebogen, 100 mm (Teleflex Medical, Tuttlingen)
Mikro-Federschere mit Flachgriff	85 mm, 33/8“ VANNAS (Aesculap, Tuttlingen)
Mikro-Nadelhalter mit Rundgriff	gebogen, 130 mm (Teleflex Medical, Tuttlingen)
Mini-Aneurysmen-Clips	YASARGIL (Aesculap, Tuttlingen)
Pinzette	0.05 x 0.01 mm, Inox, 11 cm, DUMONT (F.S.T., Bad Oeynhausen)
Polypropylen, Monofilament 4-0	nicht resorbierbar, 19 mm 3/8c (Ethicon, Norderstedt)
Präparier- und Strabismusschere	115 mm, 41/2“ (Aesculap, Tuttlingen)
Seralon, Monofilament 7-0	50 cm (Serag Wiessner, Naila)
Sofsilk Faden 5-0	45 cm, schwarz (USSC Sutures, USA)
Tabotamp	5cm x 35 cm, resorbierbar (Ethicon, Norderstedt)

2.1.2 *Humanes Gewebematerial*

Die verwendeten Biopsien von Herz- und Nierentransplantationen wurden zwei Jahre nach Transplantation entnommen, in der Pathologie am Uniklinikum Regensburg archiviert und im Rahmen dieser Dissertation zur Verfügung gestellt. Das Gewebematerial wurde unter den Richtlinien der ethischen Kommission entnommen (Nr. 04/56).

2.1.3 *Mäuse*

Weibliche C57BL/6J (B6), B6.129S7Rag1tm1Mom/J (Rag1^{-/-}), Balb/c AnNCrI (Balb/c) und B6.C-H-2bm12/KhEg (bm12) wurden von den Jackson Laboratories (Bar Harbor, MA, USA) mit einem Alter von 12-14 Wochen erworben. Myd88^{-/-} Tiere wurden von S. Akira (Osaka Universität, Osaka, Japan) zur Verfügung gestellt und weiter am Uniklinikum Regensburg in Barrieren der Tierlaboratorien gezüchtet. Alle Tiere wurden vorschriftsmäßig nach dem Tierschutzgesetz und pathogenfrei gehalten. Die Raumtemperatur betrug 22 ± 2°C bei einer relativen Luftfeuchtigkeit von 50-60% und einem Tag-Nacht-Zyklus von 12 h. Die Tiere erhielten Standard-Tierfutter und Wasser *ad libitum*.

2.2. **Methoden**

2.2.1 *Herztransplantation*

Im Zuge dieser Arbeit wurde ein allogenes, heterotopes Herztransplantationsmodell verwendet (s. Abb. 7). Dabei wurden die Spenderherzen an die großen abdominalen Gefäße

des Empfängers anastomosiert. Dies ist ein rein immunologisches Modell, da die Empfängermaus ihr eigenes Herz behält und somit nicht auf die Funktion des Transplantates angewiesen ist. Auch bei einer möglichen Abstoßungsreaktion gegen das Spenderorgan ist das Versuchstier in seinem Wohlbefinden kaum beeinträchtigt.

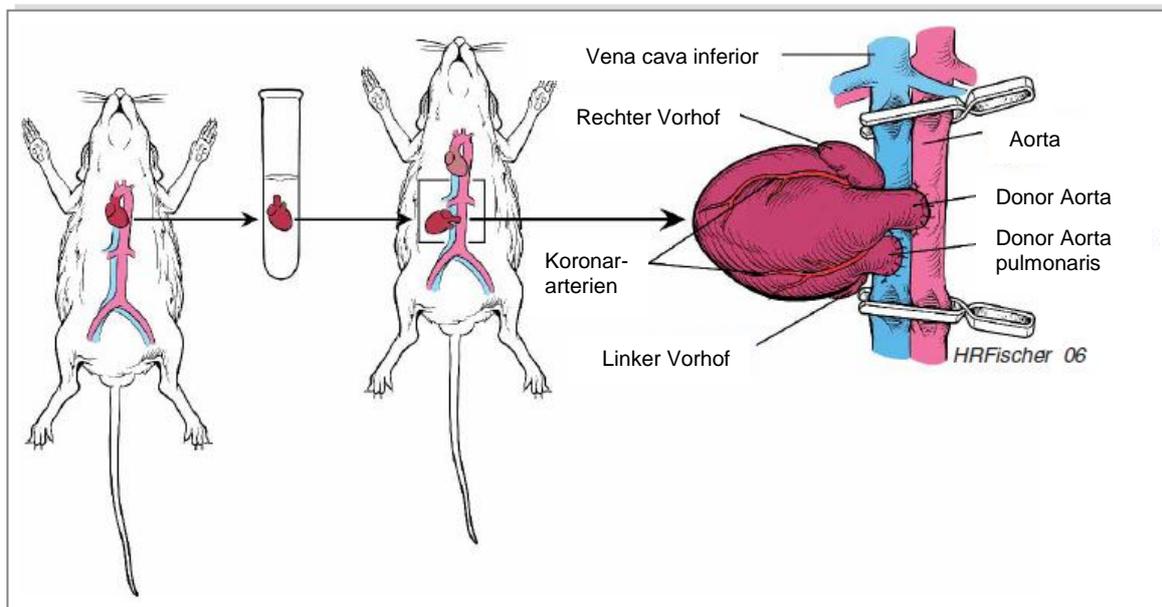


Abb. 7: Abdominal heterotope Herztransplantation.

Bei der abdominal heterotopen Herztransplantation an Mäusen wird die Aorta und die Pulmonalarterie des Spendertiers mittels End-zu-Seit-Anastomosen an die abdominalen Gefäße des Empfängertiers transplantiert. Nach Hasegawa (2).

2.2.1.1 Tiermodelle

Die dieser Dissertation zugrundeliegenden Fragestellungen wurden in einem chronischen, akuten und subakuten Herztransplantationsmodell aufgearbeitet.

Für das Tiermodell einer chronischen Abstoßungsreaktion wurden bm12 Spenderherzen und B6 bzw. Myd88^{-/-} Empfängermäuse verwendet. Dieser Kombination liegt ein Antigen-Mismatch zu Grunde, der sich unterschiedlich im I-A Locus des MHC-Klasse-II-Komplexes äußert.

Das Tiermodell einer akuten und subakuten Abstoßungsreaktion wurde mit Balb/c Tieren (Haplotyp H-2^d) aufgearbeitet. Als allogene Donoren fungierten B6 und Rag1^{-/-} mit dem Haplotyp H-2^b, die allogene zu den Empfängertieren in allen Haupt- und Nebenhistokompatibilitätsantigenen sind.

Als syngene Kontrollen wurden in beiden Gruppen, B6 Herzen in B6 Empfänger transplantiert.

2.2.1.2 Operationstechnik der heterotropen Herztransplantation

Die heterotrope Herztransplantation setzte sich aus drei Teilen zusammen. Zuerst erfolgte die Vorbereitung des Rezipienten, anschließend die Entnahme des Transplantates aus dem Spendertier und zum Abschluss die eigentliche Transplantation. Der gesamte Verlauf der Transplantation wurde unter reinen aber nicht sterilen Bedingungen durchgeführt. Die verwendeten Instrumente wurden vor der Transplantation in einem Sterilisiergerät von F.S.T. (Heidelberg) sterilisiert.

Narkose

Sämtliche Eingriffe an den Empfängertieren wurden unter Vollnarkose, mit dem Inhalationsnarkotikum Isofluran, durchgeführt. Dies wurde mit einer Konzentration von 5% eingeleitet und während der Operation auf 1,5% reduziert. Spendertiere wurden mit der Injektionsnarkose (Atropin: 2-3 mg/kg KGW, Ketamin: 80-100 mg/kg KGW, Xylazin: 5-10 mg/kg KGW) behandelt.

Vorbereitung des Rezipienten

Die gesamte Operation wurde auf einer Wärmeplatte bei 38-40°C durchgeführt. Nach Inhalationsanästhesie mit Isofluran erfolgte die Enthaarung und Reinigung des Abdomens mit 70% Ethanol. Zur weiteren Vorbereitung des Empfängertieres wurde dieses in Rückenlage gebracht. Nach Hautinzision und medianer Laparotomie in der *Linea alba* wurde die Bauchwand großzügig von der Blase bis zum Xyphoid des Tieres eröffnet. Anschließend konnte mit zwei feinen Arterienklemmen die Bauchdecke für die weitere Operation offen gehalten werden. Das Darmkonvolut wurde mit einem Q-Tip nach extraabdominal verlagert und, in eine mit NaCl getränkte Gaze, eingebettet. Das sich posterior befindende Peritoneum und umliegendes Fettgewebe wurden nun sorgfältig entfernt. Unter weiterer vorsichtiger Präparation wurden die großen Bauchgefäße *Aorta abdominalis* und *Vena cava* freigelegt. Die ausführenden Gefäße der *Aorta abdominalis* und *Vena cava* wurden bei Bedarf mit einem 7-0 Seralon Monofilament Faden abgebunden. Diese Prozedur führte in keinem Fall zur Paralyse oder beeinträchtigte das Überleben des Rezipienten.

Spenderoperation (Organentnahme)

Nach erfolgreicher Anästhesie erfolgte eine mediane Laparotomie. Dadurch konnte das Zwerchfell eröffnet und anschließend der Thorax nach kranial aufgeklappt werden, um die Freipräparation des Herzens vorzunehmen. Zunächst wurde das Herz mit 3 ml kalter Heparin-Lösung (500 U Heparin in 0,9% NaCl, 4°C) über die *Vena cava* gespült. Nach Durchtrennung der großen Bauchgefäße des Spendertieres begann die Ischämiezeit des Transplantates. Der Donor wurde um 180° gedreht und der Thymus entfernt. Einer ev.

erneuten Spülung und somit kompletten Perfusion des Herzens mit 3 ml kalter Heparin-Lösung, bei simultanem Entbluten des Tieres, erfolgte über die *Aorta ascendens*. Nach der Freilegung der *Vena cava* konnte eine Ligation an der *Vena cava* kurz vor ihrer Mündung in den rechten Vorhof vorgenommen werden. Anschließend wurden die beiden zu anastomosierenden Gefäße, der *Truncus pulmonalis* und die *Aorta descendens*, durchtrennt. Danach erfolgte eine Massenligatur der verbleibenden Gefäße, einschließlich der Lungenvenen. Das entnommene Herz wurde nun in 4°C kalter Kochsalzlösung bis zur Implantation gelagert. Während der gesamten Ischämiezeit wurde das Transplantat in regelmäßigen Abständen mit kaltem NaCl befeuchtet.

Empfängeroperation

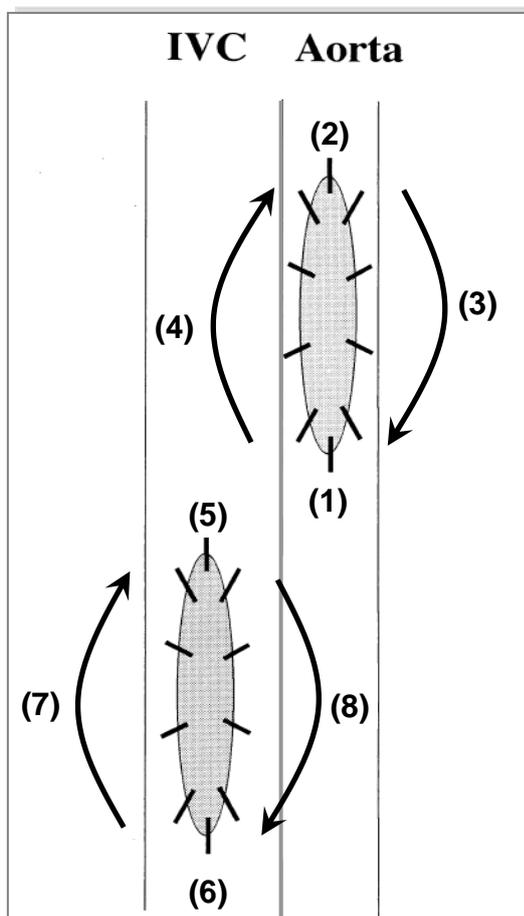


Abb. 8: Abfolge der Anastomose.
Modifiziert nach Hasegawa (2).

Für die Anbringung der Inzisionen, wurde der Rezipient um 45° im Uhrzeigersinn gedreht. Nach Anbringen der Arterienclips an Arterie und Vene wurden die Gefäße mit einer G30 Kanüle punktiert und per Längsinzision eröffnet. Nach dem Freispülen des Gefäßlumens mit 0,9%iger NaCl-Lösung, erfolgte das Einbringen des Transplantates wie in Abb. 8 dargestellt. Dazu wurde der Empfänger erneut um 180° gedreht. Durch je einen Ecknaht am proximalen und distalen Ende der Inzision in die Aorta wurde der *Truncus aorticus* des Spenderorgans End-zu-Seit an der Aorta des Empfängers fixiert (Abb. 8: 1 und 2). Anschließend wurde die Anastomose fortlaufend mit 4-5 Stichen mit 11-0 Ethilon Faden durchgeführt (Abb. 8: 3 und 4).

Um das Risiko einer Thrombose zu minimieren, wurde die kraniale Klemme kurz geöffnet. Der Empfänger wurde um 180° gedreht und es folgte eine End-zu-Seit Anastomose des *Truncus*

pulmonalis (am Spenderherzen) mit der *Vena cava* (Abb. 8: 5-8). Zur Unterstützung der Blutgerinnung wurde nach Beenden der Anastomosen ein wenig Tabotamp um die Gefäße platziert und der Rezipient erneut um 45° im Uhrzeigersinn gedreht. Vor dem Öffnen der Klemmen wurde das Herz mit etwa 30° warmer Kochsalzlösung umspült. Anschließend erfolgte die Reperfusion durch das Entfernen der Klemmen. Dazu wurde die kraniale Klemme

vor der kaudalen Klemme geöffnet. Das Spenderherz begann rasch zu schlagen. Eine rosige Färbung und schnelles Einsetzen der Kontraktionen im Sinusrhythmus belegten eine gelungene Transplantation. Nach der Rückverlegung des Darmkonvolutes wurde das Abdomen mit einer Einzelknopfnah (4-0 Ethilon Faden) verschlossen. Die Maus erwachte wenige Minuten nach Ausschalten des Isoflurangerätes aus der Narkose, wurde postoperativ mit einer Wärmelampe bestrahlt und überwacht. Je nach Bedarf wurden die Tiere engmaschig, bei gutem Verlauf dann mindestens 1x täglich, kontrolliert.

Postoperative Beobachtung

Die transplantierten Tiere sollten im chronischen Abstoßungsverlauf postoperativ 7 Tage überleben. Nach diesem Zeitraum ist es möglich einen operationstechnischen Fehler von einer immunologischen Abstoßungsreaktion zu unterscheiden. Bei Komplikationen während der Operation, Auftreten von allgemeinen Abbruchkriterien, Misserfolg der Transplantation (keine Kontraktion des Transplantats) und postoperativen Komplikationen erfolgte eine sofortige Tötung der Tiere durch zervikale Dislokation in Narkose. Das Transplantat wurde durch abdominelle Palpation auf suffiziente Kontraktion mit dem Zeigefinger und Daumen im Flankenbereich des Tieres überprüft. Die Schlagkraft des Herzens wurde von 0 bis 10 angegeben, wobei 10 eine kräftige rhythmische Kontraktion des Spender-Herzens darstellt und diese Kontraktion bei narkotisierten Tieren durch die Bauchdecke sichtbar ist. Bei dem Wert 0 hingegen war keine spürbare mechanische Herzaktion mehr palpierbar. Als Zeitpunkt der Abstoßung wurde der Tag angegeben, an dem keine myokardiale Kontraktion mehr zu tasten war.

Organentnahme und Aufbewahrung

Die Entnahme der transplantierten Organe erfolgte an Tag 18, 20, 50 und 120 Tage *post transplantationem*. Unter Isoflurannarkose wurde bei dem auf dem Rücken fixierten Tier das Abdomen großflächig eröffnet, das Transplantat aufgesucht, frei präpariert und die Funktion noch einmal abschließend beurteilt. Nach Entnahme wurde das Transplantat in vier gleiche Abschnitte geteilt. Ein Viertel wurde in Tissue-Tek eingebettet, bei flüssigem Stickstoff schock gefroren und bei -80°C gelagert. Das zweite Viertel wurde in Formaldehyd eingelegt und über die Pathologie am Uniklinikum Regensburg in Paraffin eingebettet. Die so gewonnenen Proben wurden anschließend für histologische und immunhistologische Analysen verwendet. Die letzten zwei Viertel wurden jeweils bei flüssigem Stickstoff eingefroren, bei -80°C gelagert und für RNA Isolierungen (s. Kapitel 2.2.6.1) verwendet. Für die Isolation infiltrierender Zellen wurde das komplette Transplantat verwendet und weiter verarbeitet (s. Kapitel 2.2.4.1). Die Tiere wurden direkt nach der Probenentnahme mittels zervikaler Dislokation getötet.

2.2.2 Antagonistisches Peptid zur Inhibierung von TREM-1

Die Inhibition von TREM-1 erfolgte über ein antagonistisches Peptid (LP17). Dieses künstliche Peptid wurde von Gibot et al. entwickelt (57) und besteht aus 17 Aminosäuren (LQVTDSGLYRCVIYHPP). Durch die Bindung an TREM-1 auf der Zelloberfläche tritt LP17 in Konkurrenz mit dem natürlichen Liganden. Also Kontrolle diente ein Peptid, das sich in der Reihenfolge der Aminosäuren willkürlich zeigte (TDSRCVIGLYHPPLQVY). Um die LP17 Wirkung auf die Transplantatabstoßung zu untersuchen, wurde das synthetische Peptid den Empfängertieren täglich in einer Konzentration von 100 µg / 100 µl PBS, ab Tag 3 *post transplantationem i.p.* verabreicht. Die Auswertung erfolgte mittels palpatorischer Funktionsanalyse, Durchflußzytometrie und Immunhistochemie.

2.2.3 Histologische Untersuchungen

Für die histopathologischen und immunhistochemischen Färbungen wurden 2-3 µm dicke Gewebeschnitte, die mittels Kryotom oder Mikrotom angefertigt wurden, verwendet. Kryoschnitte wurden 10 min zur Fixierung mit -20°C kaltem Aceton behandelt und danach bis zur endgültigen Färbung bei -20°C gelagert. Paraffinschnitte wurden für 2 Tage auf 37°C getrocknet und anschließend bei RT bis zur weiteren Verarbeitung gelagert.

2.2.3.1 Hematoxylin/Eosin Färbung (H.E.)

Für die histopathologische Beurteilung und Analyse der Transplantatabstoßungsreaktion, sowie der Transplantatvaskulopathie wurde eine H.E. Färbung durchgeführt. Hierfür wurden die Paraffinschnitte zunächst 20 min bei 65°C inkubiert, um eine „sanfte“ Entparaffinierung zu gewährleisten. Anschließend folgte eine komplette Entparaffinierung und Rehydratisierung über eine absteigende Alkoholreihe. Die Schnitte wurden nun in Mayers Hämalaun Lösung für etwa 2-3 min eingelegt. Die weitere Differenzierung im Leitungswasser erfolgte für mindestens 10 min. Für die anschließende Färbung des Zytoplasmas wurden die Schnitte in Eosin für etwa 3-5 min gefärbt. Nach einer kurzen Spülung im VE Wasser, folgte eine aufsteigende Alkoholreihe und Fixierung der Färbung in Roti[®]-Histol für 10-30 min. Zum Abschluss wurden die Schnitte in Enthellan eingedeckt. Die Präparate wurden unter dem Mikroskop untersucht und ausgewertet.

Histologischer Score

Bewertet wurde der histologische Score in Anlehnung an das ISHLT Schema von 2004 (66). Dabei wurden u.a. die zelluläre Infiltration, Schäden an Myozyten, sowie das Ausmaß des parenchymalen und vaskulären Schaden des transplantierten Organs beurteilt und mit einem Grad von 0R bis 3R definiert (s. Tabelle 3).

Grad der Abstoßung	Beurteilungsparameter
0R	Es finden sich keine Anzeichen der Abstoßungsreaktion oder von Schäden an Myozyten.
1R	Minimal beginnende Abstoßung, die von perivasalen und/oder interstitiellen Lymphozyteninfiltraten begleitet wird.
2R	Es finden sich multifokale lymphozytäre Entzündungsinfiltrate, wo mittlere architektonische Störungen bzw. Myozytenläsionen vorgefunden werden.
3R	Es besteht ein polymorphes aggressives Entzündungsinfiltrat aus Lymphozyten, Eosinophilen und Neutrophilen verbunden mit Nekrosen und Schäden an den Myozyten. Ebenso Ödeme, Hämorrhagien und Vaskulitiden beobachtet werden.

Tabelle 3: Histologischer Score nach ISHLT 2004 (66).

2.2.3.2 Masson-Trichromfärbung

Um eine Anreicherung der Kollagenfasern im Transplantat, den mehrschichtigen Aufbau der Gefäße, Muskelfasern und verschiedene Gewebeabschnitte (s. Tabelle 4) sichtbar machen zu können, wurde eine Trichromfärbung (Masson) angewendet. Dazu wurden Paraffinschnitte zunächst bei 65°C für 20 min „sanft“ entparaffiniert und weiter nach dem Protokoll des Herstellers behandelt. Die Eindeckung der Gewebeschnitte erfolgte in Enthellan. Die Präparate wurden unter dem Mikroskop untersucht und ausgewertet.

Färbeergebnis	Struktur
Violett Schwarz	Kerne
Rot	Zytoplasma und Muskelfasern
Blau	Kollagen

Tabelle 4: Ergebnisse der Masson-Trichromfärbung.

2.2.3.3 Immunhistologische Färbungen

Im Rahmen der vorliegenden Untersuchungen wurden Paraffin- wie auch Kryogewebeschnitte immunhistologisch aufgearbeitet. Eine Zusammenfassung der jeweiligen Protokolle wurde in Tabelle 5 dargestellt. Für alle Färbungen wurden 2-3 µm dünne Gewebeschnitte hergestellt, auf denen gezielt zelluläre Strukturen oder Proteine gefärbt werden konnten.

Färbungen für Kryopräparate

Grundsätzlich wurden Kryoschnitte für etwa 10 min bei RT aufgetaut und im Puffer, entsprechend der gewählten Färbung, gespült. Bei der Färbung für CD11b⁺ und TREM-1⁺ Zellen, musste die endogene Peroxidase Aktivität mit H₂O₂ (0,3%) für 10 min bei RT geblockt werden. Um eine unspezifische Bindung der Antikörper zu vermeiden, wurden die Schnitte in der AVL oder in Ziegenserum für 1 h inkubiert. Weiters erfolgte eine Behandlung mit dem Primärantikörper für 4 h oder über Nacht in einer feuchten Kammer. Für eine Färbung von Ki67 wurden die Schnitte für 1 h bei RT mit dem Primärantikörper inkubiert. Ki67 richtet sich gegen nukleäres Antigen, das nur in proliferierenden Zellen, die sich nicht in der Ruhephase (G0-Phase) befinden, nachzuweisen ist.

Nach einer weiteren Spülung im Puffer wurden die Präparate mit dem Sekundärantikörper für 1 h behandelt und anschließend mit dem jeweiligen Detektionsreagenz visualisiert. Bei einer Behandlung mit dem HRP Reagenz und dem weiteren DAB Kit wurden die Schnitte abschließend mit Hämalaun gegengefärbt. Bei Fluoreszenzfärbungen wurden Zellkerne mit Hoechst angefärbt. Die Hoechst-Färbung interkaliert mit Strukturen des Zellkerns und macht diesen fluoreszenz-mikroskopisch durch eine blaue Färbung sichtbar.

Die Eindeckung der Gewebeschnitte erfolgte in Aquatex oder Fluoromount. Die Auswertung erfolgte über das Fluoreszenzmikroskop Axio Observer Z1 (Zeiss).

Färbung	CD4	CD8	CD11b	CD11b + TREM-1	TREM-1	Ki67 + CD4
Gewebe	Kryo	Kryo	Kryo	Kryo	Paraffin	Kryo
Blockpuffer	10% ZS	10% ZS	10% ZS	AVL	5% BSA	10% ZS
Puffer	PBS	PBS	T-TBS	PBS	PBS+Triton	PBS
Peroxidase-Block	Nein	Nein	Ja	Ja	Ja	Nein
Primär-antikörper	αCD4	αCD8	αCD11b biotinyliert	αCD11b / αTREM-1	αTREM-1	αKi67 / αCD4
Sekundär-antikörper	Biotinyliert	Biotinyliert	Entfällt	CD11b: Streptavidin 488 TREM-1: DyeLight 549	Biotinyliert	Ki67: Cy3 CD4: Streptavidin 488
Detektion	HRP + DAB	HRP + DAB	HRP + DAB	Hoechst	HRP + DAB	Hoechst

Tabelle 5: Darstellung der verschiedenen Färbeprotokolle.

Färbungen für Paraffinpräparate

Die Schnitte wurden nach Standardprotokoll entparaffiniert und 10 min in Citrat Puffer gekocht, um die Antigene zu demaskieren. Nach der Abkühlung des Citrat Puffers, wurde die endogene Peroxidase Aktivität mit H₂O₂ (0,3%) geblockt. Anschließend wurden die Schnitte in 5% BSA eingelegt, um unspezifische Bindungen der Antikörper zu vermeiden. Über Nacht

erfolgte die Inkubation mit dem Primärantikörper in der feuchten Kammer. Am nächsten Tag wurden die Schnitte im Puffer 3x 5 min gewaschen und für 1 h mit einem biotinylierten Sekundärantikörper behandelt. Auf den nächsten Waschschrift folgte die Behandlung mit dem HRP Reagenz und der anschließenden Visualisierung durch den DAB Kit. Als letzter Schritt wurde in VE Wasser gespült und mit Hämalaun nach Mayer gegengefärbt. Die Eindeckung der Gewebeschnitte erfolgte in Aquatex. Die Auswertung erfolgte über das Fluoreszenzmikroskop Axio Observer Z1 (Zeiss).

Quantifizierung

Zur Quantifizierung der infiltrierenden Zellen, wurden jeweils 10 randomisierte Gesichtsfelder von gefärbten Gewebeschnitten bei 20facher Vergrößerung ausgezählt. Für jede Gruppe wurden 5 verschiedene Herztransplantate ausgezählt. Für den Ki67 Index wurde das Ratio der Ki67⁺ CD4⁺ Zellen zu den CD4⁺ Zellen gebildet und prozentual ausgewertet. Anschließend wurde der Mittelwert \pm SEM gebildet und in Balkendiagrammen dargestellt.

2.2.4 Zellbiologische Methoden

2.2.4.1 Isolation von infiltrierenden Leukozyten im Transplantat

Die Herzen wurden nach Entnahme mit Skalpellen mechanisch zerkleinert und im Kollagenase-Puffer für 2 h bei RT geschwenkt. Anschließend wurde der Verdau über ein 100 μ m Sieb geschüttet. Der Überstand wurde für 5 min bei 1500 rpm und 4°C abzentrifugiert und in Primärzellmedium aufgenommen. Für den Rücklauf folgte ein erneutes Schütteln für 20 min bei 37°C im Kollagenase-Puffer. Anschließend wurden beide Fraktionen vereint und für 5 min und 1500 rpm bei 4°C zentrifugiert. Es folgte eine Behandlung des Pellet mit 1 ml Erythrozyten-Lysepuffer pro Herz für 3 min. Die Suspension wurde in 40 ml Primärzellmedium aufgenommen, über ein 40 μ m Sieb filtriert und abzentrifugiert. Die Zellen wurden gezählt und für Zellkultur (s. Kapitel 2.2.4.5) oder Durchflusszytometrie (s. Kapitel 2.2.7) weiter behandelt.

2.2.4.2 Gewinnung von PBMC's aus dem Blut des Rezipienten

Die Gewinnung von Leukozyten aus dem Blut wurde mittels Biocoll durchgeführt. Die Biocoll-dichtegradientenzentrifugation ist ein Verfahren bei dem die Blutprobe über das Biocoll geschichtet wird. Dieses wirkt während der Zentrifugation wie ein Filter, der je nach Dichte der einzelnen Blutanteile für diese weniger oder mehr durchlässig ist.

Die Entnahme des Blutes wurde an Tag 20 *post transplantationem* durchgeführt. Der Rezipient wurde dafür narkotisiert und auf den Rücken gelegt. Es folgte eine großflächige Öffnung des Abdomens und Auslagerung des Darmkonvoluts. Dadurch bestand freier Zugang zur *Vena cava*. Mit einer G27 Kanüle konnte das Blut in eine Heparin-getränkte

Spritze aufgenommen werden. Anschließend wurde das Blut bis 7 mit ml PBS verdünnt. 7 ml Biocoll wurden mit den 7 ml verdünnter Blutlösung überschichtet und bei 2400 rpm für 20 min bei RT ohne Bremse zentrifugiert. Die in der Interphase angesammelten Lymphozyten (s. Abb. 9) wurden abgenommen und 2x mit PBS bei 1500 rpm für 5 min bei 4°C gewaschen. Zellen wurden gezählt und weiter für das durchflusszytometrische Verfahren (s. Kapitel 2.2.7) behandelt.

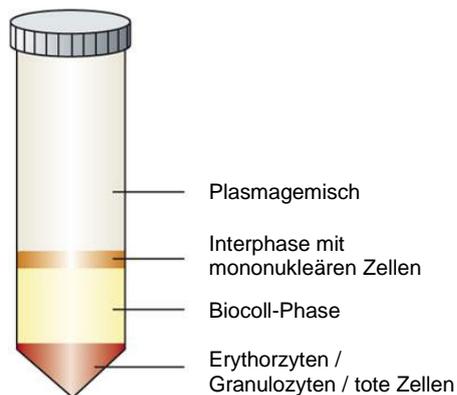


Abb. 9: Isolierung von PBMC's mittels Biocoll.

Darstellung der Phasentrennung nach Zentrifugation des überschichteten Biocolls mit der verdünnten Blutlösung. Die Interphase mit mononukleären Zellen wurde abgenommen und weiter verarbeitet. Modifiziert nach Munoz und Leff (67).

2.2.4.3 Lymphozytenisolierung aus der Milz

Die Milzen wurden aus der Maus entnommen und unter Zugabe von 5 ml HBSS mit Hilfe eines Spritzenstempels durch ein 100 µm Nylonnetz gedrückt. Nach der Homogenisation und Abzentrifugation (5 min bei 4°C und 1500 rpm) wurde das Pellet mit 1 ml Erythrozyten-Lysepuffer für 2 min bei RT inkubiert. Die Lysereaktion wurde mit 10 ml HBSS gestoppt, abzentrifugiert und in Primärzellmedium oder MACS Puffer aufgenommen. Anschließend wurden die isolierten Zellen gezählt und erneut zentrifugiert. Die gewonnene Zellsuspension wurde bis zur weiteren Verarbeitung kühl gelagert.

2.2.4.4 Zellzahl- und Vitalitätsbestimmung

Die Zellzahl und die Vitalität wurden mit dem Trypanblau-Ausschlusstest bestimmt, indem die Zellsuspension mit der Trypanblaulösung verdünnt wurde. Mit Hilfe der Neubauer-Zählkammer wurden die Zellen innerhalb eines Großquadrats (16 Kleinquadrate) gezählt und anschließend nach der Formel, wie in Abb. 10 dargestellt, berechnet.

$$Z \text{ Zellen / ml} = \frac{\text{Zahl der ungefärbten Zellen in einem Großquadrat}}{4} \cdot \text{Verdünnungsfaktor} \cdot 10^4$$

Abb. 10: Berechnung der Zellzahl.

2.2.4.5 Zellkulturbedingungen

Die Zellen wurden in Primärzellmedium bei 37°C, 5% Kohlendioxidgehalt und 95% relativer Luftfeuchte in einem Inkubator für den jeweils gewählten Kultivierungszeitraum gehalten. Es erfolgte aufgrund des kurzen Kultivierungszeitraumes (2-4 Tage) kein Mediumwechsel.

2.2.4.6 Magnetische Sortierung von Zellen

„Magnetic Activated Cell Sorting“ (MACS) ist ein Verfahren zur magnetischen Zellseparation. Dabei können spezifische Zellstrukturen mittels Microbeads markiert werden. Microbeads sind etwa 50 nm große superparamagnetische Mikropartikel, an die Antikörper gebunden sind. Sie verhindern den Durchfluss der markierten Zellen durch eine von einem starken Magnetfeld umgebene Säule, wobei unmarkierte Zellen unter der Säule aufgefangen werden können. Es wird zwischen einer positiven Selektion, bei der die markierten Zellen die Zielzellen sind, und einer negativen Selektion, bei welcher die Zielzellen unmarkiert durch die Säule gespült werden, unterschieden. Beide Verfahren wurden im Rahmen der Dissertation angewendet.

Die Sortierung von murinen CD3⁺, CD4⁺ und CD11b⁺ Zellen wurde nach dem Protokoll des Herstellers durchgeführt. Die mit Microbeads konjugierten Antikörper und das Equipment für die Zellsortierung (z. B. LS-Separationssäulen, Magnete usw.) wurden von der Firma Miltenyi Biotec verwendet.

2.2.4.7 Aktivitätsanalyse der CD11b⁺ Zellen

Die isolierten CD11b⁺ Zellen aus einer B6 Milz wurden mittels MACS-Säule aufgereinigt (s. Kapitel 1.2.4.6). Die anschließende Inkubation mit LP17 oder dem Kontrollpeptid erfolgte über 2 Tage unter der Zugabe von LPS (1 µg/ml), PGN (10 µg/ml) oder TNF (20 ng/ml). Der Überstand wurde für ELISA-Auswertungen (s. Kapitel 2.2.4.9) herangezogen. Die weitere Analyse der Zellen erfolgte nach Inkubation mit αCD11b, αCD45 Antikörper im FACS Canto II (s. Kapitel 2.2.7).

2.2.4.8 Gemischte Leukozyten Reaktion

Die gemischte Leukozytenkultur diente zum Nachweis der APC vermittelten Immunität auf CD4⁺ T Zellen. Zur Vorbereitung wurden alloreaktive CD11b⁺ Zellen aus dem Transplantat (bm12-B6) an Tag 20 *post transplantationem* isoliert (s. Kapitel 2.2.4.7) und mittels MACS Aufreinigung (s. Kapitel 2.2.4.6) konzentriert. In einer 96-round-bottom Zellkultur-Platte wurden die gewonnenen Zellen für 4 Tage im Primärzellmedium mit LP17 oder dem Kontrollpeptid (200.000 Stimulator-Zellen pro Well) inkubiert. Am gleichen Tag erfolgte die Isolation und Aufreinigung von naiven CD4⁺ Zellen aus einer B6 Milz (s. Kapitel 2.2.4.3 und 2.2.4.6). Diese wurden in einer Anzahl von 100.000 Zellen pro Well zu den bereits

ausplattierten CD11b⁺ Zellen zugesetzt. Nach 4 Tagen wurden die Zellen geerntet und im MACS Puffer 2x gewaschen. Die Zellen wurden für das Durchflusszytometer gefärbt (s. Kapitel 2.2.7.1) und im FACS Canto II analysiert.

2.2.4.9 “Enzyme-linked Immunosorbent Assay” (ELISA)

Die ELISAs wurden laut Anweisung des Herstellers durchgeführt. Dabei wurde das entsprechende Zytokin von spezifischen Antikörpern auf der Oberfläche der Mikrotiterplatte gebunden und durch einen Detektionskomplex nachgewiesen. Der Komplex wurde mit Hilfe einer Farbreaktion am ELISA-Reader quantitativ über Vergleich mit einer Standardreihe ausgewertet.

Für die Bestimmung von IFN γ , IL-6, IL-12(p70) und IL-17A wurden CD4⁺ oder CD11b⁺ Zellen (1x10⁶ Zellen / ml) aus den Transplantaten (allogen und syngen) oder der Milz von B6 Tieren isoliert und aufgereinigt (s. Kapitel 2.2.4.3 und 2.2.4.6). CD4⁺ Lymphozyten wurden mit α CD3 (10 μ g/ml) und α CD28 (1 μ g/ml) Antikörper für 48 h im Primärzellmedium stimuliert. CD11b⁺ Zellen erhielten eine Behandlung mit LP17 oder Kontrollpeptid (10 μ g/ml) für 48 h. Die Überstände wurden am Tag der Ernte zentrifugiert (5 min, 1500 rpm, 4°C) und bei -20°C gelagert.

2.2.5 *In vivo Methoden - Adoptiver Transfer von Lymphozyten*

Der adoptive Transfer bezeichnet die Übertragung einer immunologischen Reaktionsbereitschaft auf den Donor. Dabei werden immunkompetente Zellen eines Spenders auf einen Empfänger übertragen. Die immunologische Reaktion der übertragenen Zellen konnte so auf das Verhalten des Allografts untersucht werden.

Zu Beginn wurden Balb/c Herzen in Rag1^{-/-} Rezipienten transplantiert. Diese Empfängertiere sind für B- und T-Zellen defizient. An Tag 3 *post transplantationem* wurden die Rezipienten mit 5x10⁶ CD3⁺ Zellen *i.p.* behandelt. Die Isolierung der CD3⁺ Zellen erfolgte aus B6 Wildtyp Milzen (s. Kapitel 2.2.4.3) und wurden, wie in Kapitel 2.2.4.6 beschrieben, über eine MACS-Säule angereichert. Um die Reinheit der CD3⁺ Lymphozyten zu erhöhen, wurde die Zellsuspension 2x über LS-Säulen aufgereinigt. Dabei konnte eine Reinheit von etwa 97% erreicht werden.

Die rekonstituierten Rezipienten wurden außerdem mit LP17 oder dem Kontrollpeptid ab Tag 3 *post transplantationem* behandelt. In regelmäßigen Zeitabständen wurde die Schlagkraft des Herzens palpatorisch untersucht. Für die immunologische Charakterisierung des Modells, wurden die Donorherzen an Tag 18 *post transplantationem* entnommen und, wie in Kapitel 2.2.1.3 beschrieben, aufgearbeitet.

2.2.6 Molekularbiologische Methoden

2.2.6.1 RNA Isolation

Bei der Arbeit mit RNA wurde eine Reihe von Maßnahmen getroffen, um das gegenüber endogenen und exogenen RNAsen sehr empfindliche Molekül zu schützen und Kontaminationen zu vermeiden. Dazu gehörten die Benutzung von Filterspitzen, RNase-freie Plastikware und die ständige Lagerung der Proben auf Eis (soweit nicht anders vorgegeben). Die angewendete Methode beruhte auf der Phenol-Chloroform-Extraktion. Das Prinzip dieser biochemischen Extraktionsmethode begründet sich auf den unterschiedlichen Löslichkeiten der zu extrahierenden Substanzen in einer zweiphasigen Emulsion. Die Trennung erfolgt mit Phenol und Chloroform. Es bildet sich ein Zwei-Phasen-System (s. Abb. 11), bei dem die verschiedenen Makromoleküle in unterschiedlichen Schichten zu finden sind. Genomische DNA sammelt sich dabei nach der Zentrifugation an der Grenze zur unteren organischen Phase (Phenol-Chloroform), während die RNA in der oberen (wässrigen) Phase gelöst befindet. Proteine befinden sich in der unteren organischen Phase. Nukleinsäuren werden mit Isopropanol, zum Entzug des Hydratwassers, gefällt (s. Abb. 11). Zur Entfernung der zurückgebliebenen Salze wird Ethanol eingesetzt. Es ist leicht flüchtig und somit leichter von der gefällten Nukleinsäure zu entfernen.

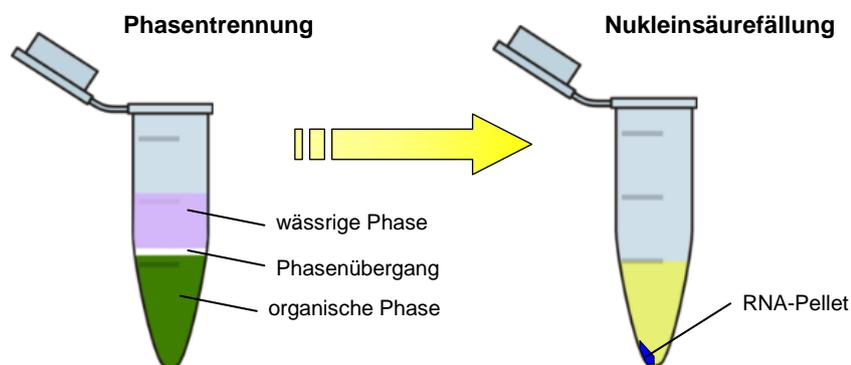


Abb. 11: Schematische Darstellung der Phenol-Chloroform-Extraktion.

Für die Präparation der RNA wurden die Proben aus -80°C entnommen und mittels Skalpell schnell zerkleinert. In TRI[®] Reagenz werden die Gewebefragmente weiter mit einem Mörser zerkleinert und 3 min bei RT inkubiert. Die Suspension wurde nun über eine QIASHredder[™]-Säule (Qiagen, Hilden) 1 min bei 13.000 rpm und 4°C abzentrifugiert. Der Durchfluss wurde in ein 2 ml Eppendorf Reaktionsgefäß überführt, 200 μl Chloroform zugegeben und „hand-over“ ca. 15 sec gemischt. Es folgte eine Inkubation von 3 min bei RT und einer anschließenden Zentrifugation für 15 min bei 15.000 rpm und 4°C . Dabei erfolgte die Phasentrennung der Substanzen mit unterschiedlichem Lösungsgrad. Für die Gewinnung der RNA wurde die wässrige Phase vorsichtig abpipettiert und mit 500 μl Isopropanol für 10 min bei RT inkubiert. Die dadurch gefällte RNA wurde nach einer erneuten Zentrifugation bei

12.000 rpm für 10 min bei 4°C als weißes Pellet sichtbar. Für die Erhöhung des Reinheitsgrades der RNA wurde das Pellet mit 75%igem Ethanol 2x gewaschen und erneut zentrifugiert (7.500 rpm, 5 min, 4°C). Nach der Trocknung erfolgte die Lösung des Pellet in 20-80 µl DEPC (je nach Pelletgröße), wodurch eventuell vorhandene RNAsen vernichtet werden. Die isolierte RNA wurde, wenn sie nicht sofort weiter verwendet, bei -80°C gelagert.

2.2.6.2 RNA-Quantifizierung

Die Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren erfolgte durch Messung der optischen Dichte (OD) mit Hilfe des Photometers von Eppendorf (Heidelberg). Nukleinsäuren besitzen ein Absorptionsmaximum bei einer Wellenlänge von 260 nm. Liegt RNA vor, so entspricht eine OD₂₆₀ von 1,0 einer Konzentration von 40 µg/ml. Proteine hingegen besitzen ihren Absorptionspeak bei 280 nm. Die Reinheit der Nukleinsäure wurde über den Quotienten von 260 nm zu 280 nm Wert bestimmt, wobei der Quotient bei reinen RNA-Lösungen einen Wert von 1,8 erreichen sollte.

Die isolierte RNA wurde dazu 1:30 verdünnt und in eine Küvette pipettiert. Die gemessenen Spektren, Absorptionswerte und Konzentrationen wurden anschließend von dem Gerät dargestellt. Für die anschließende reverse Transkription wurden nur RNA Proben mit einem Reinheitsgrad von 1,65-1,85 verwendet.

2.2.6.3 Reverse Transkription

Die Abkürzung cDNA steht für „complementary DNA“ und ist das Ergebnis der Behandlung von RNA mit dem Enzym Reverse Transkriptase in Gegenwart von NTPs. Dabei schreibt die reverse Transkriptase, die als Matrize dienende mRNA, ausgehend von angelagerten Primern, zu einer komplementären, einzelsträngigen DNA (cDNA) um.

Zur Herstellung wurde ein QPCR cDNA Synthese Kit verwendet und nach den Angaben des Herstellers vorgegangen. Innerhalb einer Versuchsreihe wurde von jeder zu analysierenden Probe dieselbe Menge RNA in die reverse Transkription eingesetzt. Die so entstandene cDNA wurde bei -20°C gelagert oder sofort für die Amplifizierung (PCR; s. Kapitel 2.2.6.5) weiter verwendet.

2.2.6.4 Primer

Die Primer wurden aus dem Programm „Primer3“ oder „Universal ProbeLibrary“ und aus den entsprechenden Gensequenzen (aus Pubmed Nucleotide von <http://www.pubmed.com/nucleotide> oder e!Ensembl) designt. Dabei wurde die Schmelztemperatur (TM) so gewählt, dass der Sense und der Anti-Sense Strang sehr ähnliche Bedingungen aufweisen. Auch der GC-Gehalt spielte bei dem Primer-Design eine wesentliche Rolle, da die Wasserstoffbrücken eines GC-Basenpaares zur Stabilität der

Doppelhelix beitragen, während die Wasserstoffbrücken eines AT-Basenpaares sogar destabilisierend wirken. Der GC-Gehalt sollte in der Regel zwischen 55 bis 60% betragen. Die Länge des Primers (typisch 18 bis 25 Nukleotide) wird so gewählt, dass seine Schmelztemperatur passend zur Annealing-Temperatur des PCR-Prozesses ist. Außerdem sollte das Amplifikat der gewählten Primer eine maximale Länge zwischen 70 und 200 bp besitzen. Die gewählten Primer (s. Tabelle 6) wurden bei der Amplifikation einer Verdünnungsreihe auf ihre Effizienz getestet.

Zielgen	Sequenz (5' nach 3')	Länge (bp)	T_M (°C)	GC (%)	Produktgröße
<i>Pro-collagen 1 a (sense)</i>	TGT TCA GCT TTG TGG ACC TC	20	58,85	50	150 bp
<i>Pro-collagen 1 a (anti-sense)</i>	TCA AGC ATA CCT CGG GTT TC	20	60,07	50	
<i>IL-6 (sense)</i>	CCG GAG AGG AGA CTT CAC AG	20	64	60	102 bp
<i>IL-6 (anti-sense)</i>	TCC ACG ATT TCC CAG AGA AC	20	64	50	
<i>IL-23a (sense)</i>	CCA GCG GGA CAT ATG AAT CT	20	55,3	50	190 bp
<i>IL-23a (anti-sense)</i>	CAT GGG GCT ATC AGG GAG TA	20	55,5	55	
<i>β-aktin (sense)</i>	AG AGG GAA ATC GTG CGT GAC	20	66,4	55	138 bp
<i>β-aktin (anti-sense)</i>	CAA TAG TGA TGA CCT GGC CGT	21	66	52,4	

Tabelle 6: Sequenzen der Primerpaare (PCR).

2.2.6.5 Real-Time Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Diese quantitative PCR-Methode ermöglicht die Visualisierung der Amplifikation der Proben in Echtzeit. Die Menge der DNA wird dabei am Ende der Elongation in jedem Zyklus über die Anzahl der eingelagerten fluoreszierenden Reporterfarbstoffe indirekt gemessen. Die Fluoreszenz steigt dabei proportional zur Produktmenge an. Aus der exponentiell entstandenen Probenanalyse wurde der CT-Wert („Threshold Cycle“) ermittelt, bei dem das erste Mal ein statistisch signifikantes Reportersignal detektiert wurde. Die Signale konnten mit Hilfe der Computersoftware von Roche (Mannheim) - LightCycler® 480 SW 1.5 und LightCycler3 Version 3.5 - abgelesen und quantifiziert werden.

Jede Proben-Analyse wurde im selben Reaktionsansatz dreifach durchgeführt. Das PCR Reaktionsgemisch wurde auf Eis hergestellt. Die Herstellung der Reagenzien und des Mastermix wurden entsprechend den Empfehlungen des Herstellers gewählt. Als Negativkontrolle wurde der Mastermix mit Primer ohne cDNA pipettiert. Die Aktivierung der DNA-Polymerase erfolgt für 10 min bei 95°C. Die beiden folgenden Schritte aus cDNA-Denaturierung für 15 sek bei 95°C, Primer-Anlagerung und Elongation der Primer (s. Tabelle

7) wurden 40-mal wiederholt. Während der Phase der Primer-Anlagerung und Elongation erfolgte die Messung der Fluoreszenz bei 500 nm, da SYBR[®] Green mit doppelsträngiger DNA interkaliert. Im Anschluss daran erfolgte eine Schmelzkurvenanalyse, bei der es zu einer schrittweisen Erhöhung der Temperatur auf 95°C kommt, um bei der für das Amplifikat spezifischen Denaturierungstemperatur die Freisetzung von SYBR[®] Green detektieren zu können. Auf diese Weise können Kontaminationen und unspezifische Amplifikate eruiert werden.

Primer	Schmelztemperatur	Zeit (Sek)
<i>Kollagen</i>	60°C	7
<i>IL-6</i>	60°C	7
<i>IL-23a</i>	60°C	7
<i>β-Aktin</i>	64°C	7

Tabelle 7: Definierte Primerkonditionen.

Als Kontrolle für die korrekte Produktbildung, wurde die amplifizierte DNA mittels Gelelektrophorese aufgereinigt und isoliert (s. Kapitel 2.2.6.6 und 2.2.6.7). Diese wurde anschließend bei der Firma GeneArt (Regensburg) sequenziert (s. Kapitel 2.2.6.8) und mit der Sequenz in Pubmed verglichen.

Auswertung

Ziel der Auswertung war es, eine Aussage darüber treffen zu können, um wie viel höher oder niedriger ein Gen in einem Gewebe / Zellverband im Vergleich zur Referenz exprimiert wird. Im Programm Microsoft Excel wurde aus den angegebenen CT-Werten der in Triplikaten pipettierten Probe der Mittelwert gebildet, und von diesem der Mittelwert der CT-Werte des Referenzgens („Housekeeping Gen“) derselben Probe abgezogen. Es wurde die Konzentration des Referenzgens so gewählt, dass es in verschiedenen Proben in etwa gleich hoch exprimiert wird. Für diese Arbeit wurde *β-aktin* als Referenzgen verwendet. Der durch Subtraktion der beiden Mittelwerte erhaltene, auf das Referenzgen normalisierte Wert, wurde als Δ CT bezeichnet (Normalisierung) und für grafische Auswertungen herangezogen. Die weitere statistische Auswertung erfolgte mit Hilfe des SEM.

2.2.6.6 DNA-Elektrophorese

Die DNA-Gelelektrophorese ist eine Methode, um Nukleinsäurestränge nach ihrer Größe zu trennen. Agarosepolymere werden dabei zu einem Gel vernetzt. Je höher die Agarose konzentriert ist, desto kleiner sind die Poren im Gel. Dadurch entsteht ein Sieb für Moleküle,

wo negativ geladene Nukleinsäure-Moleküle über ein elektrisches Feld durch die Gelmatrix gezogen werden. Dabei bewegen sich kleinere Moleküle schneller durch das Gel, wodurch eine Auftrennung der Stränge nach ihrer Größe ermöglicht wird.

Für diese Studie wurde ein 1,1%iges Gel verwendet. Dazu wurde 0,75 g Agarose mit 50 ml 1x TAE und 20 ml Millipore gemischt. Die Agarose wurde aufgekocht und auf etwa 60°C abgekühlt. Nach der Zugabe von 1 µl Ethidiumbromid, zur Sichtbarkeit der DNA unter UV-Licht, wurde das Gel gegossen. Als Laufpuffer diente 1x TAE Puffer. Der Ladepuffer für die DNA wurde in einem Verhältnis von 1:20 eingesetzt. Nach dem Auftragen der Proben erfolgte der Lauf bei 50-55 V für 30 min.

2.2.6.7 Isolierung von DNA-Fragmenten durch Gelextraktion

Die DNA-Fragmente wurden nach dem Gel-Lauf (s. Kapitel 2.2.6.6) unter UV-Licht sichtbar gemacht und mit Hilfe eines Skalpells ausgeschnitten. Die DNA wurde mit dem „MinElute DNA Extraction Kit“ (Qiagen, Hilden) nach Herstellerangaben aufgereinigt und in DEPC Wasser gelöst. Die Konzentration und Reinheit wurde photometrisch, wie in Kapitel 2.2.6.2 beschrieben, quantifiziert.

2.2.6.8 DNA-Sequenzierung

Die DNA-Sequenzierung wurde von der Firma GeneArt, Regensburg durchgeführt. Die gewünschten PCR-Produkte wurden nach Aufreinigung durch Gelextraktion (s. Kapitel 2.2.6.7) in einer Konzentration von 300 ng/µl verschickt. Die Sequenzdaten wurden etwa 1-2 Tage später per Mail zugestellt.

2.2.7 Durchflusszytometrie

Die Methode der Durchflusszytometrie wird bei Einzelzellsuspensionen zur Analyse von Fluoreszenz- und Streulichteigenschaften eingesetzt. Dabei wird mit Hilfe eines Lasers, je nach Zellgröße, Oberflächenbeschaffenheit und Granularität der Zelle, ein sogenanntes Streulicht abgelenkt und detektiert. Hierbei werden die Zellen über ein Schlauchsystem aufgesaugt und so beschleunigt, dass sie hintereinander aufgereiht werden und einzeln in die Messkammer gelangen. Dort wird jede Zelle vom Laserstrahl getroffen. Das gestreute Licht wird bei 180° (FSC = „forward light scatter“) und bei 90° (SSC = „side light scatter“) gemessen (s. Abb. 12). Die entstehende Streuung ist zelltypspezifisch und abhängig von der Größe der Zellen (FSC) sowie deren Granularität (SSC).

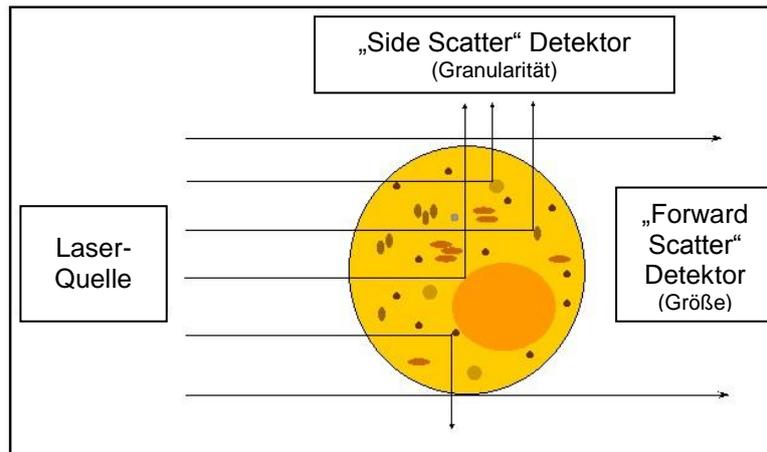


Abb. 12: Darstellung des FSC und SSC. Modifiziert nach <http://www.uams.edu/flowcytometry/Images/FSC&SSC.jpg>

Die entstandenen Messdaten werden in einer Einparameterdarstellung als Histogramm oder in Zweiparameterdarstellung als Dot Plot dargestellt. Zellpopulationen können so anhand der Größe und Granularität unterschieden werden (s. Abb. 13). Bei den für die Versuche verwendeten Durchflusszytometern handelte es sich um das FACS Calibur und FACS Canto II.

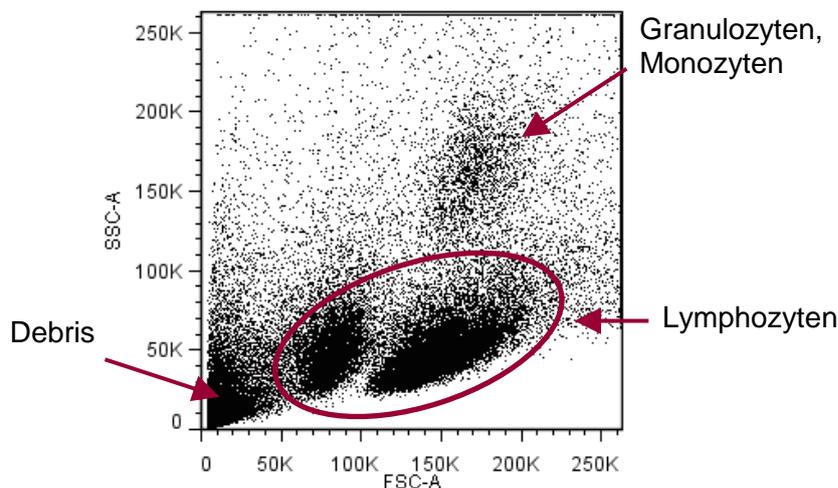


Abb. 13: Darstellung der Zell-Subpopulationen im FSC vs. SSC.

Das FACS Calibur verfügt über zwei Laser und die Auflösung von vier fluoreszierenden Farben. Der Detektor FL1 kann eine optimale Emission bei 530 nm erfassen. Dies entspricht der grünen FITC und CFSE Fluoreszenzintensität. FL2 kann hingegen die Emission bei 585 nm von PE detektieren. Die violett fluoreszierende Intensität für PerCP, PI oder Cy5 werden durch den Langwellen-Filter ab 670 nm auf den FL3 Detektor geleitet. Die Emissionen, die in FL1 bis FL3 detektierbar sind, werden durch einen Argonlaser mit der Absorptionswellenlänge 488 nm angeregt. Ein weiterer Diodenlaser, der separat hinzugeschaltet werden kann, ermöglicht eine Anregung bei 635 nm für die APC Fluoreszenzintensität und eine Detektion der Emission bei optimal 660 nm im FL4 Kanal.

Das FACS Canto II hingegen verfügt über einen zusätzlichen Laser. Dieser Helium-Neon-Laser regt die Pacific-Blue oder „Cycle Dye“ Fluoreszenzintensität im violetten Bereich bei 405 nm an. Dadurch sind bis zu 8 Farben messbar. Die Autofluoreszenz wurde durch Negativkontrollen bestimmt und am Computer diskriminiert.

Für die Vergleichbarkeit der prozentualen Verteilung von verschiedenen Zellpopulationen wurde darauf geachtet, dass innerhalb einer Versuchsreihe immer die gleiche Anzahl von Gesamtlymphozyten aufgenommen wurde. Bei der Auswertung im entsprechenden Computerprogramm (CellQuest, FACSDiva bzw. FlowJo) wurde der Dot Plot u.a. in Quadranten unterteilt sowie die Verteilung der Zellen ermittelt.

2.2.7.1 FACS Färbemethode

Extrazelluläre FACS Färbung / Oberflächenfärbung

Je nach Fragestellung wurden die isolierten Leukozyten in MACS-Puffer aufgenommen und mit den entsprechenden Antikörpern (s. Kapitel 2.1.1) in einer Konzentration von 1 µl pro 1×10^6 Zellen (oder 10 µl pro 1×10^6 Zellen bei Antikörpern von R&D) für 20 Minuten bei 4°C im Dunkeln inkubiert. Nach 2x Waschen mit 1x MACS-Puffer und anschließender Zentrifugation (1500 rpm, 4°C für 5 min) konnten die Proben im FACS Calibur oder FACS Canto II gemessen werden. Um die Zellen zu fixieren, wurden diese für 10 min bei RT mit 500 µl „Flow Cytometry Fixations Buffer“ behandelt. Nach einem erneuten Zentrifugationsschritt (1500 rpm, 4°C für 5 min) konnten die Zellen bis zu 7 Tage auf 4°C im 1x MACS-Puffer gelagert und im FACS-Gerät gemessen werden.

Intrazelluläre FACS Färbung

Das Prinzip der Intrazellulärfärbung der Zytokine dient zum Nachweis funktionell aktiver Leukozyten. Hierfür werden die Zellen *in vitro* stimuliert und die Zytokinsekretion durch Zugabe des Sekretionshemmers Brefeldin A inhibiert. Nach der Oberflächenfärbung erfolgt die Fixierung mit nachfolgender Permeabilisierung der Zellen, die die intrazelluläre Färbung der akkumulierten Zytokine ermöglicht. Hierdurch können zeitgleich Phänotyp und funktionelle Aktivität unterschiedlicher Lymphozytenpopulationen bestimmt werden.

Für die durchflusszytometrische Untersuchung der Zytokinproduktion von IL-17A und IFN γ wurden die Zellen zunächst für 3 Stunden bei Zellkulturbedingungen (s. Kapitel 2.2.4.5) und mit 50 ng/ml PMA, 750 ng/ml Ionomycin und 1µl/ml Brefeldin A (GolgiStop) inkubiert. Im Anschluss wurden die Zellen geerntet, pro FACS-Ansatz in FACS Röhrchen aufgeteilt und mit 1x MACS-Puffer gewaschen. Nach einem Zentrifugationsschritt (1500 rpm, 4°C, 5 min) und direkter Antikörperfärbung der Oberflächenmoleküle wurden die Zellen für 10 min bei RT in 500 µl / 10^6 Zellen „Flow Cytometry Fixation Buffer“ fixiert. Nach einer Zentrifugation bei 1500 rpm, 4°C und 5 min erfolgte ein Waschschriff mit 500 µl „Flow Cytometry

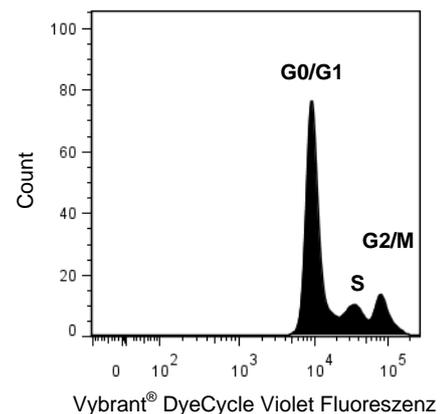
Permabilizations/wash Buffer I“. Die permeabilisierten Zellen konnten nun nach einer weiteren Zentrifugation (1500 rpm, 4°C, 5 min) intrazellulär für 20 min bei 4°C gefärbt werden. Nach erneutem Waschen mit „Flow Cytometry Permabilizations/wash Buffer I“ wurden die Zellen in 1x MACS-Puffer aufgenommen und durchflusszytometrisch analysiert.

Färbung des Zellzyklus der Zelle: „Cycle Dye“

Um den zyklischen Ablauf während einer Zellteilung genauer untersuchen zu können, wurde das „Vybrant® Cycle Dye“ eingesetzt. Dieser Fluoreszenzfarbstoff ist permeabel und kann so an die DNA von proliferierenden Zellen binden. Nach der Kopplung an die DNA wird ein Fluoreszenzsignal gemessen, das sich proportional zur DNA Menge verhält. Mit Hilfe eines Histogramms wird so der Zellzyklus im FACS dargestellt. Es entstehen in der Regel zwei Peaks. Der Peak in der G0/G1 Phase zeigt diploide Zellen. Beim zweiten Peak befinden sich die Zellen in einem postreplikativen Status (G2/M Phase). Dazwischen befinden sich Zellen mit intermediärem DNA Gehalt, welche gerade die Synthesephase des Zellzyklus durchlaufen (S-Phase; s. Abb. 14).

Abb. 14: Zellzyklus-Analyse mit „Cycle Dye“.

Histogramm von CD11b⁺ Zellen die sich im Zellzyklus befinden und mit „Vybrant® DyeCycle“ behandelt wurden. Der Peak in der G0/G1 Phase zeigt die höchste DNA Menge. Der zweite Peak zeigt die S Phase. Zum Schluss folgt die G2/M Phase.



Um die Zellen im jeweiligen Zellzyklus erfassen zu können, wurden diese nach der Isolation (s. Kapitel 2.2.4.1 oder 2.2.4.2) und nach der FACS Färbung (s. Kapitel 2.2.7.1) für 20 min mit dem „Cycle Dye“ (0,5 µl / 500 ml HBSS / 1x10⁶ Zellen) bei 37°C inkubiert. Anschließend erfolgte, ohne einen Zentrifugationsschritt, sofort die Messung im FACS Canto II. Nach dem Setzen eines Gates auf die gewählte Zellsubpopulation, konnte so der Zellzyklus im Histogramm dargestellt werden.

2.2.8 Bestimmung von Zytokinen mittels „Cytometric Bead Array“ (CBA)

Beim CBA handelt es sich um einen partikelbasierten Immunoassay, der es ermöglicht lösliche Produkte, wie z. B. Zytokine im Zellkulturüberstand oder Serum quantitativ über eine zytometrische Analyse zu bestimmen. Jeder Bead ist mit einem Antikörper beschichtet, der spezifisch für ein bestimmtes Protein ist und dieses effektiv binden kann. Die Beads tragen zusätzlich Fluoreszenzmoleküle, wodurch sie im FACS eindeutig durch Emission und Größe identifizierbar sind. Mit dem CBA konnte bei geringen Probenvolumen mehrere Zytokine bei

hoher Probenanzahl gemessen werden und wurde für Serumanalysen dem ELISA vorgezogen.

Im Rahmen dieser Doktorarbeit wurde Serum von den Empfängertieren an Tag 6, 12 und 20 *post transplantationem* entnommen. Dazu wurde den Rezipienten nach Isoflurannarkose das Abdomen geöffnet und Blut aus der *Vena cava* entnommen. Um eine vollständige Gerinnung zu gewährleisten, wurde das Blut für 10 min bis 1 h bei RT gelagert. Anschließend wurde der Blutkuchen für 20 min bei 4000 rpm und 4°C zentrifugiert. Das Serum im Überstand wurde vorsichtig abpipettiert und bei -80°C gelagert.

Mit dem verwendeten CBA von BD für Th1, Th2 und Th17 war es möglich IFN γ , IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, IL-17A und TNF quantitativ zu bestimmen. Jedes Zytokin hatte dabei eine unterschiedliche Fluoreszenzintensität (s. Abb. 15). Der Assay wurde nach Angaben des Herstellers durchgeführt, im FACS Calibur gemessen und im FlowJo ausgewertet.

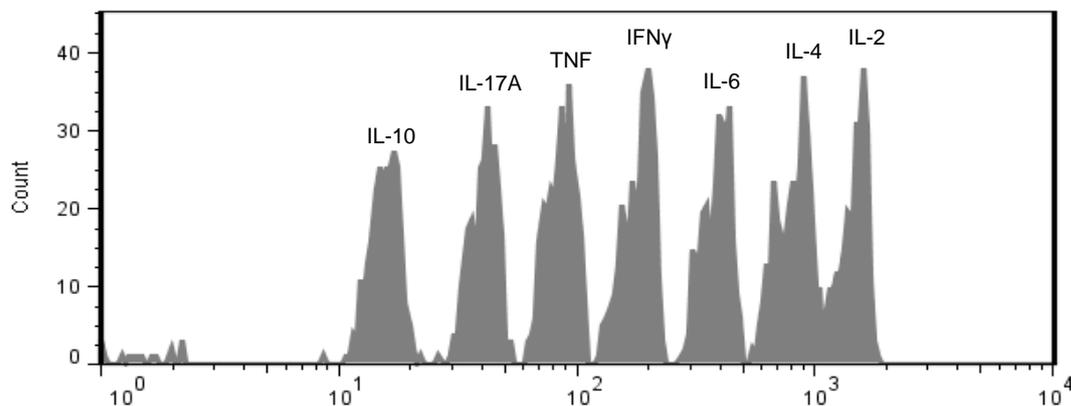


Abb. 15: Fluoreszenzintensität der einzelnen Zytokine im CBA.

Darstellung der 6 Bead-Gruppen mit unterschiedlichen Fluoreszenzintensitäten, die mit spezifischen Antikörpern für IFN γ , IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, IL-17A und TNF beschichtet sind.

2.2.9 Statistik

Für die statistische Auswertung wurden die üblichen Methoden zur Berechnung von Mittelwert (MW), Standardabweichung und „standard error of the mean“ (SEM) benutzt. Alle Berechnungen wurden mit Hilfe elektronischer Datenverarbeitung unter Microsoft Windows XP[®] und der Tabellenkalkulation Excel für Microsoft Windows XP[®] durchgeführt. Die statistische Auswertung erfolgte mit dem Programm GraphPad Prism. Die Signifikanz oder Unterschiede zwischen den Gruppen wurde mittels Student-T-Test überprüft. Für die Überlebenskurven wurden Kaplan-Meier Grafiken gewählt, die im GraphPad Prism (GraphPad Software Inc., La Jolla, USA) erstellt wurden. Gruppenvergleiche wurden dabei mit dem „log-rank“-Test (Mantel-Cox) durchgeführt. Unterschiede bei einem p-Wert <0,05 wurden als signifikant (*) angesehen und Unterschiede bei einem p-Wert von <0,001 als hoch signifikant (**) definiert.

*Im Idealen kommt alles auf den Sinn,
im Realen auf die Beharrlichkeit an.*
(Johann Wolfgang von Goethe)

3. ERGEBNISSE

3.1. Charakteristika einer chronischen Abstoßungsreaktion nach Herztransplantation

Im ersten Schritt wurden bm12 Donorherzen heterotop in B6 Spender transplantiert. Diese Kombination zeigt im MHC-II Molekül einen Antigen-Mismatch, der zu einer chronischen Abstoßungsreaktion führt. Das Transplantationsmodell wird mit einer MST von über 70 Tagen und der Ausbildung einer Transplantationsvaskulopathie innerhalb von 8 Wochen beschrieben (23, 68). Dazu müssen Donorherzen komplett perfundiert werden (3 ml Perfusionslösung über die *Vena cava* und 3 ml Perfusionslösung über den Aortenbogen und die Koronararterien). Durch eine reduzierte Perfusion (lediglich über die *Vena cava*) kann die chronische Abstoßungsreaktion zeitlich komprimiert werden. Die Auswirkungen zeigten sich zunächst im Funktionsverlust der Transplantate. Diese wurden mit einer MST von 28 Tagen bei einer reduzierten Perfusion der Spenderherzen beobachtet, während eine komplette Perfusion das Überleben der Transplantate weitgehend sicherte (s. Abb 16). Als Kontrolle diente eine syngene Herztransplantation (B6-B6), die sich in einer dauerhaften Akzeptanz des Spenderherzens äußerte.

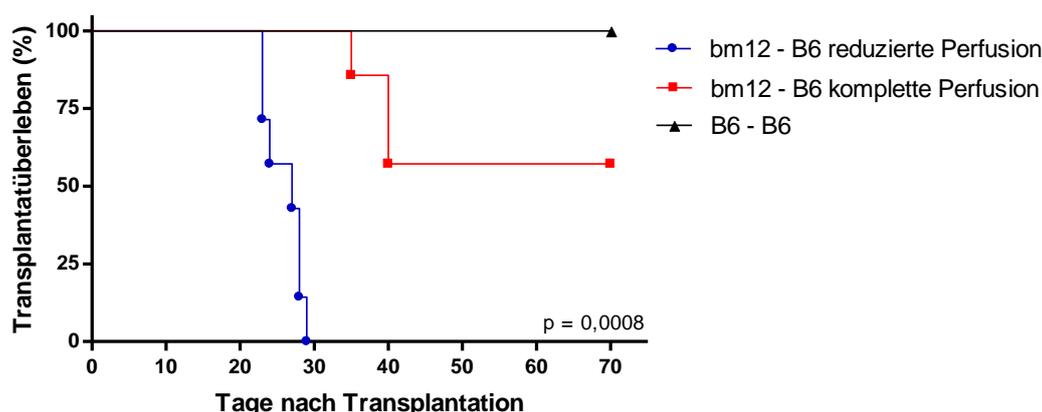


Abb. 16: Transplantatfunktion nach syngener und allogener Herztransplantation mit kompletter oder reduzierter Perfusion.

Das Überleben syngener B6-B6 und allogener bm12-B6 Herztransplantate wurde mittels Fingerpalpation im Verlauf der chronischen Abstoßungsreaktion überwacht. Bei syngener Transplantation wurde das Isograft dauerhaft akzeptiert (-▲-; $n = 5$). Die reduziert perfundierten Donorherzen wurden mit einer MST von 28 Tagen abgestoßen (-●-; $n = 7$). Komplett perfundierte Herzen überlebten mit einer geschwächten Schlagintensität über 70 Tage (-■-; $n = 7$). Überlebensdaten werden als Kaplan-Meier Plot dargestellt.

Der Vergleich zwischen reduzierter und kompletter Perfusion der Donorherzen an Tag 20 nach Transplantation zeigte, dass die histologischen Charakteristika einer chronischen Abstoßungsreaktion in der Gruppe mit kompletter Perfusion ansatzweise evident, jedoch in der reduzierten Perfusionsgruppe deutlich ausgeprägter sichtbar waren (s. Abb. 17, 18 und 20). Im Vergleich zur syngeneten Kontrollgruppe (s. Abb. 19) zeigten jedoch beide Perfusionsarten eine deutliche Ausprägung der Abstoßungsreaktion. Dabei kommt es im zeitlichen Verlauf der Abstoßungsreaktion zu einer progredienten perivaskulären Leukozyteninfiltration, vaskulärem und parenchymalem Schaden des transplantierten Organs und einer gesteigerten Transplantatvaskulopathie (s. Abb. 17 und 20). Mit Hilfe eines histologischen Scores konnten die Unterschiede der syngeneten und allogenen Transplantatabstoßungen nochmals verdeutlicht werden (s. Abb. 21).

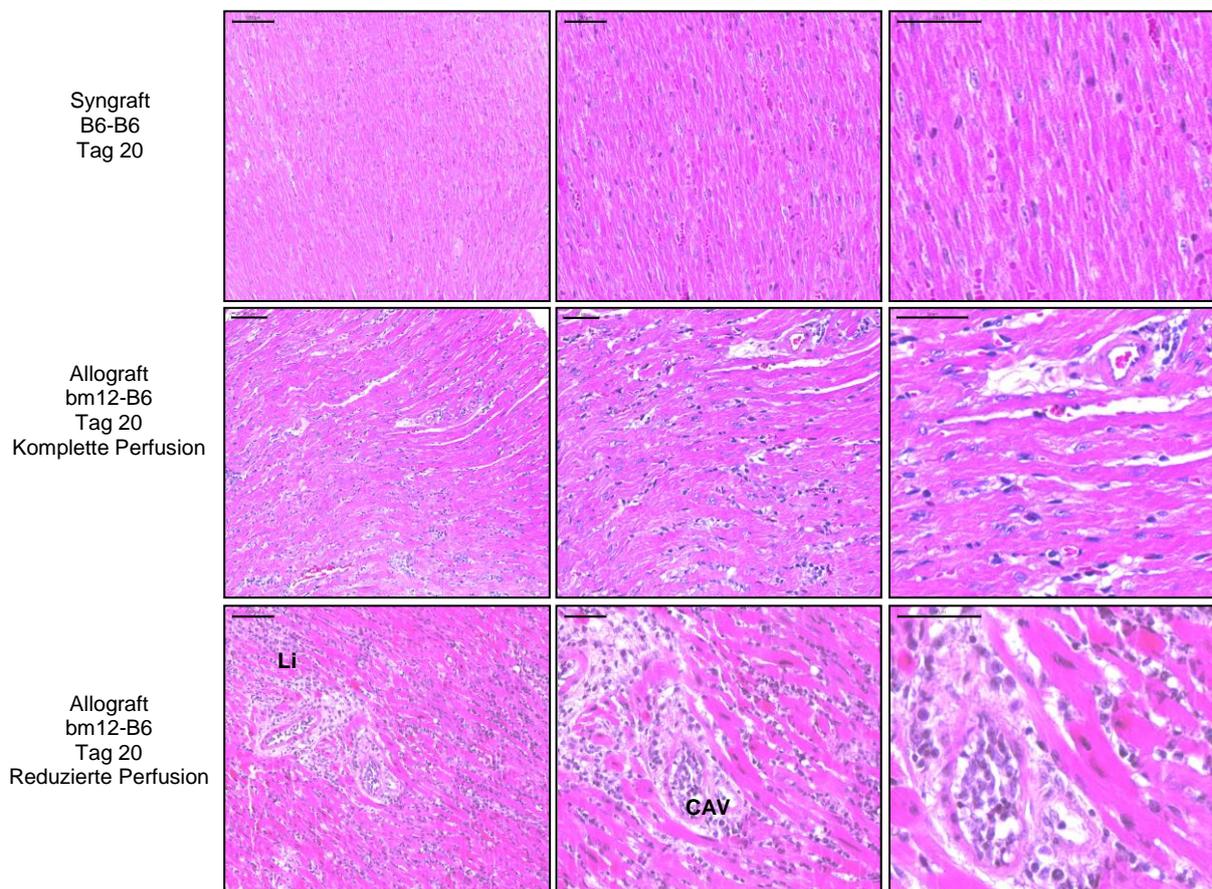


Abb. 17: Histologische Darstellung der Abstoßungsreaktion nach Herztransplantation an Tag 20.

Die histologische Auswertung zeigte eine zunehmende Leukozyteninfiltration bei reduziert perfundierten Donorherzen sowie einen luminalen Gefäßverschluss und parenchymalen wie auch vaskulären Schaden des Organs, im Vergleich zu einer kompletten Perfusion des transplantierten Herzens. Die gefärbten Myokardschnitte repräsentierten ein Transplantat aus einer Gruppe von $n = 5$ Tieren (Li = Perivaskuläre Leukozyteninfiltration, CAV = Transplantatvaskulopathie; Messbalken: linke Spalte, 100 μ m; mittlere und rechte Spalte, 50 μ m).

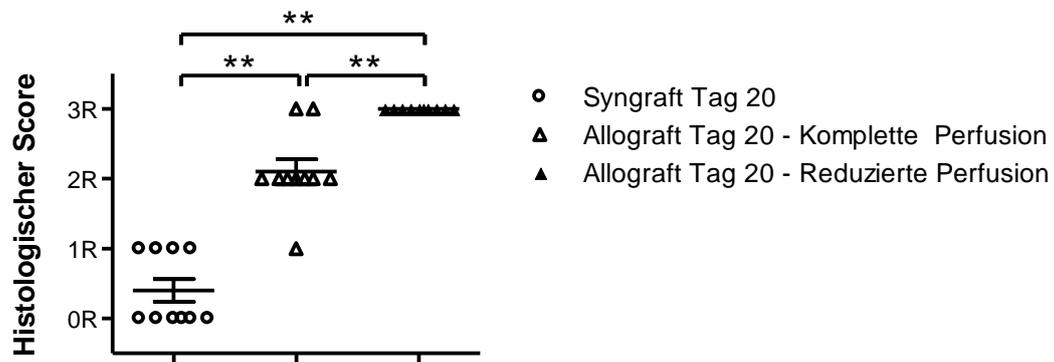


Abb. 18: Histologisches Scoring bei unterschiedlicher Perfusion der Donorherzen.

Die quantitative Auswertung der Histologie zeigte einen signifikanten Unterschied zwischen den syngen und allogenen Herztransplantaten ($n = 10, \pm \text{SEM}; **p < 0,001$).

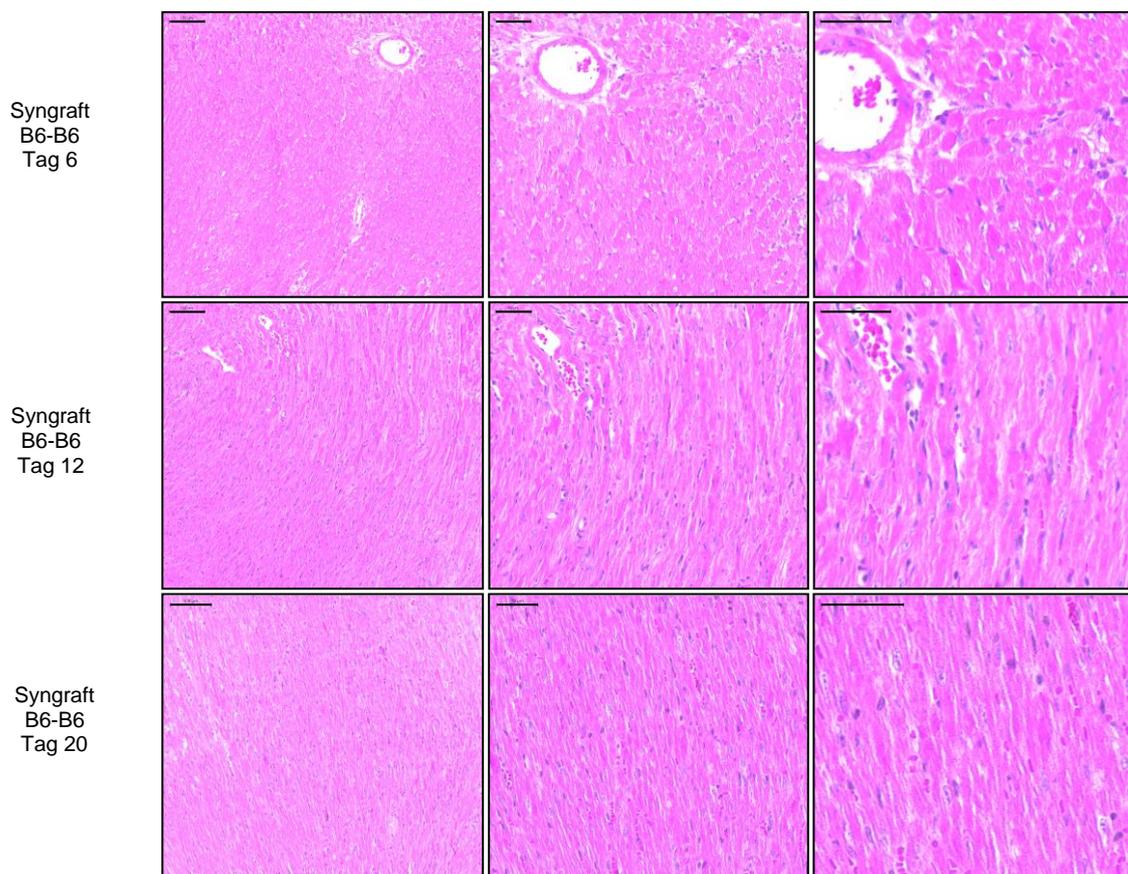


Abb. 19: Histologie der syngen transplantierten Donorherzen.

Da es sich bei den repräsentativen Gewebeschnitten um eine syngene Organverpflanzung handelt, waren die typischen chronischen Abstoßungscharakteristika, wie zelluläre Infiltration von Leukozyten, Proliferation der Gefäßzellen, vaskulärer und parenchymaler Schaden des transplantierten Organs und luminaler Gefäßverschluss (Vaskulopathie) nicht ausgeprägt. Messbalken: linke Spalte, 100 μm ; mittlere und rechte Spalte, 50 μm .

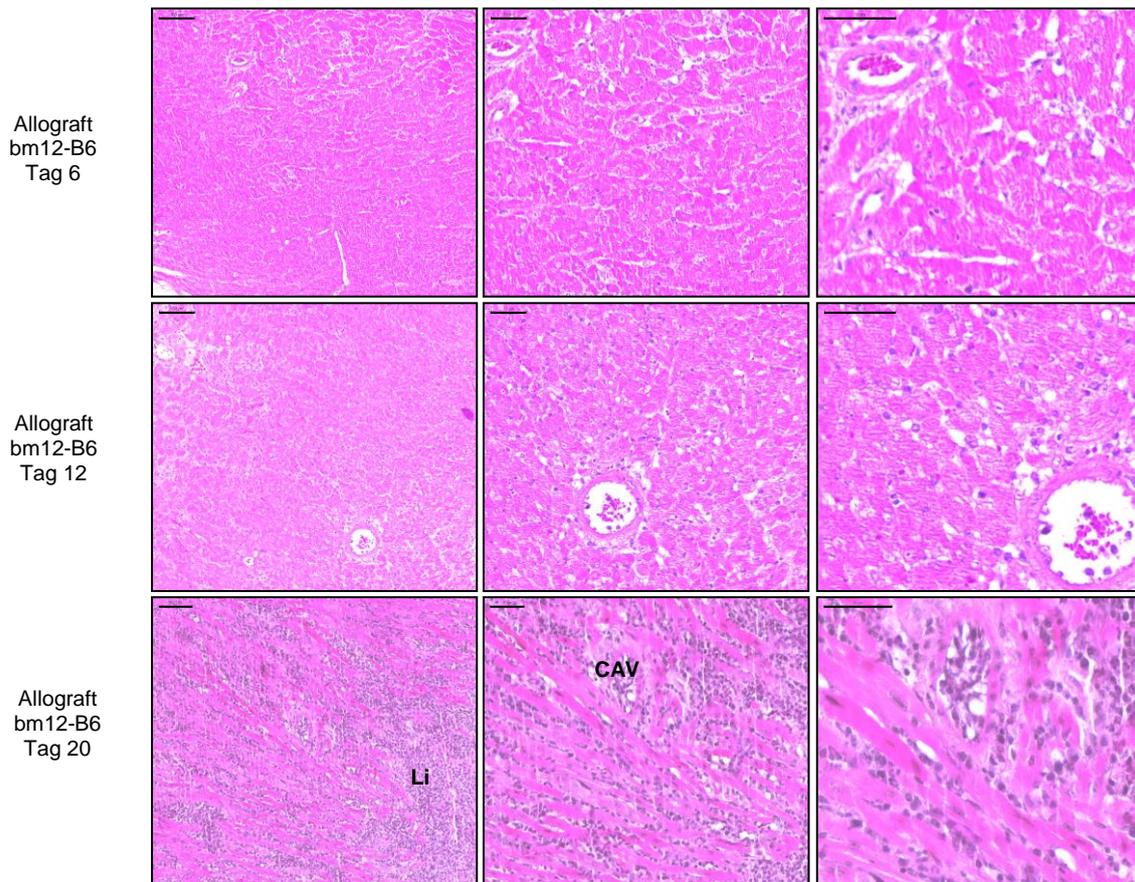


Abb. 20: Progredienter Verlauf der chronischen Abstoßungsreaktion im bm12-B6 Tiermodell bei reduzierter Perfusion.

Die histologischen Charakteristika der chronischen Abstoßungsreaktion umfassten die zelluläre Infiltration von Leukozyten, Proliferation der Gefäßzellen, parenchymaler und vaskulärer Schaden des transplantierten Herzens, die zu einem luminalen Gefäßverschluss (Vaskulopathie) führten (Li = Perivaskuläre Leukozyteninfiltration, CAV = Transplantatvaskulopathie; $n = 5$; Messbalken: linke Spalte, 100 µm; mittlere und rechte Spalte, 50 µm).

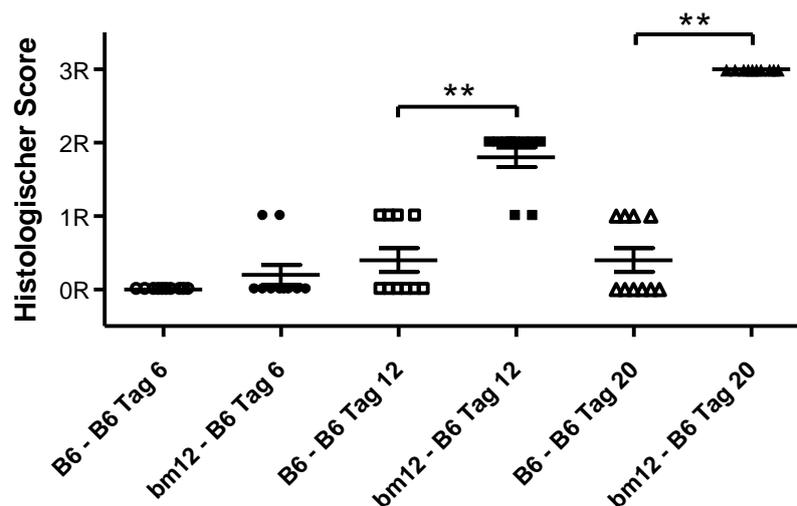


Abb. 21: Histologischer Score nach syngener und allogener Herztransplantation.

Die quantitative Auswertung der Histologie zeigte einen signifikanten Unterschied zwischen den syngenen und allogenen Herztransplantaten an Tag 12 und 20. An Tag 6 änderte sich wenig im histologischen Score zwischen syngener und allogener Transplantation ($n = 10$; \pm SEM; $**p < 0,001$).

Das chronische Abstoßungsverhalten mit einer perivaskulären Leukozyteninfiltration und lumenalem Verschluss der Gefäße konnte bei kompletter (an Tag 50) und reduzierter Perfusion (an Tag 20) festgestellt werden. Für alle weiteren Versuche wurde daher eine reduzierte Perfusion aufgrund ihrer zeitlich komprimierten Form der chronischen Abstoßungsreaktion einer kompletten Perfusion vorgezogen.

Ein histo-morphologischer Aspekt der chronischen Abstoßungsreaktion ist Fibrose, die sich in einer erhöhten Kollagenablagerung im Transplantat mit der Konsequenz eines strukturellen Organumbaus manifestiert (20, 22). Um dies in dem gewählten Tiermodell zu bestätigen, wurde zum einen eine Masson's Trichrom Färbung angefertigt und zum anderen die Expression von *collagen type I* quantitativ mittels PCR gemessen. Beide Analysemethoden zeigten eine deutliche Erhöhung des Kollagens bei kompletter und reduzierter Perfusion der Donorherzen im Vergleich zur syngeneten Kontrolle an Tag 20 *post transplantationem*. In der Gruppe der reduziert perfundierten Herzen konnte ein signifikanter Anstieg des Kollagens im Vergleich zu einer kompletten Perfusion dargestellt werden (s. Abb. 22 und 23).

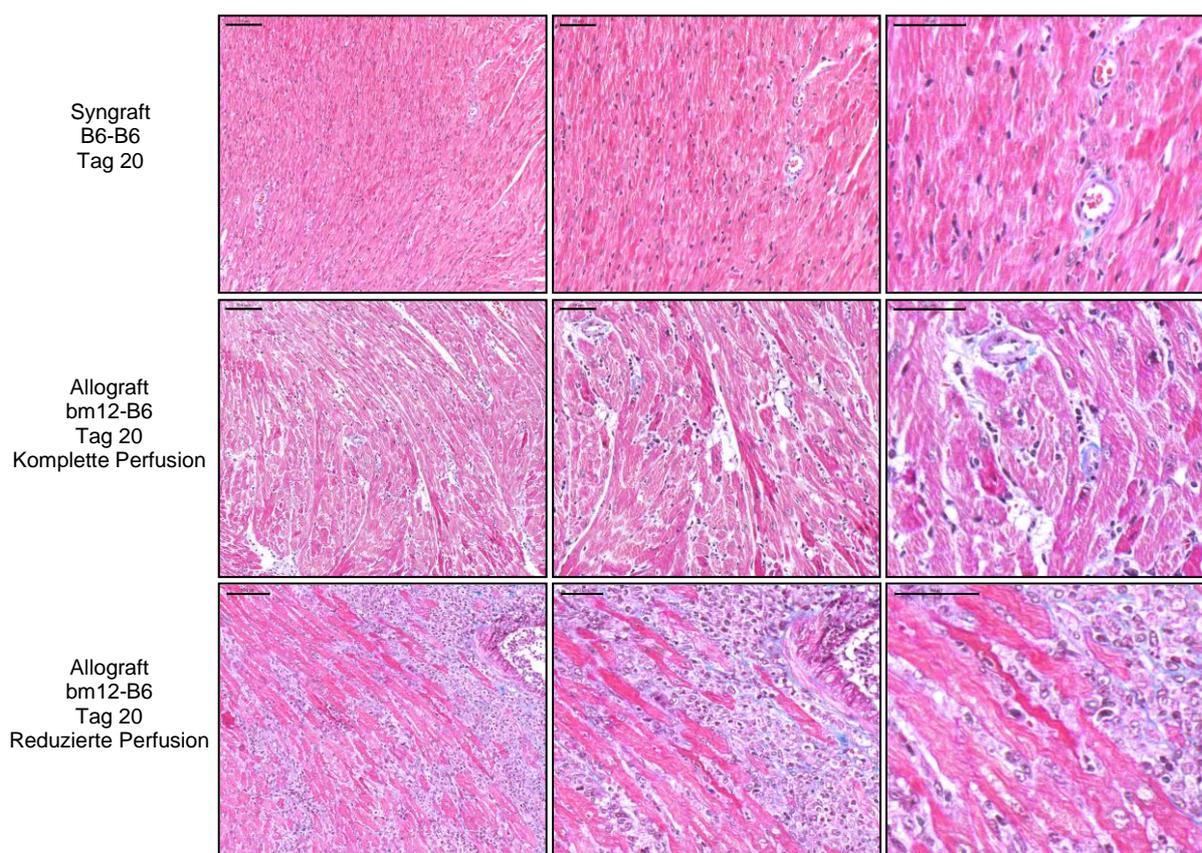


Abb. 22: Darstellung der Kollageneinlagerung in der chronischen Abstoßungsreaktion nach syngener und allogener Herztransplantation an Tag 20.

Die Organfibrose zeigte sich vermehrt in Donorherzen nach reduzierter Perfusion, im Vergleich zu einer kompletten Perfusion an Tag 20. Die gefärbten Myokardschnitte repräsentierten ein Transplantat aus einer Gruppe von $n = 5$ Tieren. Messbalken: linke Spalte, 100 µm; mittlere und rechte Spalte, 50 µm (Kollagenfasern in blau).

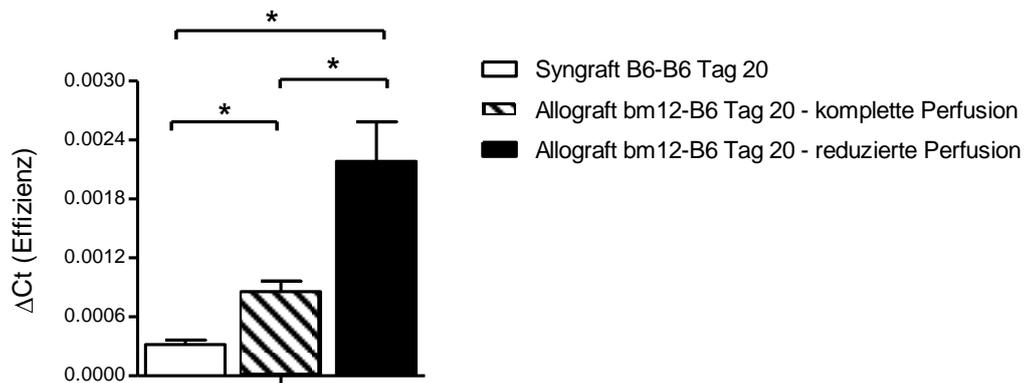


Abb. 23: Expression von Kollagen an Tag 20 post transplantationem.

Eine reduzierte Perfusion der Donorherzen führte zu einer signifikant erhöhten Ausprägung von *collagen type I* an Tag 20, im Vergleich zur kompletten Perfusion und syngenen Kontrolle ($n = 5$; \pm SEM; $*p \leq 0,05$).

Zytokine, zu denen u.a. Interferone und Interleukine gehören, regulieren das Wachstum und die Differenzierung von Zellen. Ebenso spielen verschiedene Zytokine eine wichtige Rolle bei der Immunreaktion gegen ein allogenes Transplantat. Um ein Bild über den Serum-Zytokinspiegel im Verlauf der chronischen Abstoßungsreaktion zu erhalten, wurden zunächst syngene und allogene Herzen transplantiert. An Tag 6, 12 und 20 wurde Blut von den Rezipienten entnommen und Seren gewonnen. Mittels CBA konnte anschließend das Serum zytometrisch auf IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, IL-17A, IFN γ und TNF untersucht werden. Die kinetische Analyse des pro-inflammatorischen Zytokins IL-6 zeigte eine Zunahme im Serum allogenen transplantierten Rezipienten an Tag 20, im Vergleich zu der syngenen Kontrollgruppe. Für alle weiteren Zytokine konnte nur ein geringer Konzentrationsunterschied gemessen werden (s. Abb. 24).

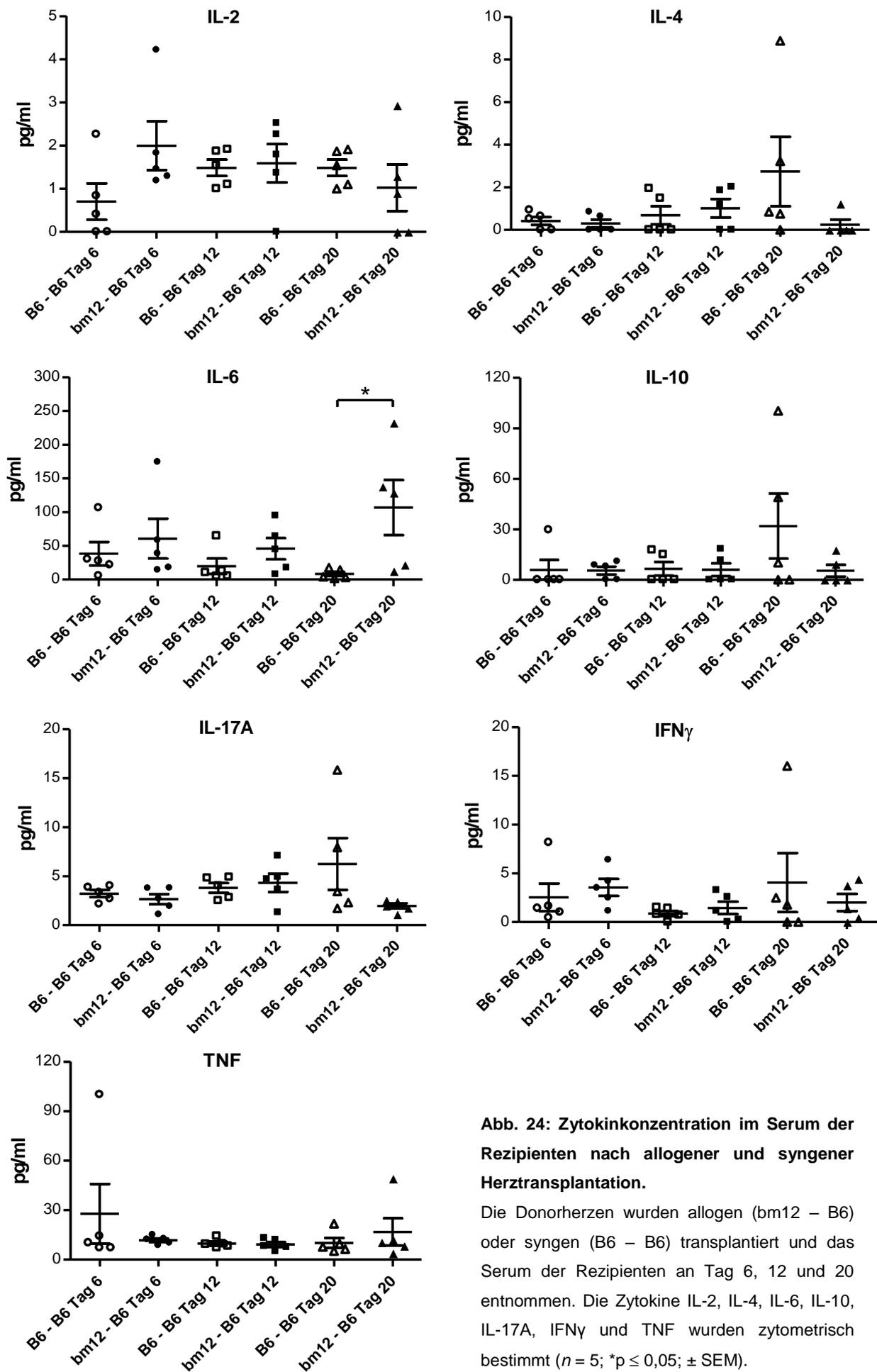


Abb. 24: Zytokinkonzentration im Serum der Rezipienten nach allogener und syngener Herztransplantation.

Die Donorherzen wurden allogene (bm12 – B6) oder syngene (B6 – B6) transplantiert und das Serum der Rezipienten an Tag 6, 12 und 20 entnommen. Die Zytokine IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, IL-17A, IFN γ und TNF wurden zytometrisch bestimmt ($n = 5$; $*p \leq 0,05$; \pm SEM).

Für eine Analyse der histologisch dargestellten Zellinfiltrate in den Donorherzen, wurde eine zytometrische Determinierung der Leukozyten-Subpopulationen vorgenommen. Dazu wurden syngene und allogene Donorherzen an Tag 12 und 20 entnommen, leukozytäre Zellen isoliert und für eine zytometrische Analyse aufgearbeitet. Grundsätzlich ist anzumerken, dass eine signifikant erhöhte Anzahl der CD45⁺ Zellen im Allograft festgestellt werden konnte (s. Abb. 25).

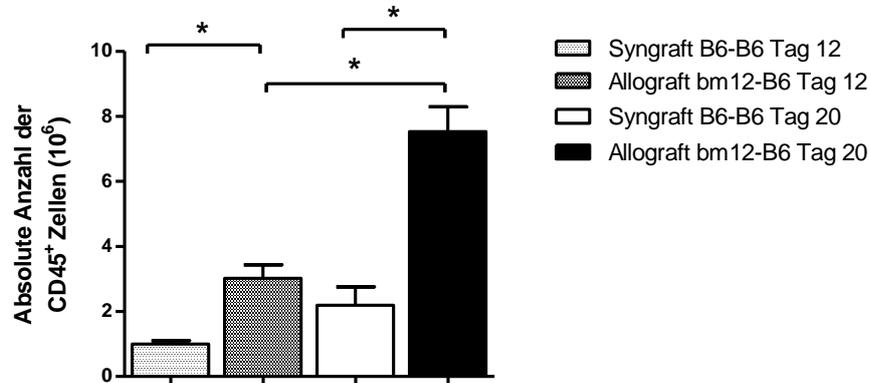


Abb. 25: Absolute Anzahl der CD45⁺ Zellen an Tag 12 und 20 nach reduzierter Perfusion.

Zellen wurden an Tag 12 und 20 *post transplantationem* aus den Allografts und Syngrafts isoliert und gezählt. Anschließend wurde im FACS die prozentuelle Anzahl der CD45⁺ Zellen ermittelt und auf die absolute Zellzahl bezogen ($n = 5, \pm \text{SEM}; *p \leq 0,05$).

Die Verteilung von APC im Verlauf der chronischen Abstoßungsreaktion zeigte einen deutlichen Anstieg der CD45⁺ CD11b⁺ F4/80⁺ Zellen, im Vergleich zur syngenen Kontrolle (B6-B6). Die gesteigerte Alloreaktivität im bm12-B6 Transplantationsmodell konnte zusätzlich durch die erhöhte absolute Leukozytenzellzahl verdeutlicht werden (s. Abb. 26).

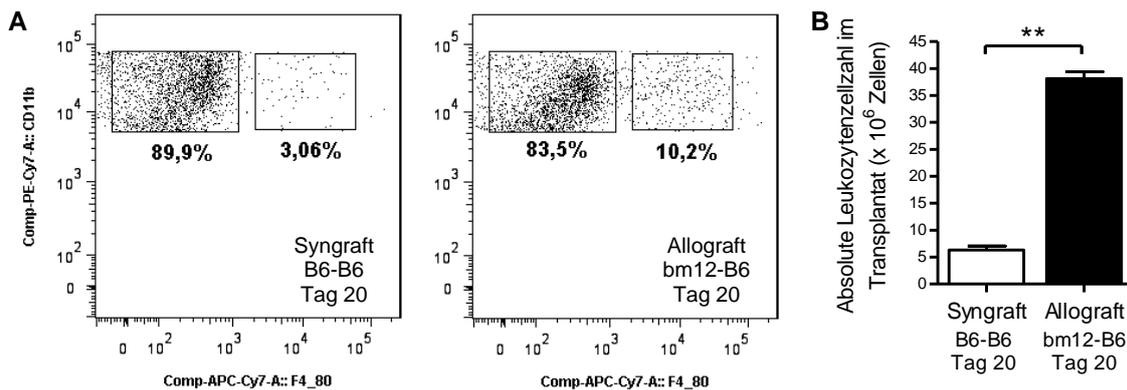


Abb. 26: Zytometrische Analyse der CD45⁺ CD11b⁺ F4/80⁺ Zellen nach Organtransplantation an Tag 20.

(A) Die Dot-Plot's zeigen den Anstieg der CD45⁺ CD11b⁺ F4/80⁺ Zellen im Allograft (bm12-B6), im Vergleich zum Syngraft (B6-B6) an Tag 20. Dargestellt sind repräsentative Plot's für drei unabhängig durchgeführte Experimente (primäres Gate auf CD45⁺ CD11b⁺ Zellen). (B) Absolute Leukozytenzellzahl im Syngraft und Allograft an Tag 20 ($n = 3; \pm \text{SEM}; **p < 0,001$).

Weitere zytometrische Analysen der Leukozyten-Subpopulationen ergaben, dass sich die Anzahl der CD3⁺ Lymphozyten im Allograft an Tag 20 erhöht zeigte. Wird aber die relative

Verteilung der einzelnen Leukozytengruppen im Transplantat genauer betrachtet, findet sich kein Unterschied in der Verteilung der CD4⁺ und CD8⁺ T Lymphozytenpopulation (s. Abb. 27).

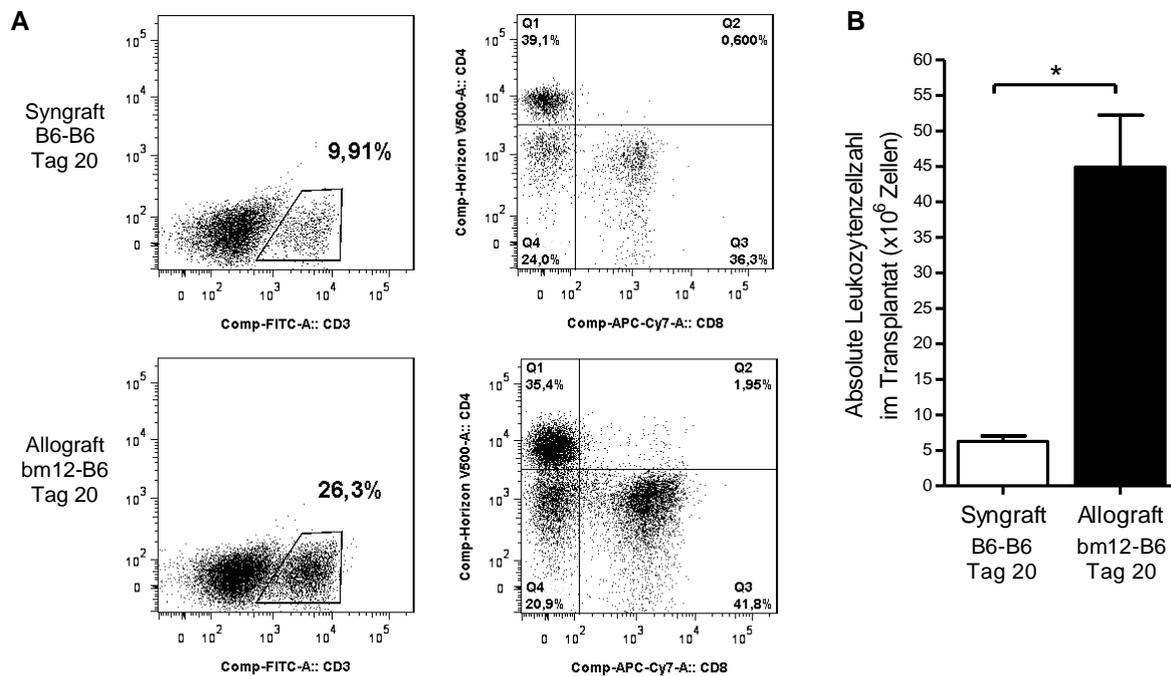


Abb. 27: FACS Analyse der Leukozytensubpopulation in der syngen und allogenen Herztransplantation.

(A) Infiltrierende Zellen wurden aus dem Transplantat isoliert und mittels Durchflusszytometrie untersucht. Die Zellen wurden primär auf CD45 gated und anschließend für CD3 analysiert (linke Spalte). Für die genaue Spezifikation der CD3⁺ Zellen, wurden CD4⁺ und CD8⁺ T Zellen untersucht (rechte Spalte). Die FACS Analyse repräsentiert ein Experiment von 5 unabhängig durchgeführten Versuchen. (B) Absolute Leukozytenzellzahl im Syngraft und Allograft an Tag 20 ($n = 3$; \pm SEM; $*p \leq 0,05$).

Im Vergleich zu den zytometrischen Analysen zeigte die Untersuchung der Immunhistologie infiltrierender CD4⁺ und CD8⁺ Zellen durch eine Analyse der absoluten Zellzahl einen deutlichen Anstieg der CD4⁺ und CD8⁺ T Lymphozyten im Transplantat nach allogener Organverpflanzung an Tag 20 (s. Abb. 28-30).

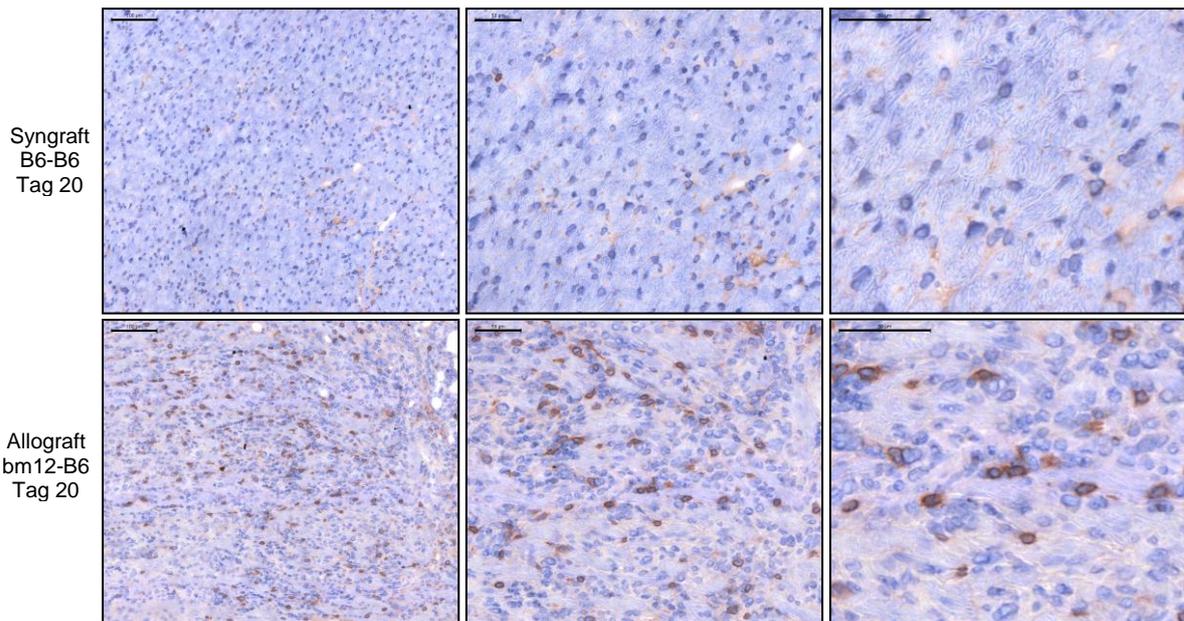


Abb. 28: CD4 Immunhistologie von Herzen nach syngener und allogener Transplantation.

Infiltrierende $CD4^+$ Zellen in exemplarisch dargestellten Gewebeschnitten nach Herztransplantation von B6 und bm12 Spenderherzen an Tag 20 ($n = 5$; Messbalken: linke Spalte, 100 μm ; mittlere und rechte Spalte, 50 μm).

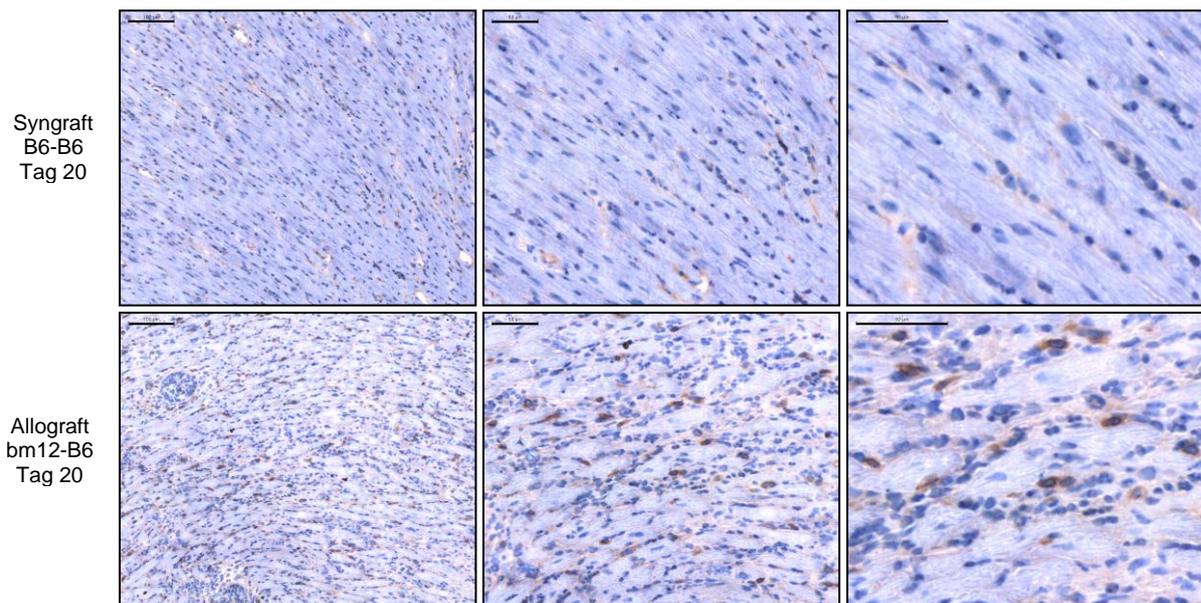


Abb. 29: Immunhistologie von $CD8^+$ Zellinfiltraten nach syngener und allogener Transplantation der Herzen.

$CD8^+$ Zellen wurden in Gewebeschnitten nach Entnahme der Donorherzen an Tag 20 *post transplantationem* histologisch angefärbt. Die repräsentativen Färbungen zeigen jeweils ein Beispiel für ein Syngraft und ein Allograft bei $n = 5$ Tieren (Messbalken: linke Spalte, 100 μm ; mittlere und rechte Spalte, 50 μm).

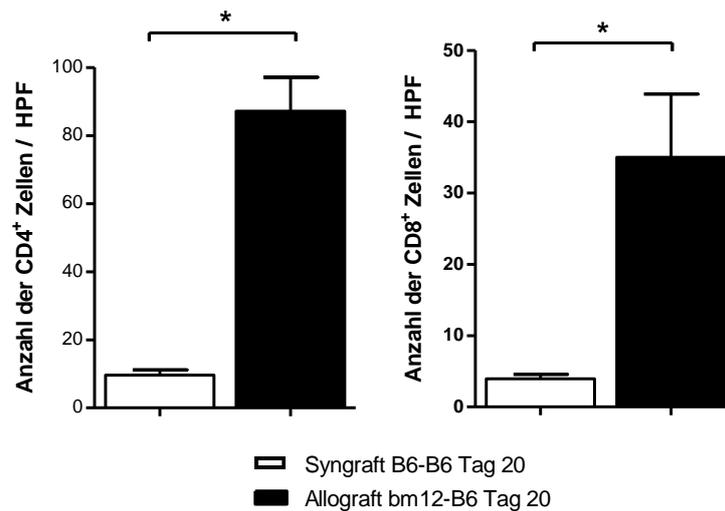


Abb. 30: Quantitative Auswertung der CD4⁺ und CD8⁺ Zellen nach syngener und allogener Transplantation der Herzen.

Gewebeschnitte wurden mit einem α CD4 und α CD8 Antikörper gefärbt und die CD4⁺ und CD8⁺ Zellen pro Gesichtsfeld (HPF) gezählt. In der chronischen Abstoßungsreaktion war eine erhöhte Anzahl an CD4⁺ und CD8⁺ Zellen detektierbar, im Vergleich zur syngenen Kontrollgruppe ($n = 5$, \pm SEM; $*p \leq 0,05$).

Um die Aktivierung des adaptiven Immunsystems in dem Tiermodell für die chronische Abstoßungsreaktion genauer darzulegen, wurde die Zytokinproduktion CD4⁺ T Zellen aus dem Transplantat untersucht (s. Abb. 31). Die Erhöhung von IL-17A und IFN γ konnte im allogenen Transplantationssetting festgestellt werden, was ein deutlicher Hinweis auf eine erhöhte Alloreaktivität und die Aktivität der CD4⁺ T Lymphozyten im abgestoßenen Organ war.

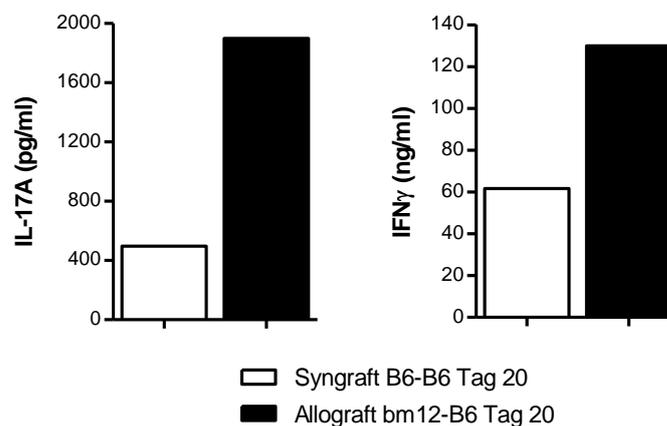


Abb. 31: Darstellung der erhöhten Expression von IL-17A und IFN γ der infiltrierenden CD4⁺ Zellen nach Organtransplantation.

Die Expression der Zytokine IL-17A und IFN γ von CD4⁺ T Zellen zeigt einen deutlichen Anstieg an Tag 20 nach Organtransplantation. Für die Auswertung wurden CD4⁺ Zellen aus 5 allogenen und syngenen transplantierten Donorherzen isoliert und gepoolt. CD4⁺ Zellen wurden für 48 h mit einem α CD3 und α CD28 Antikörper inkubiert und der Überstand mittels ELISA gemessen. Diese Auswertung ist ein repräsentatives Beispiel für drei unabhängig durchgeführte Experimente.

Das Ki67 Protein ist ein Proteinase-sensibles Zellprotein, das für die Aufrechterhaltung des Zellzyklus erforderlich ist. Es wird in allen Phasen der Mitose (S-, G1-, G2- und M-Phase) exprimiert und ist in der G0-Phase (Ruhephase) nicht nachweisbar. Der Ki67 Labeling Index gibt den Prozentanteil der Ki67⁺ Zellen im Vergleich zur Gesamtzellzahl der CD4⁺ T Lymphozyten an. Die Aktivität CD4⁺ T Zellen zeigte sich auch in ihrem Proliferationsverhalten im Verlauf einer chronischen Abstoßungsreaktion. So konnte ein signifikanter Anstieg der Proliferationsrate bei den infiltrierenden CD4⁺ Lymphozyten im Allograft detektiert werden (s. Abb. 32).

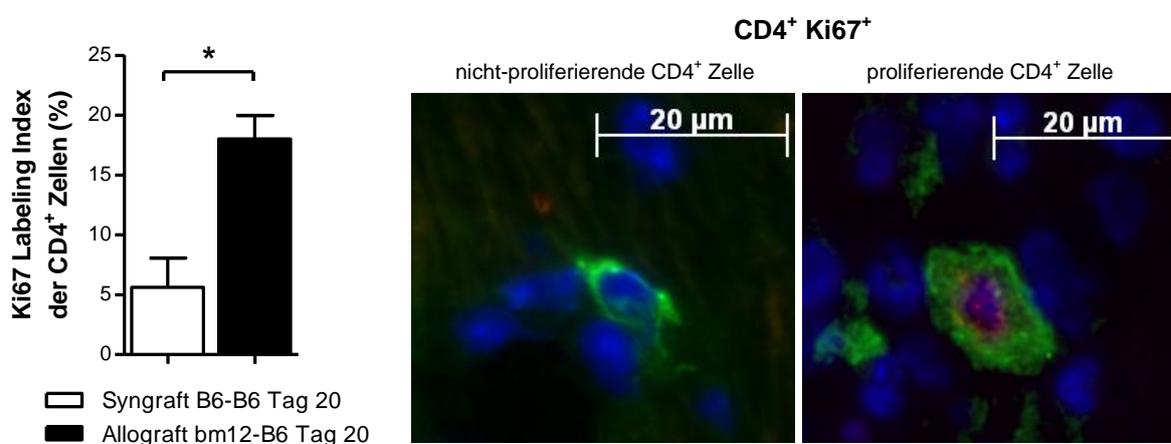


Abb. 32: Proliferationsverhalten der CD4⁺ Ki67⁺ Zellen im Syngraft und Allograft an Tag 20.

Die Darstellung des Ki67 Labeling Index an Tag 20 nach Organverpflanzung zeigte einen signifikanten Anstieg des Proliferationsverhaltens im Allograft ($n = 3$, \pm SEM; $*p \leq 0,05$). Gewebeschnitte der transplantierten Herzen an Tag 20 wurden mit einem α CD4 (grün) und α Ki67 (rot) Antikörper gefärbt. Die Kern-Gegenfärbung wurde mit Hoechst (blau) durchgeführt. Die repräsentativen Bilder zeigen ein Beispiel für nicht-prolierende und prolierende CD4⁺ Zellen (Messbalken: 20 μ m).

3.2. *Myd88 in der chronischen Transplantatabstoßung*

Myd88 ist ein wichtiges Adaptermolekül für den TLR Signalweg und ist auch bei der Interaktion mit dem IL-1 und IL-18 Rezeptor beteiligt (37, 69). Bisher konnte belegt werden, dass Myd88 in der akuten und chronischen Transplantationsabstoßung eine Rolle spielt (39, 40, 70). Hingegen, in der chronischen Abstoßungsreaktion nach Herztransplantation wurde Myd88 bisher noch unzureichend untersucht. Im Rahmen dieser Studie konnte bei Myd88 defizienten Empfängertieren ein verlängertes Überleben der allogenen Transplantate detektiert werden (s. Abb. 33). Histologisch zeigte sich in den transplantierten Herzen von Myd88^{-/-} Empfängertieren an Tag 50 nur eine geringe Infiltration von Zellen, im Vergleich zu einer Transplantation in B6 Empfängertieren (s. Abb. 34).

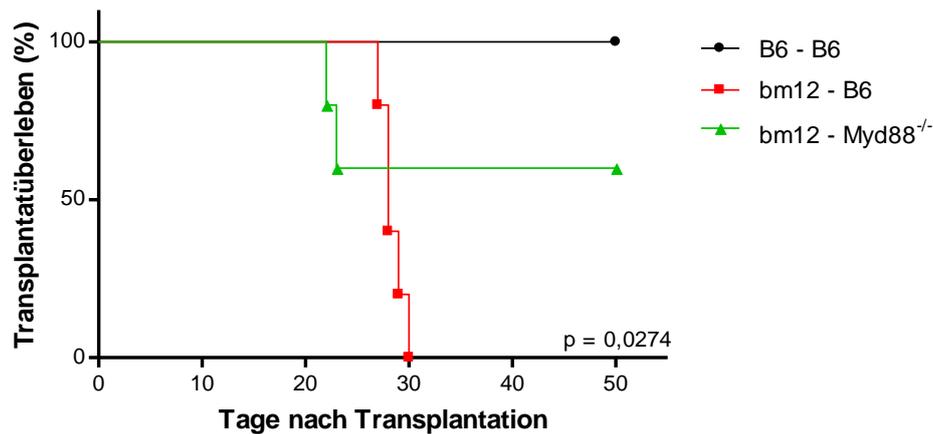


Abb. 33: Transplantatfunktion nach syngener und allogener Herztransplantation in B6 oder Myd88^{-/-} Empfängertiere.

Bei syngener Transplantation wurde das Isograft dauerhaft akzeptiert (-●-; $n = 5$). Empfängerherzen nach allogener Transplantation zeigten ein MST von 28 Tagen (-■-; $n = 5$). Bm12 Donorherzen, die in Myd88^{-/-} Empfänger transplantiert wurden überlebten mit einer geschwächten Schlagintensität über 50 Tage (-▲-; $n = 5$). Die graphische Darstellung der Überlebensdaten erfolgte mit einem Kaplan Meier Plot.

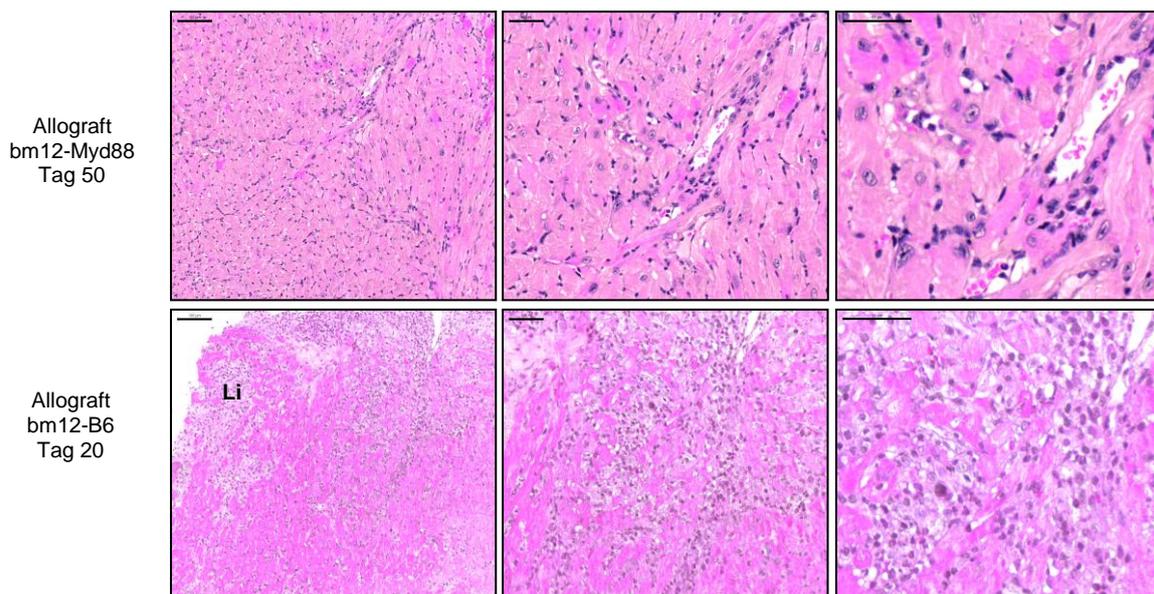


Abb. 34: Repräsentative Histologie von allogenen Donorherzen nach Transplantation in B6 oder Myd88^{-/-} Empfängertiere.

Die histologischen Charakteristika der chronischen Allotransplantation, wie zelluläre Infiltration von Leukozyten, Proliferation der Gefäßzellen und luminaler Gefäßverschluss zeigen sich in der allogenen Kontrolle an Tag 20, nicht aber bei Myd88 defizienten Empfängertieren (Li = Perivaskuläre Leukozyteninfiltration; $n = 3$; Messbalken: linke Spalte, 100 μm ; mittlere und rechte Spalte, 50 μm).

Dieses initiale Experiment lässt darauf schließen, dass das angeborene Immunsystem eine wesentliche Rolle in der chronischen Abstoßungsreaktion spielt und unterstreicht die Notwendigkeit einer weiteren Untersuchung dieser frühen Immunantwort auf dem Gebiet der soliden Organtransplantation. Da Myd88 in vielen funktionell immunologischen und homöostatischen Prozessen eine wichtige Rolle spielt (38, 70, 71), ist es in der humanen

Transplantationsmedizin weitgehend unmöglich eine Inhibition von Myd88 in Betracht zu ziehen. Dies würde viele Nebenwirkungen für den Patienten mit sich ziehen und ist somit als Therapie bei einer Organtransplantation ungeeignet.

3.3. **Determinierung des Ko-Rezeptors TREM-1 im Verlauf einer Transplantatabstoßung**

3.3.1 *TREM-1 in der humanen Organtransplantation*

Eine wichtige pro-inflammatorische und ko-stimulatorische Funktion im PRR Signalweg wird durch TREM-1 eingenommen. Zahlreiche humane Studien zeigten die Signifikanz von TREM-1 in akuten und chronischen Krankheitsbildern (72, 73). Um die Relevanz von TREM-1 im Verlauf einer chronischen Abstoßungsreaktion beim Menschen untersuchen zu können, wurden Biopsien von Patienten mit einer chronischen Abstoßungsreaktion verwendet und die Infiltration von TREM-1⁺ Zellen im Transplantat detektiert. Als Kontrolle dienten Biopsien von Patienten ohne Abstoßungsreaktion (s. Abb. 35-37). Es zeigte sich eine Anreicherung TREM-1⁺ Zellen im Verlauf einer chronischen Abstoßungsreaktion nach Herz- und Nierentransplantation im Vergleich zu Patienten, die keine Abstoßung des Spenderorgans aufwiesen.

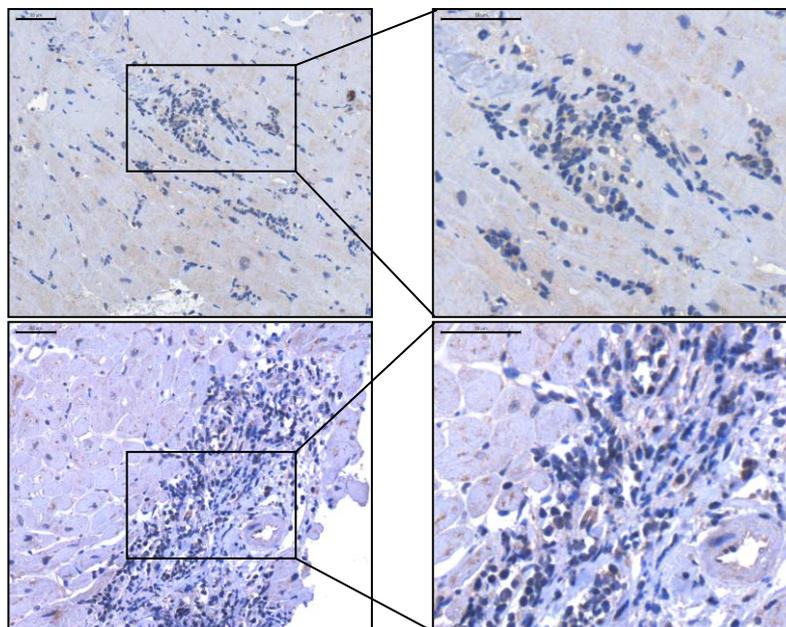


Abb. 35: TREM-1⁺ Zellen in Gewebe von Patienten nach Herztransplantation.

Detektion von TREM-1⁺ Zellen in Biopsien des transplantierten Donorherzen eines 46 Jahre alten Patienten mit Ausbildung einer Transplantatvaskulopathie (Vergrößerte Darstellung der Ausschnitte in der rechten Spalte; Messbalken: linke Spalte, 100 µm; rechte Spalte, 50 µm).

Abb. 36: Biopsien von Patienten nach Herztransplantation ohne Abstoßungsreaktion.

Repräsentative Ausschnitte von vorhandenen Biopsien männlicher Patienten zwei Jahre nach Organverpflanzung. Es zeigten sich keine Abstoßungscharakteristika und keine Infiltration von TREM-1⁺ Zellen. Vergrößerte Darstellung der Ausschnitte in der rechten Spalte. Messbalken: linke Spalte, 100 µm; rechte Spalte, 50 µm.

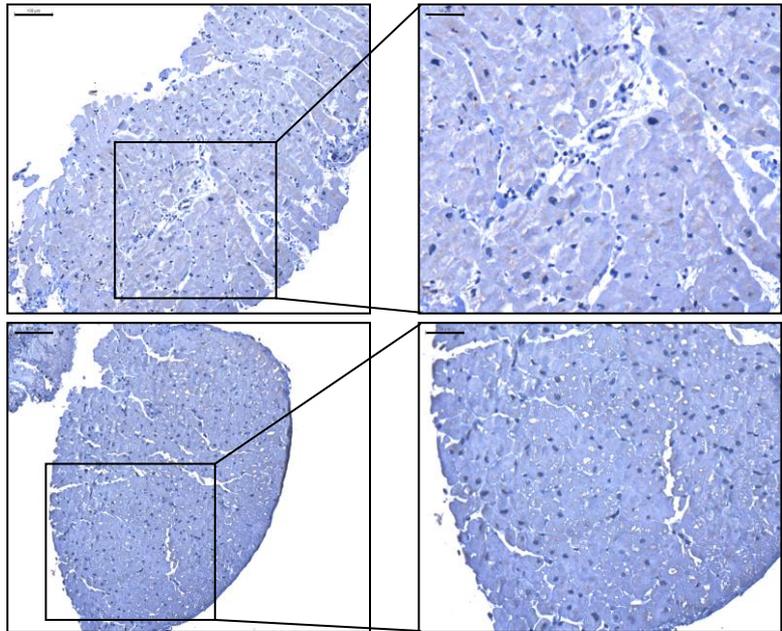
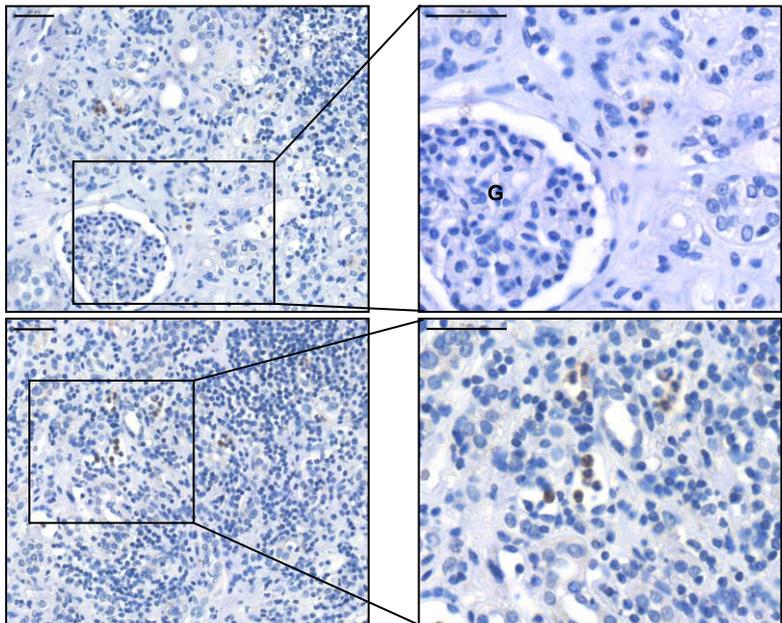


Abb. 37: TREM-1⁺ Zellen in Gewebe von Patienten nach Nierentransplantation.

Detektion von TREM-1⁺ Zellen in Biopsien einer 76 Jahre alten Patientin nach Nierentransplantation (G = Glomerulus). Vergrößerte Darstellung der Ausschnitte in der rechten Spalte. Messbalken: linke Spalte, 100 µm; rechte Spalte, 50 µm.



3.3.2 *TREM-1⁺ APC in der murinen chronischen Transplantatabstoßung*

Die bisherigen Daten zeigten TREM-1⁺ Zellen in der humanen chronischen Abstoßungsreaktion. Zur Darlegung der Expression im zeitlichen Verlauf und der Funktion von TREM-1 bei einer chronischen Abstoßungsreaktion wurden weitere Untersuchungen in einem murinen Transplantationsmodell durchgeführt. Dafür wurden an Tag 6, 12 und 20 TREM-1⁺ Zellen histologisch im Transplantat analysiert. Über den zeitlichen Verlauf der chronischen Abstoßungsreaktion konnte ein progredienter Anstieg der TREM-1⁺ Zellen detektiert werden (s. Abb. 38 und 39).

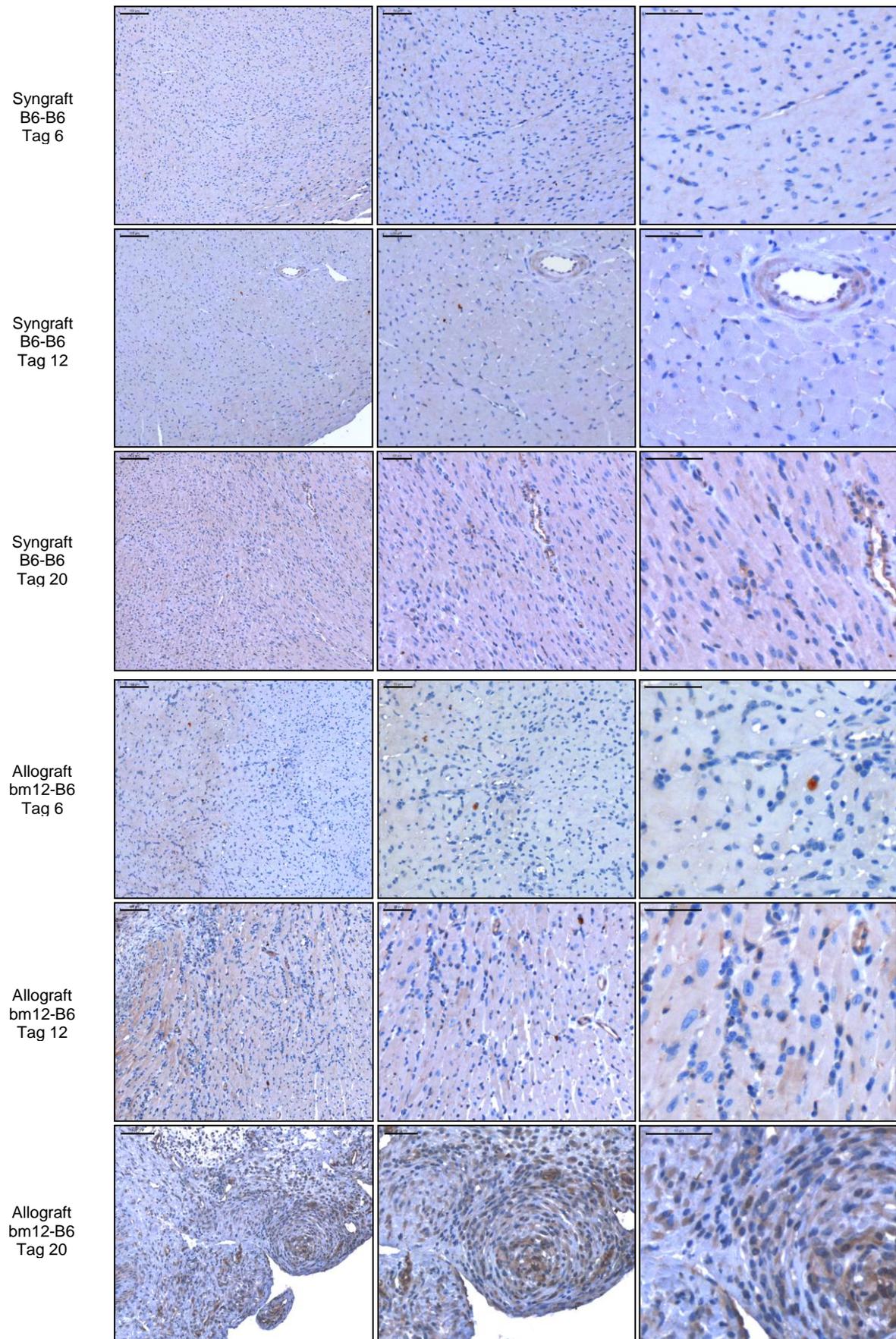


Abb. 38: Progrediente Infiltration von TREM-1⁺ Zellen nach syngener und allogener Herztransplantation.

Gezeigt werden TREM-1⁺ Färbungen von repräsentativen Gewebeschnitten ($n = 5$) einer syngenen (B6-B6) und allogenen (bm12-B6) Herztransplantation an Tag 6, 12 und 20 (Messbalken: linke Spalte, 100 μm ; mittlere und rechte Spalte, 50 μm).

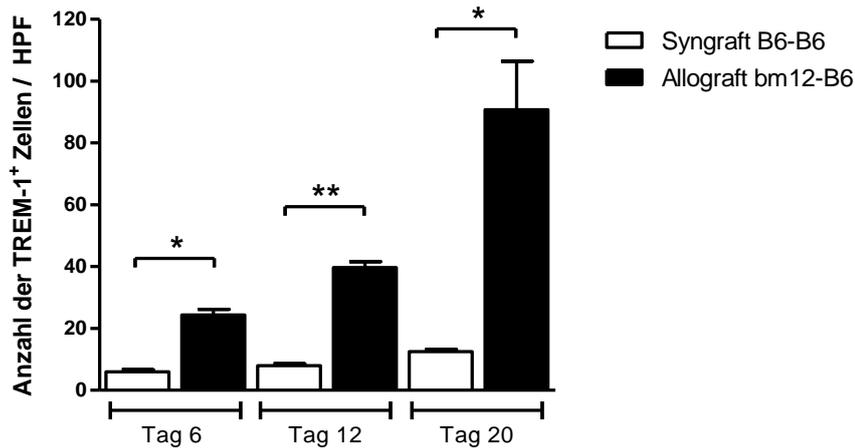


Abb. 39: Anzahl der TREM-1⁺ Zellen im Verlauf einer murinen syngen und allogenen Abstoßungsreaktion transplanteder Herzen.

Nach Färbung der Gewebeschnitte wurden die TREM-1⁺ Zellen pro Gesichtsfeld (HPF) gezählt und zeigten, im Vergleich zu der syngen Kontrollgruppe (B6-B6), einen signifikanten Anstieg an Tag 6, 12 und 20 im Allograft (bm12-B6). Außerdem konnte ein progredienter Anstieg der TREM-1⁺ Zellen während der allogenen Abstoßungsreaktion festgestellt werden ($n = 5$, \pm SEM; * $p \leq 0,05$; ** $p < 0,001$).

Da der Ko-Rezeptor TREM-1 bisher u.a. auf Monozyten / Makrophagen nachgewiesen (41, 42). Die Untersuchungen zur Charakterisierung TREM-1⁺ Zellen im Rahmen dieser Dissertation zeigten, dass TREM-1 von der Subpopulation der CD11b⁺ MHC-II⁺ Zellen exprimiert wurde und in allogenen Transplantaten an Tag 12 und 20 erhöht detektiert werden konnte (s. Abb. 40-43). Im Blut der Empfängertiere wurde TREM-1 auf CD11b⁺ MHC-II⁺ Zellen nach allogener Transplantation erhöht nachgewiesen, was eine mögliche Migration dieser TREM-1⁺ APC vom Blut in das Allograft andeutete (s. Abb. 44).

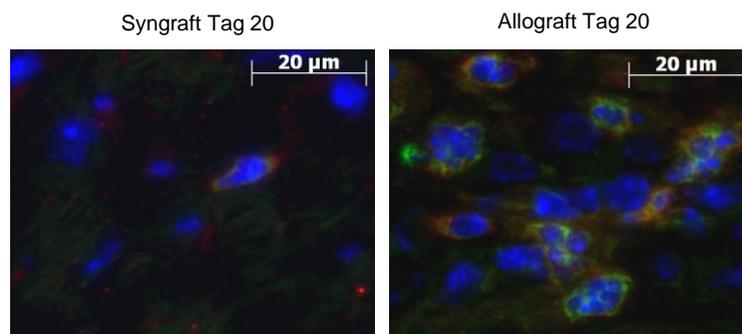


Abb. 40: Darstellung der CD11b⁺ TREM-1⁺ Zellen im Syngraft und Allograft an Tag 20.

Gewebeschnitte von syngen und allogenen Transplantaten an Tag 20 wurden mit einem α TREM-1 (rot) und α CD11b (grün) Antikörper gefärbt. Die Kern-Gegenfärbung wurde mit Hoechst (blau) durchgeführt. Im Allograft konnte eine vermehrte Anzahl an TREM-1⁺ CD11b⁺ Zellen nachgewiesen werden. Die repräsentativen Bilder zeigen Ausschnitte von 5 verschiedenen syngen und allogenen Herzen (Messbalken: 20 μ m).

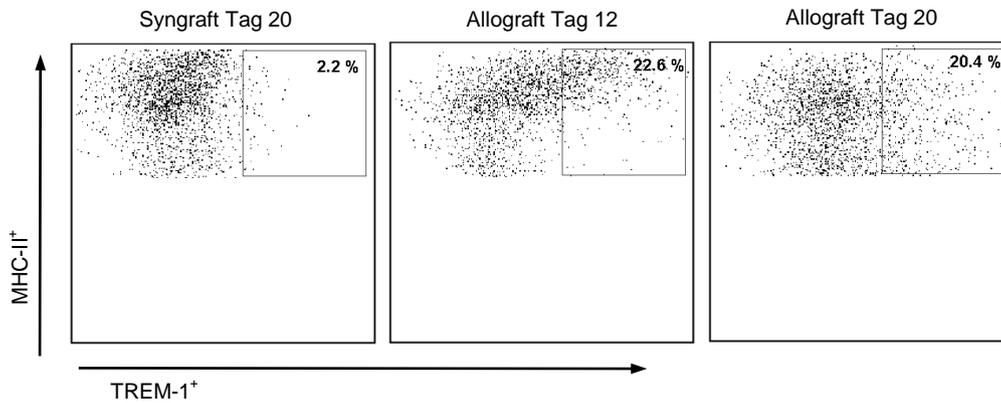


Abb. 41: Erhöhte Infiltration von TREM-1⁺ CD11b⁺ MHC-II⁺ Zellen im Allograft einer chronischen Transplantatabstoßung.

Repräsentative Darstellung einer FACS Analyse von TREM-1⁺ CD11b⁺ MHC-II⁺ Zellen im Syngraft (B6-B6) an Tag 20 und Allograft (bm12-B6) an Tag 12 und 20. Zellen wurden primär auf CD11b gated (*n* = 5).

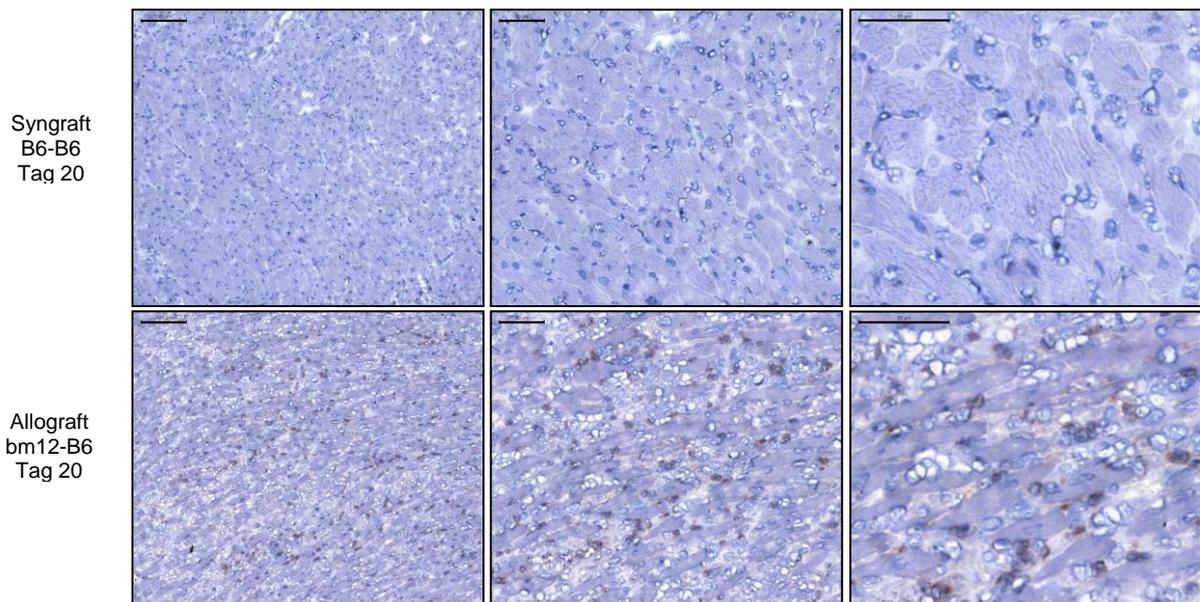


Abb. 42: Infiltration von CD11b⁺ Zellen in syngene und allogene Herztransplantate an Tag 20.

Gezeigt werden TREM-1⁺ Färbungen von repräsentativen Gewebeschnitten (*n* = 5) einer syngenen (B6-B6) und allogenen (bm12-B6) chronischen Transplantatabstoßung an Tag 20 (Messbalken: linke Spalte, 100 µm; mittlere und rechte Spalte, 50 µm).

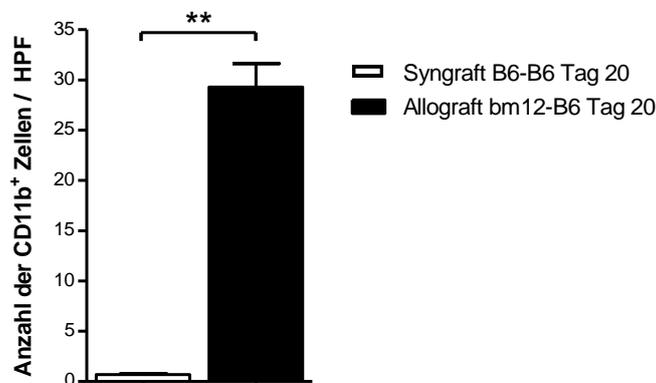


Abb. 43: Quantitative Auswertung der CD11b⁺ Zellinfiltrate *post transplantationem*.

Durch die Auszählung der CD11b⁺ Zellen pro Gesichtsfeld (HPF) an Tag 20, konnte eine signifikante Erhöhung der CD11b⁺ Zellen im Allograft (bm12-B6) detektiert werden, im Vergleich zur syngenen Kontrolle (*n* = 5, ± SEM; ***p* < 0,001).

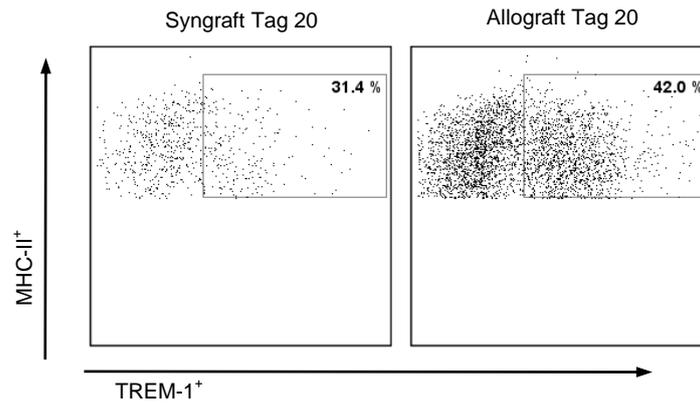


Abb. 44: Zytometrische Detektion von TREM-1⁺ CD11b⁺ MHC-II⁺ Zellen im Blut der Rezipienten an Tag 20 nach Organtransplantation.

Die repräsentativen FACS Plot's zeigen eine erhöhte Anzahl an TREM-1⁺ CD11b⁺ MHC-II⁺ Zellen im Blut allogener Empfängertiere an Tag 20, im Vergleich zur syngenon Kontrolle. Zellen wurden primär auf CD11b gegatet ($n = 3$).

3.4. Inhibierung von TREM-1 im Verlauf der Organabstoßung

3.4.1 Verminderung der chronischen Abstoßungsreaktion bei Blockade von TREM-1

Eine Blockade von TREM-1 und die damit verbundene Reduktion der Effekte des angeborenen Immunsystems in der chronischen Transplantatabstoßung sollte als nächstes im Rahmen dieser Dissertation analysiert werden. Eine Inhibition von TREM-1 kann durch ein synthetisches Peptid (LP17), das der konservierten Struktur der Ektodomäne von TREM-1 bei Maus und Mensch entspricht, erreicht werden (74). Dazu wurde den Empfängertieren ab Tag 3 *post transplantationem* täglich LP17 *i.p.* verabreicht. Es zeigte sich ein Überleben der allogenen Herztransplantate von über 50 Tagen. Rezipienten, die mit dem Kontrollpeptid behandelt wurden, wiesen ein MST von 28 Tagen auf. Syngene Herzen veränderten sich nicht in ihrer Schlagintensität während einer Behandlung mit LP17 (s. Abb. 45).

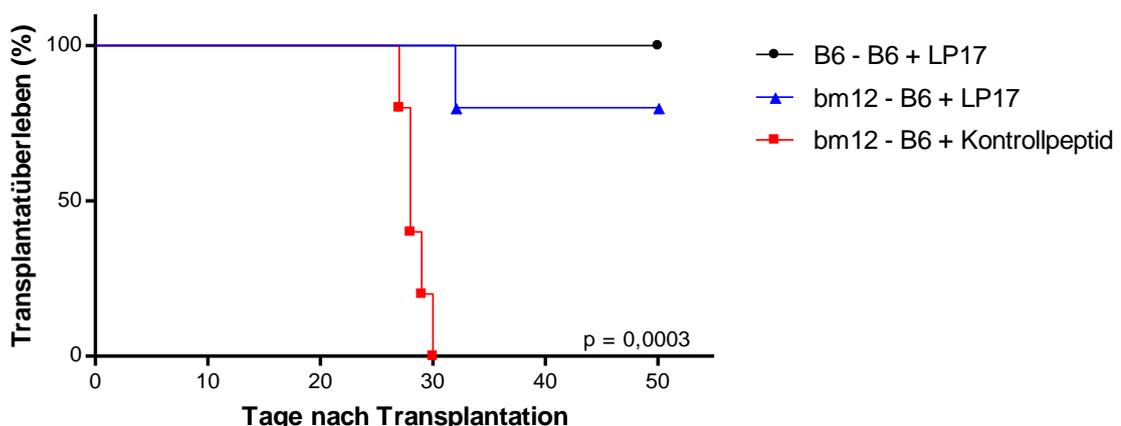


Abb. 45: Darstellung der Transplantatfunktion bei Inhibierung von TREM-1.

Transplantatfunktion nach Blockade von TREM-1 mit dem Antagonisten LP17 zeigte ein deutlich verlängertes Überleben der Transplantate auf über 50 Tage (-▲-; bm12-B6 + LP17). Bei einer Behandlung der Rezipienten mit dem Kontrollpeptid wurden die Herzen mit einer MST von 28 Tage (-■-; bm12-B6 + Kontrollpeptid) abgestoßen. In der syngenon Kontrollgruppe wurde das Transplantat dauerhaft akzeptiert (-●-; B6-B6 + LP17). Überlebensdaten werden als Kaplan-Meier Plot dargestellt (n pro Versuchsgruppe = 5).

Für eine histologische Aufarbeitung wurden die Herzen an Tag 20 *post transplantationem* entnommen und Gewebeschnitte angefertigt. Neben einer zellulären Infiltration zeigte sich auch ein parenchymaler und ein vaskulärer Schaden des Organs sowie ein luminaler Verschluss der Gefäße im Transplantat nach allogener Abstoßungsreaktion (bm12-B6 + Kontrollpeptid). Eine Blockade von TREM-1 führte hingegen zu einer verminderten Ausprägung der Abstoßungscharakteristika, was in weiterer Folge das Überleben der Transplantate verlängerte (s. Abb. 46 und 47).

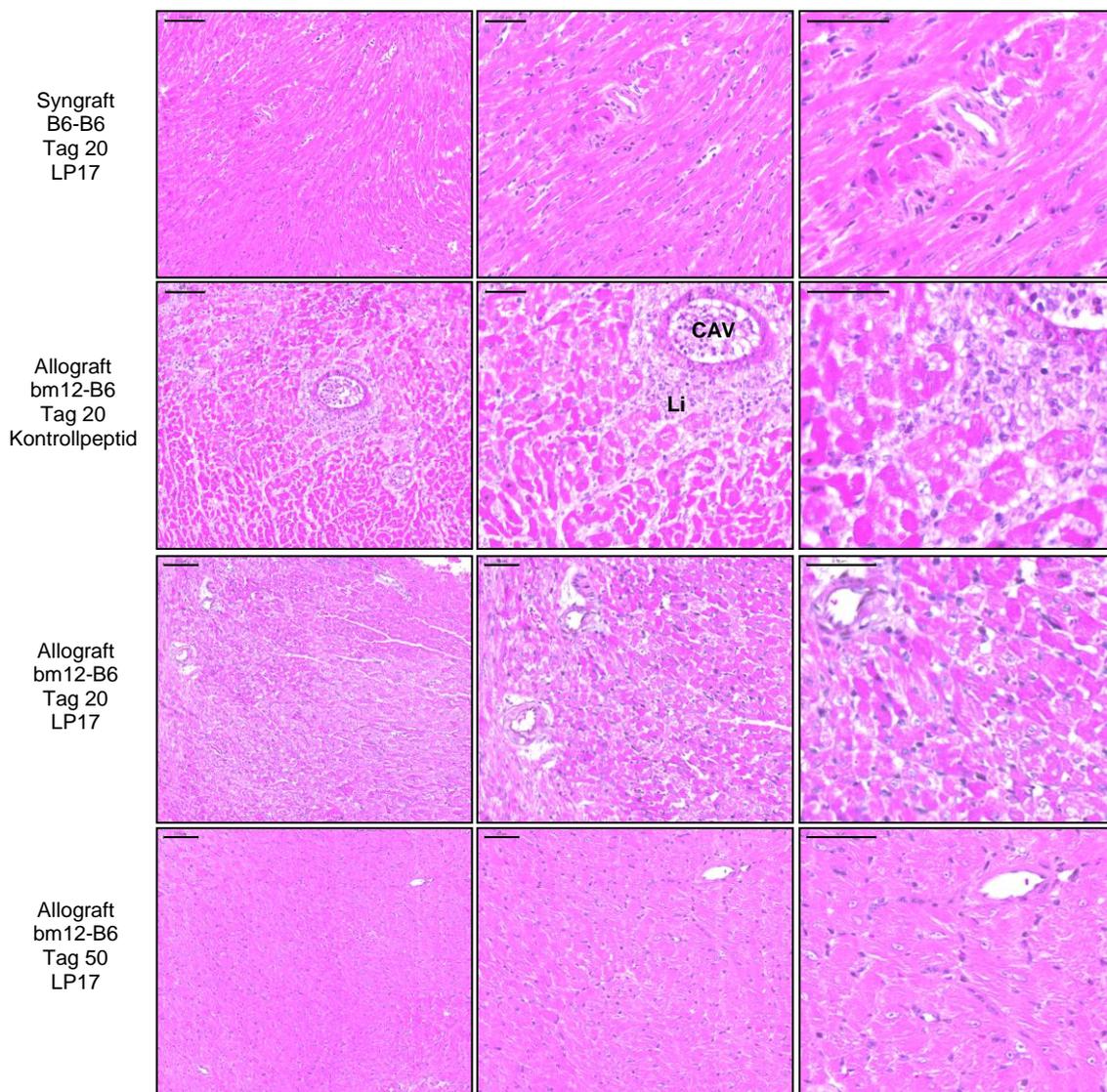


Abb. 46: Histologie der Donorherzen bei Inhibierung von TREM-1.

Durch eine Blockierung von TREM-1 konnten die chronischen Abstoßungscharakteristika minimiert werden. Die gefärbten Myokardschnitte repräsentieren ein Transplantat aus einer Gruppe von $n = 5$ Tieren (Li = Perivaskuläre Leukozyteninfiltration, CAV = Transplantatvaskulopathie; Messbalken: linke Spalte, 100 μm ; mittlere und rechte Spalte, 50 μm).

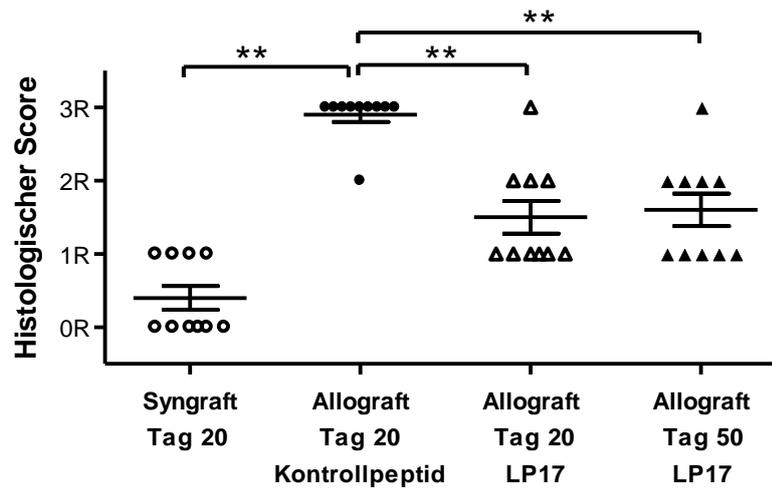


Abb. 47: Histologisches Scoring syngener und allogener Transplantate im Verlauf einer chronischen Abstoßungsreaktion und einer Blockade von TREM-1.

Durch eine Blockierung von TREM-1 konnte eine signifikante Verminderung des histologischen Scorings der allogenen Transplantate an Tag 20 und Tag 50 *post transplantationem* beobachtet werden ($n = 10$, \pm SEM; $**p < 0,001$).

Neben einem verbesserten Kontraktionsverhalten zeigte die Inhibierung von TREM-1 im Verlauf der chronischen Abstoßungsreaktion weniger Organfibrose und eine verringerte Expression von *collagen type I* (s. Abb. 48 und 49).

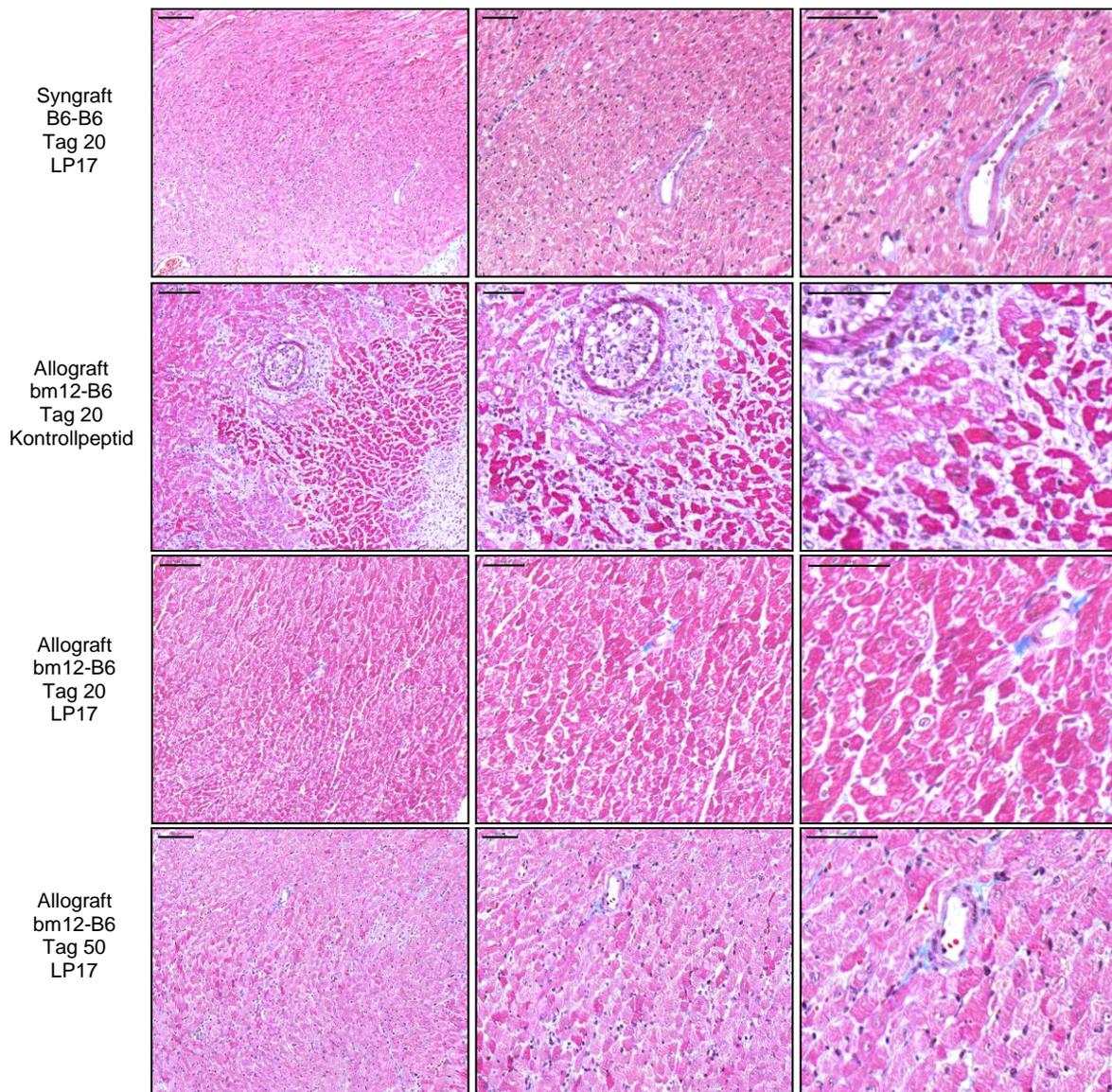


Abb. 48: Ausprägung der Organfibrose im Verlauf einer TREM-1 Inhibition.

Die fibrotischen Kollagenfasern (blau) zeigen sich deutlich reduziert in Donorherzen bei einer Blockade von TREM-1 bis Tag 20 und Tag 50 *post transplantationem*, im Vergleich zu einer Behandlung der Rezipienten mit dem Kontrollpeptid. Die gefärbten Myokardschnitte repräsentierten ein Transplantat aus einer Gruppe von $n = 5$ Tieren. Messbalken: linke Spalte, 100 μm ; mittlere und rechte Spalte, 50 μm .

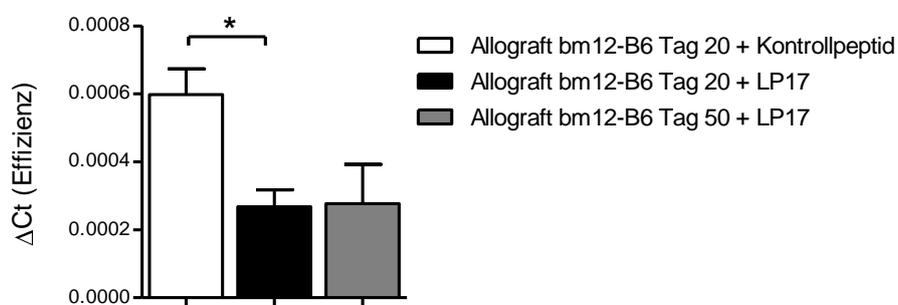


Abb. 49: Kollagenexpression bei Blockierung von TREM-1 in der chronischen Abstoßungsreaktion.

Eine Inhibierung von TREM-1 führte zu einer signifikant verminderten Expression von *collagen type I* an Tag 20 und Tag 50, im Vergleich zu einer Behandlung mit dem Kontrollpeptid ($n = 4$, \pm SEM; $*p \leq 0,05$).

Im nächsten Schritt wurde die histologisch dargestellte verringerte Infiltration von Zellen unter Behandlung der Rezipienten mit LP17 genauer untersucht. Es zeigte sich eine verringerte Infiltration von TREM-1⁺ Zellen im Allograft an Tag 20 und 50 (s. Abb. 50 und 51).

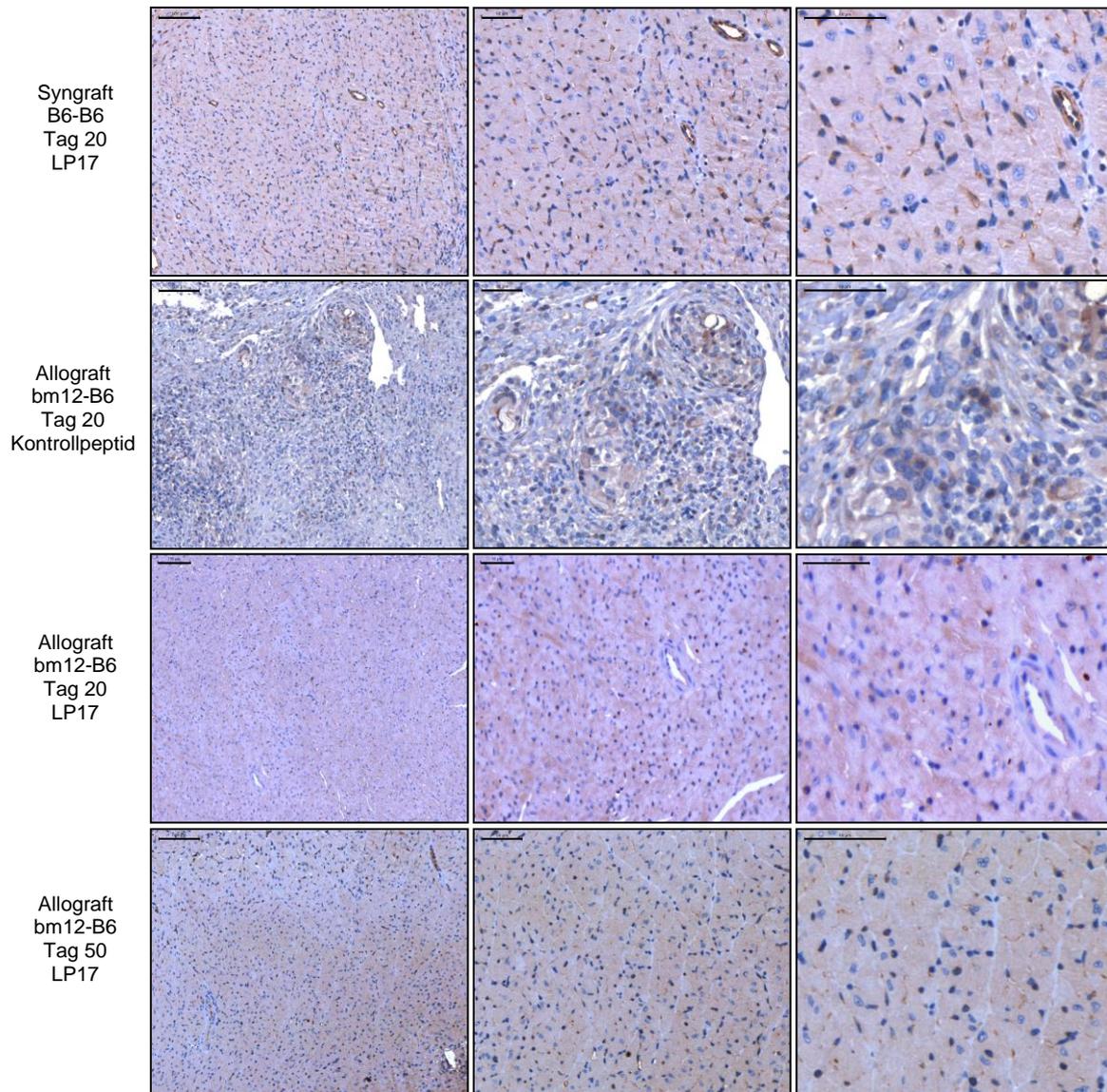


Abb. 50: Infiltration von TREM-1⁺ Zellen bei Behandlung der Rezipienten mit dem Kontrollpeptid oder LP17 im Verlauf der Abstoßungsreaktion.

Repräsentative Gewebeschnitte, gefärbt mit einem α TREM-1 Antikörper, zeigen eine reduzierte Infiltration von TREM-1⁺ Zellen während LP17 Behandlung, im Vergleich zum Kontrollpeptid ($n = 3$ bis 5 ; Messbalken: linke Spalte, Messbalken: linke Spalte, 100 μ m; mittlere und rechte Spalte, 50 μ m).

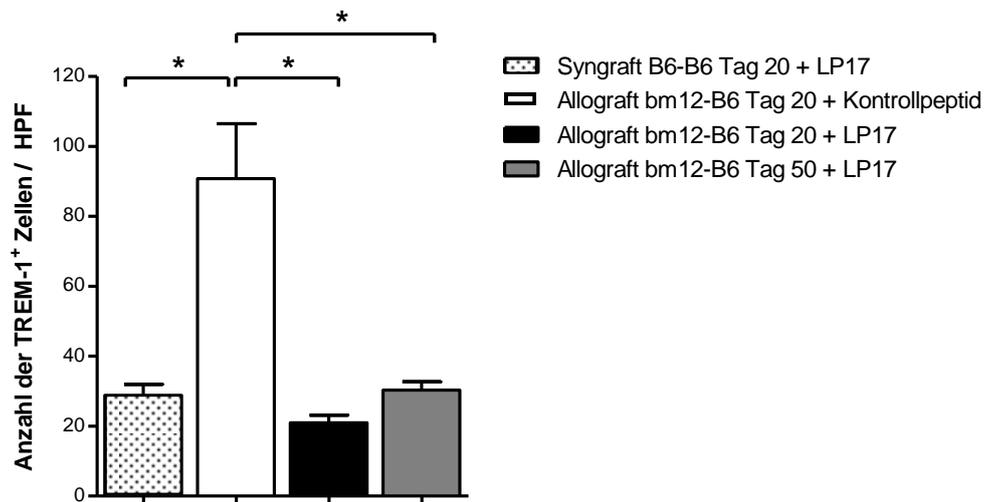


Abb. 51: Anzahl der TREM-1⁺ Zellen im Transplantat während einer Behandlung mit LP17 oder dem Kontrollpeptid an Tag 20 *post transplantationem*.

Gewebeschnitte wurden mit einem α TREM-1 Antikörper gefärbt und die TREM-1⁺ Zellen pro Gesichtsfeld (HPF) gezählt. Die Behandlung mit dem Antagonisten LP17 führte zu einer verringerten Infiltration von TREM-1⁺ Zellen in die Transplantate bei allogener Herztransplantation ($n = 3$ bis 5 , \pm SEM; $*p \leq 0,05$).

Die Blockierung von TREM-1 führte außerdem zu einer reduzierten Infiltration von CD11b⁺ Zellen an Tag 20 und 50 nach Organtransplantation. In der TREM-1⁺ CD11b⁺ Fluoreszenz-Doppelfärbung zeigte sich ebenfalls eine Verringerung der TREM-1⁺ APC unter der Behandlung mit dem Antagonisten LP17 (s. Abb. 52-54).

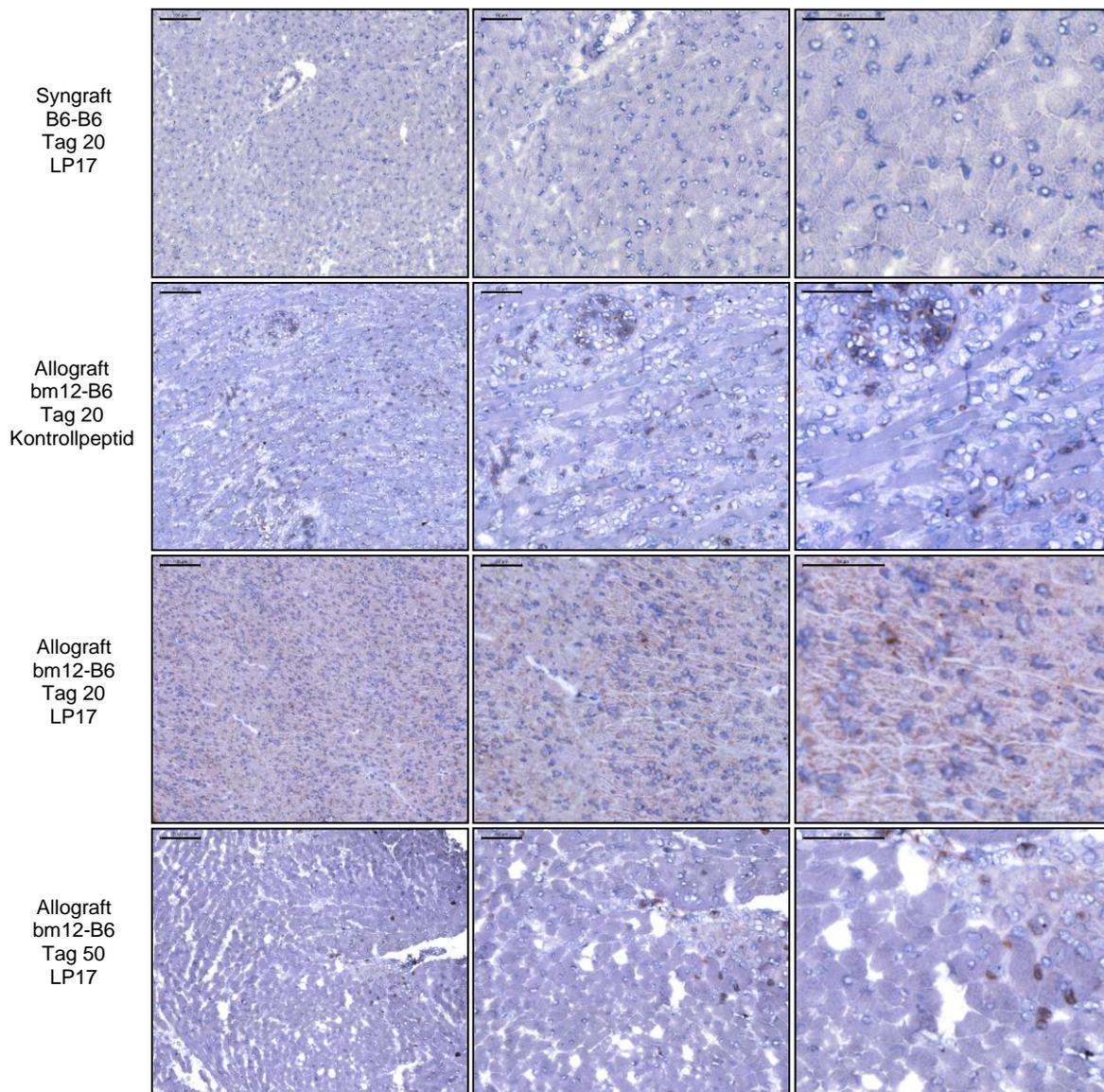


Abb. 52: Infiltration der CD11b⁺ Zellen in das transplantierte Herz unter Behandlung mit LP17 oder dem Kontrollpeptid.

Repräsentative Darstellung von Gewebeschnitten, die histologisch mit einem α CD11b Antikörper gefärbt wurden, zeigen eine reduzierte Infiltration von CD11b⁺ Zellen während einer Behandlung der Rezipienten mit LP17 bis Tag 20 und 50 nach Organtransplantation, im Vergleich zur Kontrollpeptid-behandelten Gruppe ($n = 5$; Messbalken: linke Spalte, Messbalken: linke Spalte, 100 μ m; mittlere und rechte Spalte, 50 μ m).

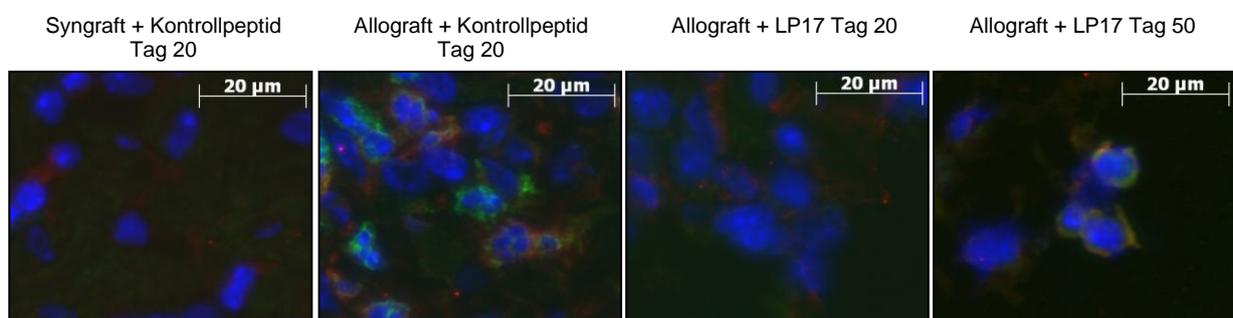


Abb. 53: Doppelfluoreszenzfärbung der CD11b⁺ TREM-1⁺ Zellen unter TREM-1 Inhibition.

Repräsentative Färbungen von Herztransplantaten an Tag 20 und 50. TREM-1⁺ Zellen in rot, CD11b⁺ Zellen in grün, Zellkerne in blau (Hoechst). Im Allograft konnte bei Behandlung mit dem Kontrollpeptid eine vermehrte Anzahl an TREM-1⁺ CD11b⁺ Zellen nachgewiesen werden. Diese waren an Tag 20 und 50 nur gering detektierbar ($n = 5$).

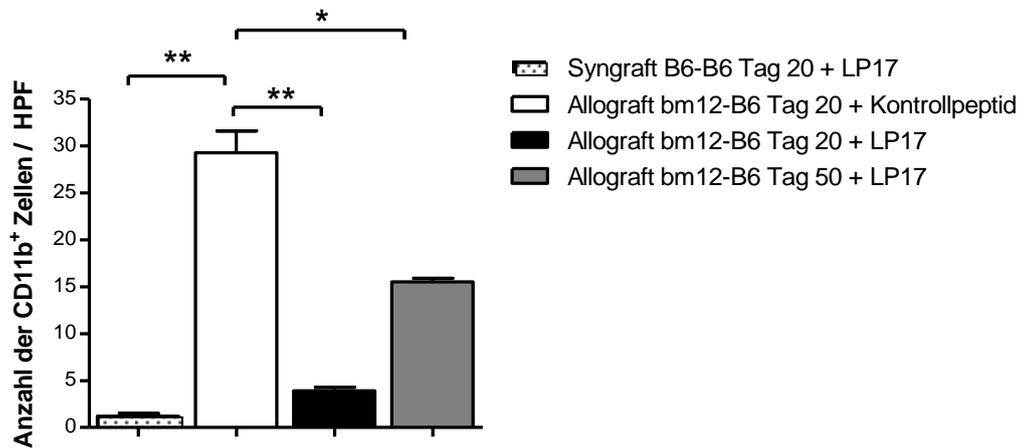


Abb. 54: CD11b⁺ Zellen in der chronischen Herztransplantation unter TREM-1 Inhibierung.

Gewebeschnitte wurden mit einem α CD11b Antikörper gefärbt und die CD11b⁺ Zellen pro Gesichtsfeld (HPF) gezählt. Es zeigte sich eine verminderte Infiltration von CD11b⁺ Zellen bei TREM-1 Inhibierung an Tag 20 im Vergleich zu der Kontrollgruppe (Behandlung mit dem Kontrollpeptid). Außerdem konnte ein erneuter Anstieg der CD11b⁺ an Tag 50 detektiert werden ($n = 3$ bis 5 , \pm SEM; * $p \leq 0,05$; ** $p < 0,001$).

3.4.2 Funktion alloreaktiver CD11b⁺ TREM-1⁺ APC auf die Zytokinexpression CD4⁺ T Lymphozyten

Alloreaktive CD11b⁺ Zellen weisen im Verlauf einer kontinuierlichen Hemmung von TREM-1 eine verminderte Expression von IL-6 und IL-23 auf (s. Abb. 55) und können möglicherweise CD4⁺ T Zellen während einer chronischen Abstoßungsreaktion beeinflussen. Um diese Hypothese zu überprüfen, wurden Rezipienten ab Tag 3 *post transplantationem* mit LP17 oder mit dem Kontrollpeptid behandelt und alloreaktive CD11b⁺ Zellen aus den Allografts an Tag 20 isoliert. Nach Ko-Inkubation mit naiven syngenem (B6) CD4⁺ Zellen, ohne einer weiteren Zugabe von LP17 oder dem Kontrollpeptid, zeigte sich eine stark reduzierte Expression der Zytokine IL-17A und IFN γ im Sinne einer verminderten Th17/Th1 Differenzierung von naiven CD4⁺ Zellen (s. Abb. 56) und bestätigte somit unsere Theorie.

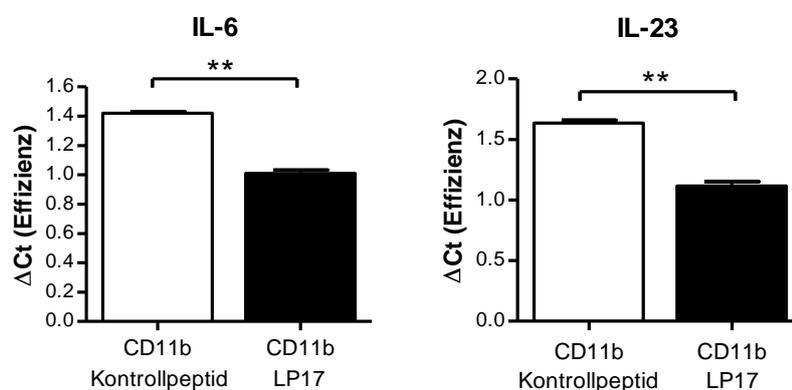


Abb. 55: Zytokinexpression von IL-6 und IL-23 in der chronischen Abstoßungsreaktion bei Inhibierung von TREM-1.

Allogene CD11b⁺ Zellen wurden aus den Donorherzen an Tag 20 *post transplantationem* isoliert und aufgereinigt. Anschließend erfolgte die Messung der Zytokine IL-6 und IL-23 mittels qPCR. Die Balkendiagramme zeigen eine signifikante Reduktion der Zytokine IL-6 und IL-23 in den allogenen CD11b⁺ Zellen bei Inhibierung von TREM-1 ($n = 3$, \pm SEM; ** $p < 0,001$).

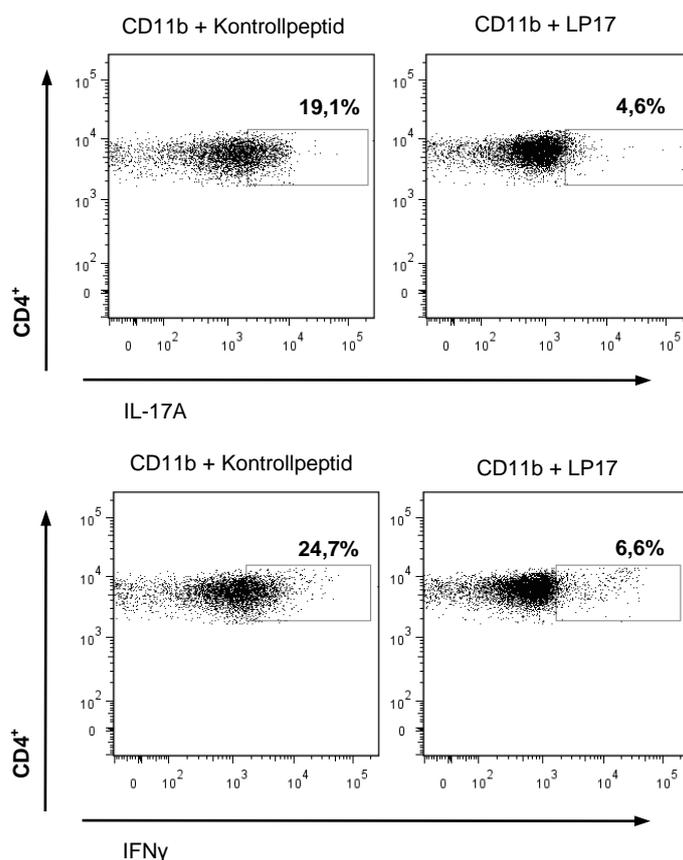


Abb. 56: Verringerung der IL-17A und IFN γ Produktion von CD4⁺ T Zellen nach Inkubation mit allogenen, TREM-1-inhibierten CD11b⁺ Zellen.

Experimentell wurden Rezipienten ab Tag 3 nach Organtransplantation mit LP17 oder dem Kontrollpeptid behandelt und an Tag 20 alloreaktive CD11b⁺ Zellen aus den Donorherzen isoliert. Anschließend erfolgte die Ko-Inkubation mit naiven CD4⁺ T Zellen in einem Verhältnis von 2:1 und eine zytometrische Messung der Zytokine IL-17A und IFN γ . Es zeigt sich eine starke Reduktion dieser pro-inflammatorischen Zytokine in CD4⁺ Zellen. Die repräsentativen Plot's zeigen ein exemplarisches Beispiel für drei unabhängig durchgeführte Versuche bei Ko-Inkubation von CD4⁺ Zellen mit allogenen TREM-1-inhibierten CD11b⁺ Zellen.

3.4.3 Spezifische Untersuchungen der adaptiven Immunantwort im Verlauf einer Inhibierung von TREM-1

Differenzierte CD4⁺ und CD8⁺ T Lymphozyten tragen in dem gewählten chronischen Abstoßungsmodell dazu bei, dass eine vaskuläre Entzündungsreaktion eingeleitet und die Transplantationsvaskulopathie gefördert wird (23, 25, 75). Eine Inhibierung von TREM-1⁺ APC im Verlauf der chronischen Abstoßungsreaktion könnte neben der verminderten Zytokinexpression CD4⁺ T Zellen (s. Kapitel 3.4.2) auch eine Infiltration von T Zellen in das Allograft verringern. Für die Untersuchung dieser Fragestellung, wurden Empfängertiere nach Organtransplantation mit LP17 bis Tag 20 oder 50 behandelt. Die immunhistologische Analyse unter Blockade von TREM-1 zeigte einen signifikanten Rückgang der CD4⁺ und CD8⁺ Zellen im Verlauf einer chronischen Abstoßungsreaktion, im Vergleich zu der Kontrollgruppe (s. Abb. 57-59). Wie durch die bisherigen Ergebnisse erwartet, zeigte sich die

IL-17A und IFN γ Zytokinexpression alloreaktiver CD4⁺ T Zellen (an Tag 20 aus dem Allograft isoliert) im Verlauf einer TREM-1 Inhibition (s. Abb. 60).

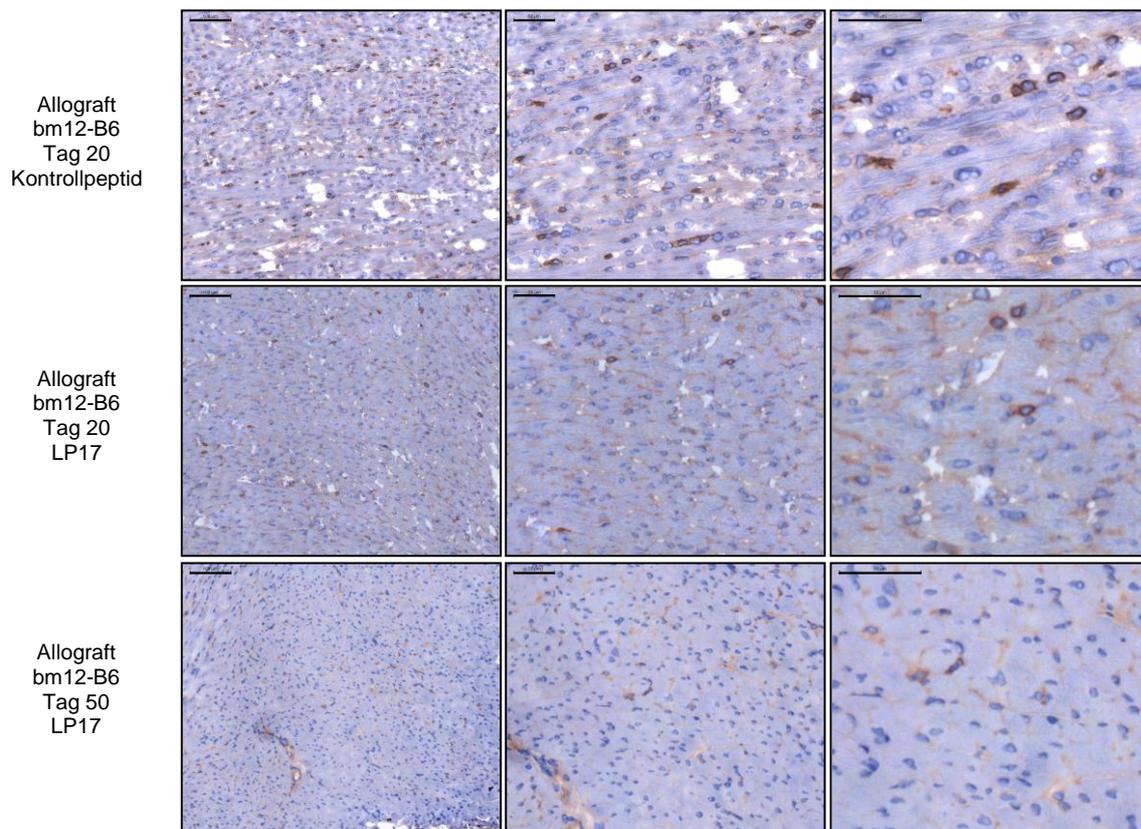


Abb. 57: Immunhistologie von infiltrierenden CD4⁺ T Zellen bei Blockade von TREM-1.

Repräsentative Gewebeschnitte zeigen eine deutliche Verringerung der infiltrierten CD4⁺ Zellen an Tag 20 und 50 nach Organtransplantation unter Inhibition von TREM-1, im Vergleich zur Kontrollgruppe ($n = 5$; Messbalken: linke Spalte, 100 µm; mittlere und rechte Spalte, 50 µm).

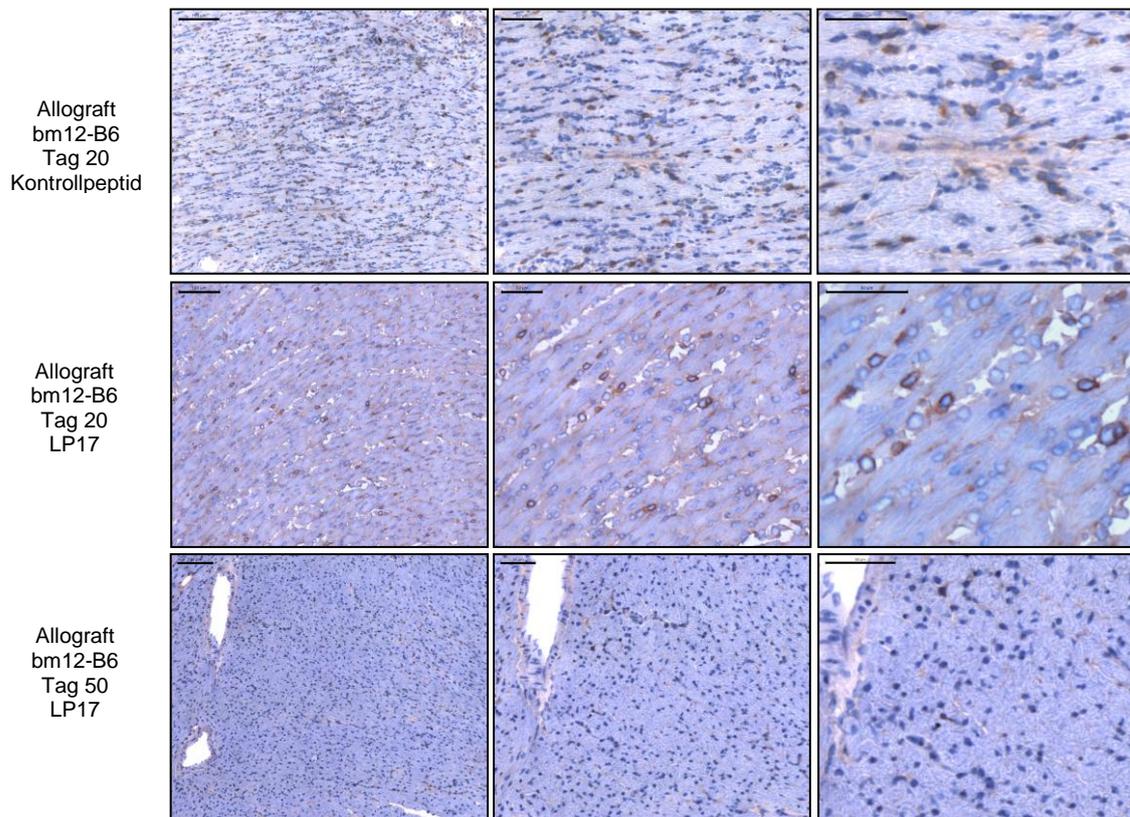


Abb. 58: CD8⁺ T Zellinfiltrate nach allogener Herztransplantation und Hemmung von TREM-1.

Exemplarisch dargestellte Gewebeschnitte von isolierten allogenen Transplantaten an Tag 20 und 50. Rezipienten wurden mit LP17 oder dem Kontrollpeptid im Verlauf der chronischen Abstoßungsreaktion behandelt. Es zeigte sich eine Reduktion der CD8⁺ Zellen unter Hemmung von TREM-1 ab Tag 20 *post transplantationem* ($n = 5$; Messbalken: linke Spalte, 100 µm; mittlere und rechte Spalte, 50 µm).

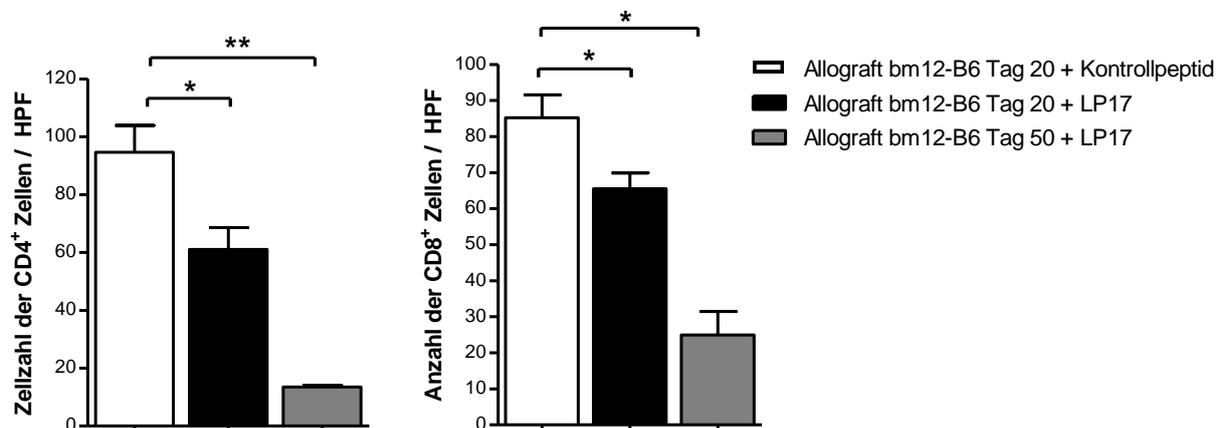


Abb. 59: Anzahl der CD4⁺ und CD8⁺ T Zellen unter TREM-1 Inhibierung.

T Lymphozyten wurden auf immunhistologischen Gewebeschnitten von allogenen Transplantaten nach Hemmung von TREM-1 bis Tag 20 und 50 pro Gesichtsfeld (HPF) ausgezählt. Die Grafik zeigt, dass eine Inhibierung von TREM-1 zu einer verminderten Infiltration der CD4⁺ und CD8⁺ T Zellen in das transplantierte Herz führt ($n = 3$ bis 5, \pm SEM; * $p \leq 0,05$; ** $p < 0,001$).

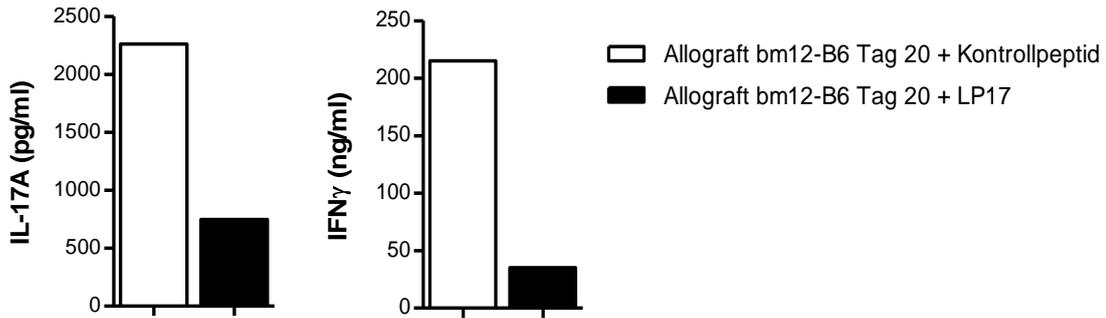


Abb. 60: IL-17A und IFN γ Expression von CD4⁺ Zellen während der chronischen Abstoßungsreaktion unter Inhibition von TREM-1.

Im Verlauf einer Blockade von TREM-1 zeigt sich eine reduzierte Expression der Zytokine IL-17A und IFN γ von CD4⁺ T Zellen an Tag 20 nach Organtransplantation. Für die Auswertung wurden CD4⁺ Zellen aus 5 allogenen und syngen transplantierten Donorherzen isoliert und gepoolt. CD4⁺ Zellen wurden für 48 h mit einem α CD3 und einem α CD28 Antikörper inkubiert und der Überstand mittels ELISA gemessen. Die Auswertung ist ein repräsentatives Beispiel für drei verschiedene Experimente.

Weitere mechanistische Untersuchungen zu den CD4⁺ T Lymphozyten zeigten, dass eine Behandlung der Rezipienten mit LP17 zu einer signifikanten Abnahme proliferierender CD4⁺ T Zellen an Tag 20 *post transplantationem* führt. Interessanterweise fand sich eine geringe Zunahme Ki67⁺ CD4⁺ Zellen unter Inhibition von TREM-1 im Allograft an Tag 50. Diese war aber dennoch im Vergleich zu der allogenen Gruppe unter Kontrollbehandlung an Tag 20 signifikant vermindert (s. Abb. 61).

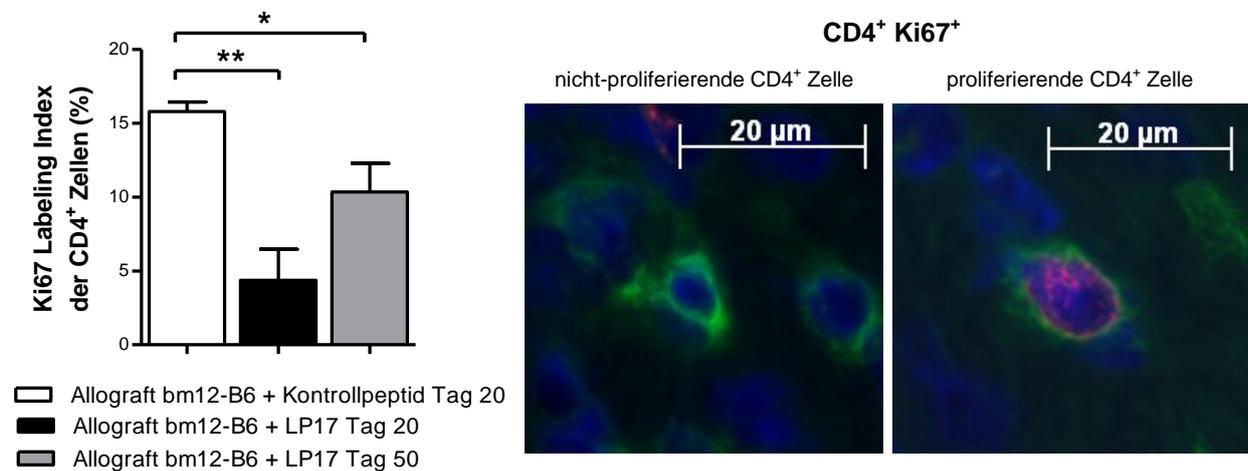


Abb. 61: Proliferationsindex der CD4⁺ Ki67⁺ Zellen im Verlauf einer TREM-1 Inhibition an Tag 20 und 50.

Gezeigt wird der Ki67 Labeling Index an Tag 20 und Tag 50 nach Transplantation bei Behandlung der Rezipienten mit dem Kontrollpeptid oder LP17 ($n = 3, \pm$ SEM; * $p \leq 0,05$; ** $p < 0,001$). Gewebeschnitte von Transplantaten an Tag 20 und 50 wurden mit einem α CD4 (grün) und α Ki67 (rot) Antikörper gefärbt. Die Kern-Gegenfärbung wurde mit Hoechst (blau) durchgeführt. Die repräsentativen Bilder zeigen Ausschnitte nicht-prolierender und proliferierender CD4⁺ Zellen (Messbalken: 20 μ m).

3.4.4 TREM-1⁺ CD11b⁺ APC wirken zelltoxisch auf naive CD4⁺ Lymphozyten *in vitro*

Die bisherigen Ergebnisse weisen darauf hin, dass eine Inhibierung von TREM-1 auf APC eine reduzierte Immunantwort CD4⁺ T Lymphozyten bedingt. Im weiteren Verlauf der Dissertation wurde geklärt, welches Aktivierungsmuster CD11b⁺ Zellen während einer Blockade von TREM-1 aufweisen und welche Funktion alloreaktive CD11b⁺ TREM-1⁺ APC auf CD4⁺ T Zellen *in vitro* ausüben können.

Der Ligand für TREM-1 wurde bisher noch nicht identifiziert. Jedoch führt die Gegenwart von Stimulatoren des TLR-Signalwegs einer Aktivierung der TREM-1-abhängigen Signalkaskade (76, 77). Für die Untersuchungen zu der Funktionalität von TREM-1 wurden die TLR-Stimulatoren LPS und PGN verwendet. Es zeigte sich eine Reduktion der Zytokine IL-6, IL-12(p70) und TNF von stimulierten CD11b⁺ Zellen im Verlauf einer *in vitro* Behandlung mit LP17 (s. Abb. 62).

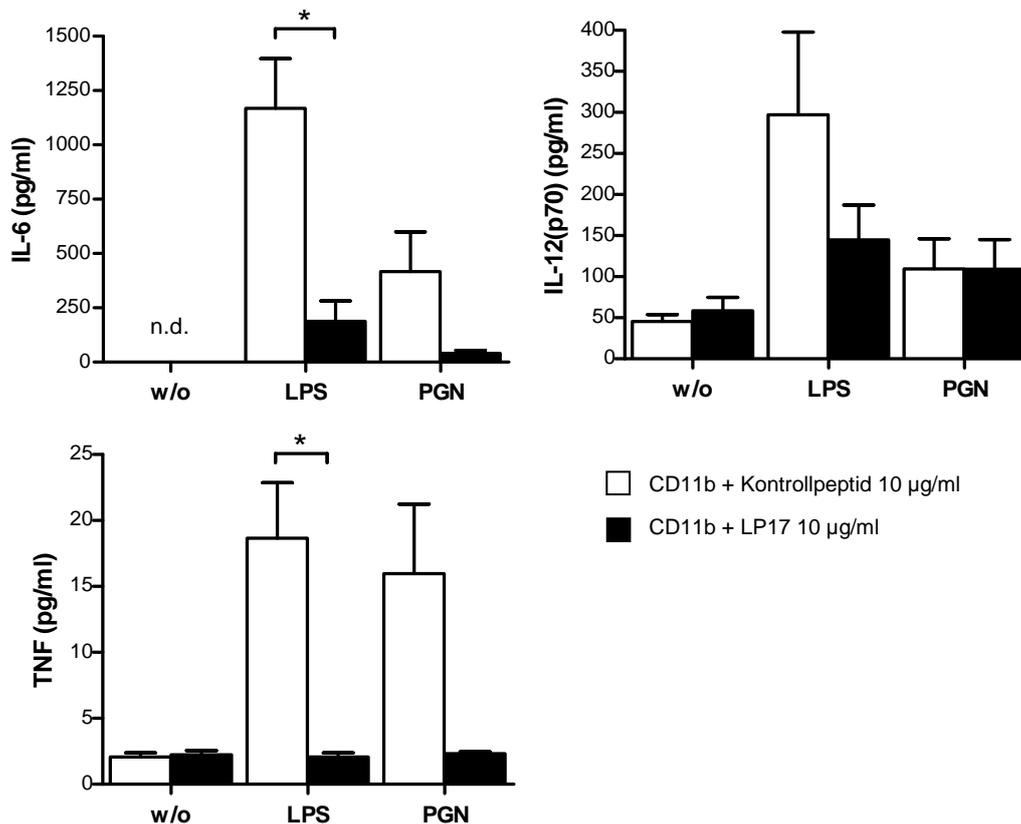


Abb. 62: Zytokinexpression der CD11b⁺ Zellen unter Inhibierung von TREM-1.

CD11b⁺ Zellen wurden aus einer B6 Milz isoliert und aufgereinigt. Anschließend erfolgte eine Stimulation mit den TLR Liganden LPS und PGN für 48 h. Gleichzeitig wurde TREM-1 über die Behandlung mit LP17 blockiert. Als Kontrolle diente eine Behandlung der Zellen mit dem Kontrollpeptid. Nach 48 h wurde der Überstand abgenommen und mittels ELISA die Zytokinkonzentration für IL-6, IL-12(p70) und TNF gemessen ($n = 3$ bis 5 , \pm SEM; * $p \leq 0,05$).

Im nächsten Schritt wurde geklärt, ob alloreaktive CD11b⁺ TREM-1⁺ APC als extrazelluläre Stimulatoren auf CD4⁺ T Zellen wirken können. Um diese Hypothese genauer zu überprüfen, wurde eine gemischte Leukozytenreaktion *in vitro* angesetzt. Dazu wurden alloreaktive CD11b⁺ Zellen aus dem Donorherz an Tag 20 *post transplantationem* isoliert und mit LP17 behandelt. An Tag 1 der gemischten Leukozytenreaktion wurden syngene CD4⁺ Zellen (B6) in einem Verhältnis von 2:1 zu den CD11b⁺ Zellen hinzugefügt. Nach 48 h erfolgte die Analyse der CD4⁺ T Zellen mittels FACS. Die Auswertung zeigte eine starke Verringerung CD4⁺ T Zellen während einer Inkubation mit alloreaktiven CD11b⁺ Zellen und einer Inhibition von TREM-1 (s. Abb. 63, schwarze Balken). Eine Inkubation CD4⁺ Zellen mit dem Kontrollpeptid oder LP17 ohne einer Ko-Inkubation mit CD11b⁺ Zellen zeigte keinen Effekt auf den prozentualen Anteil CD4⁺ T Zellen (s. Abb. 63, links). Die Auswertung der Konzentrationskurve des synthetischen Peptids zeigte, dass erst ab 1 ng/ml LP17 ein deutlicher zelltoxischer Effekt von alloreaktiven CD11b⁺ Zellen auf CD4⁺ T Zellen detektierbar war (s. Abb. 64).

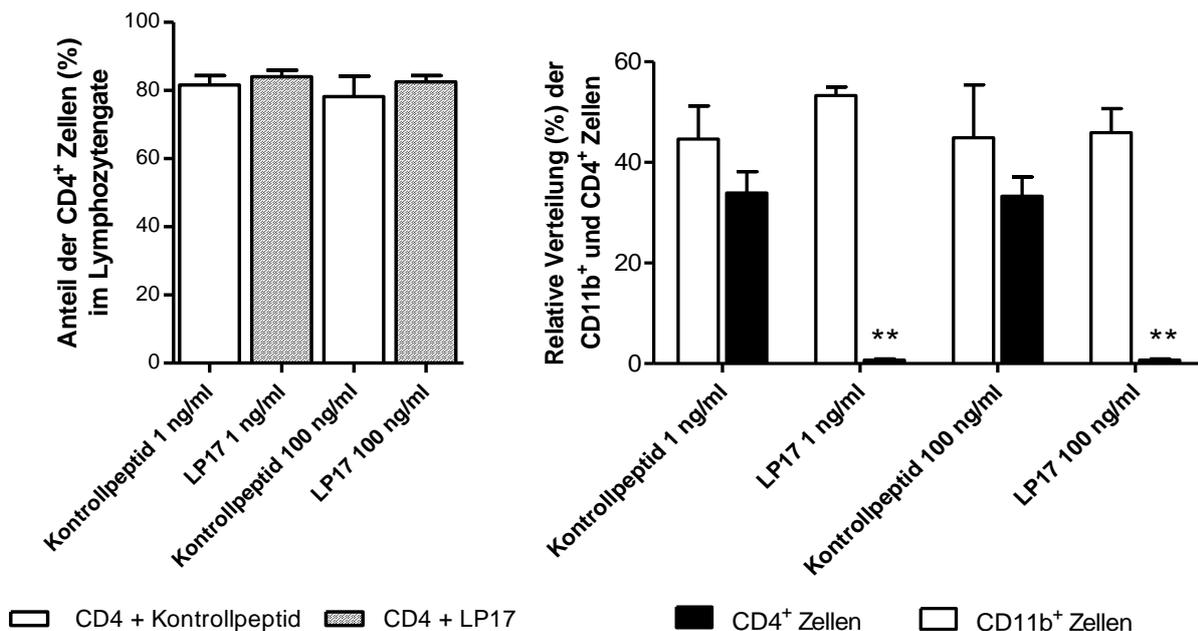


Abb. 63: Anzahl der CD4⁺ T Zellen unter Inkubation mit alloreaktiven CD11b⁺ Zellen und einer Behandlung mit dem Kontrollpeptid oder LP17.

Die Balkendiagramme zeigen CD4⁺ T Zellen, die zum einen als Singelkultur mit LP17 oder dem Kontrollpeptid behandelt wurden (gegatet auf die gesamte Lymphozytenpopulation). Zum anderen wurden CD4⁺ T Zellen in einem Verhältnis von 2:1 mit alloreaktiven CD11b⁺ Zellen für 48 h und LP17 bzw. dem Kontrollpeptid inkubiert. Bei Behandlung der CD4⁺ Zellen mit LP17 und gleichzeitiger Ko-Inkubation mit CD11b⁺ Zellen, konnte eine starke Verringerung der CD4⁺ Zellen detektiert werden ($n = 3$ bis 4 , \pm SEM; $**p < 0,001$).

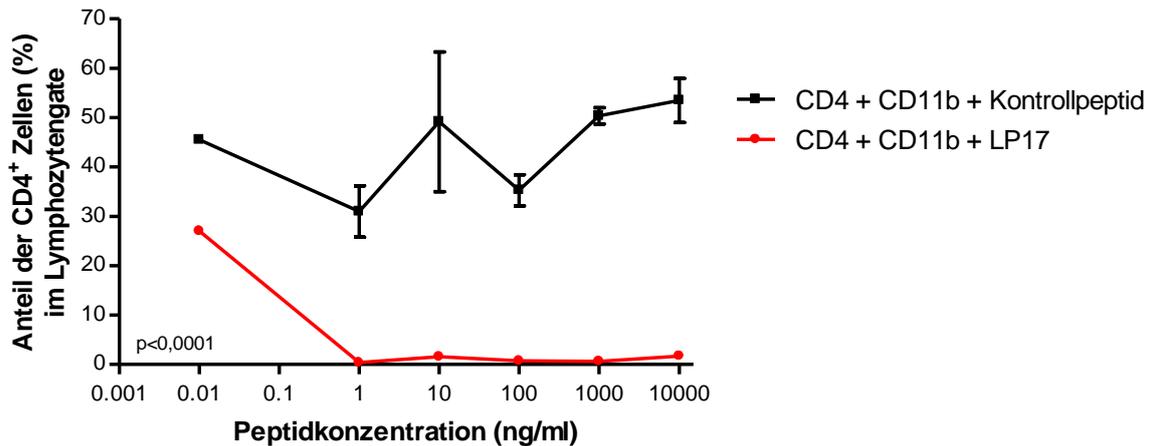


Abb. 64: Untersuchung der Peptidkonzentration für LP17 und Kontrollpeptid auf CD4⁺ T Lymphozyten bei Ko-Inkubation mit alloreaktiven CD11b⁺ Zellen *in vitro*.

Naive CD4⁺ T Zellen wurden mit alloreaktiven CD11b⁺ Zellen für 48 h inkubiert. Die zytometrische Auswertung ergab eine dosisabhängige Verminderung der CD4⁺ Zellen (gegattet auf die gesamte Lymphozytenpopulation) bei Behandlung mit LP17 und Ko-Inkubation mit alloreaktiven CD11b⁺ Zellen (n pro Dot = 3-4; \pm SEM).

Der zelltoxische Einfluss von CD11b⁺ APC auf CD4⁺ T Lymphozyten zeigte eine Veränderung im Zellzyklus. Die zytometrische Untersuchung CD4⁺ Lymphozyten im Verlauf der angesetzten Leukozytenreaktion ergab eine starke Veränderung von der G0/G1 hin zur S/G2/M Phase (s. Abb. 65).

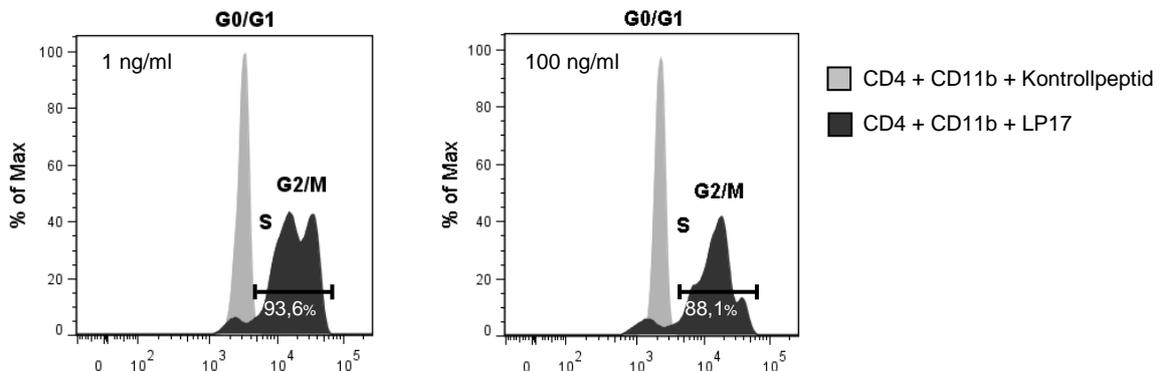


Abb. 65: Stadium des Zellzyklus von CD4⁺ Lymphozyten bei Ko-Inkubation mit alloreaktiven CD11b⁺ Zellen unter Hemmung von TREM-1.

Inkubation der CD4⁺ T Lymphozyten erfolgte für zwei Tage mit alloreaktiven CD11b⁺ Zellen und einer Blockade von TREM-1 (1 ng/ml oder 100 ng/ml). Die gezeigten Histogramme zeigen eine Veränderung im Zellzyklus vorwiegend hin zur S/G2/M Phase ($n = 3$).

Im nächsten Schritt wurde der zelltoxische Einfluss alloreaktiver CD11b⁺ Zellen während einer Inhibierung von TREM-1 auf naive CD4⁺ T Zellen genauer untersucht. Experimentell wurden alloreaktive CD11b⁺ Zellen an Tag 20 nach Organtransplantation aus dem bm12-Donorherzen gewonnen. Während der Blockade von TREM-1 erfolgte eine Ko-Inkubation der CD11b⁺ Zellen mit naiven CD4⁺ Zellen und den klassischen Inhibitoren des Apoptosewegs (Caspase-abhängigen Apoptose, des Fas/FasL und der iNOS). Nach 48 h erfolgten eine zytometrische Auswertung der gemischten Leukozytenreaktion und die Untersuchung des

Zellzyklus CD4⁺ T Zellen. Eine Inkubation naiver CD4⁺ T Zellen mit LP17 oder dem Kontrollpeptid zeigte während einer Blockade der Caspase, Fas/FasL oder iNOS keinen Unterschied in der relativen Zellzahl. Hingegen, eine Inkubation mit alloreaktiven CD11b⁺ Zellen während einer Hemmung von TREM-1 zeigte trotz einer Behandlung mit den klassischen Apoptoseinhibitoren keine Veränderung des zelltoxischen Effektes CD11b⁺ Zellen auf CD4⁺ T Lymphozyten. Auch der Zellzyklus CD4⁺ T Lymphozyten zeigte keine wesentliche Veränderung (s. Abb. 66 und 67).

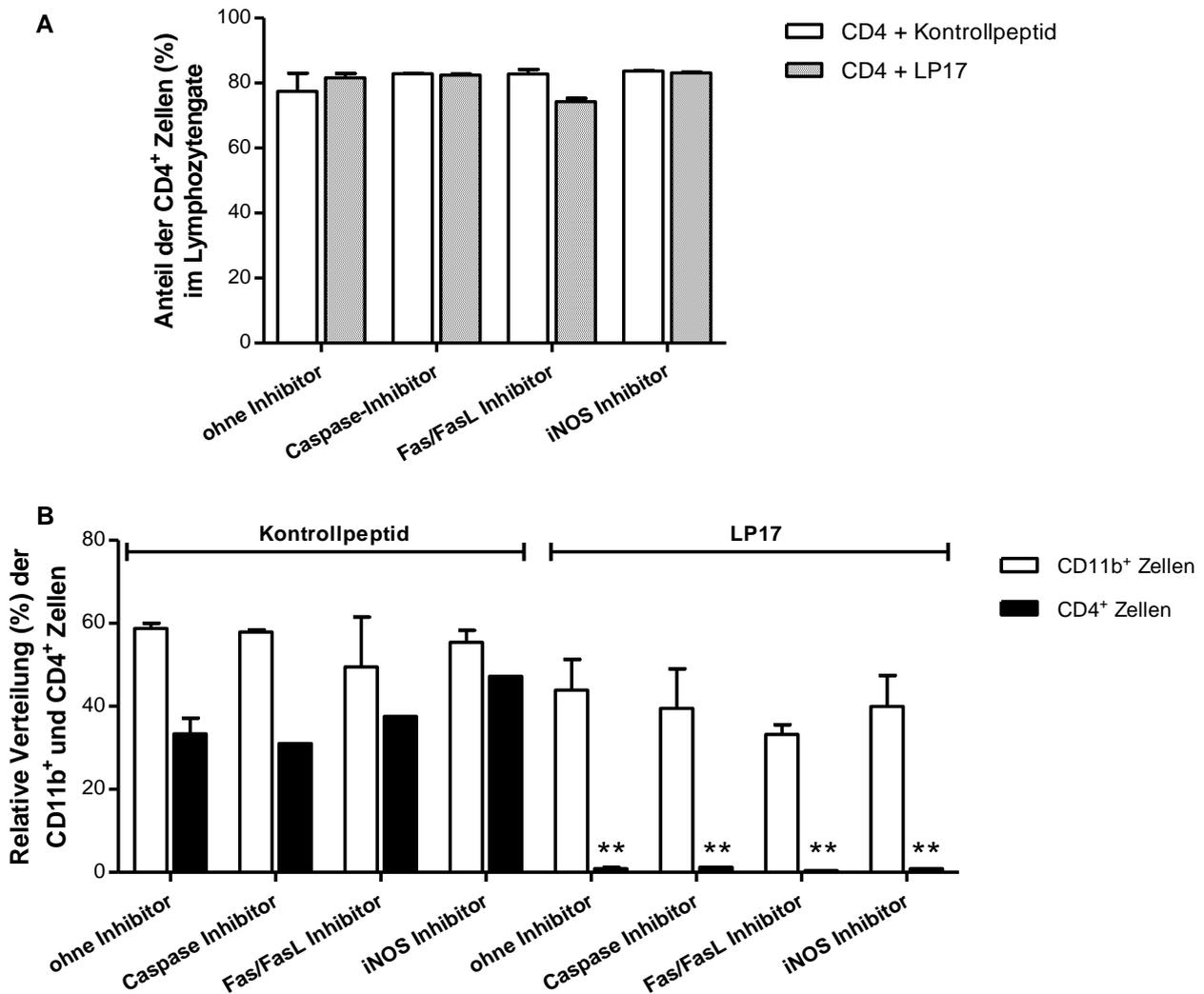


Abb. 66: Blockade der klassischen Apoptose-Signalwege zeigt keine Auswirkung auf den zelltoxischen Einfluss CD11b⁺ Zellen auf CD4⁺ T Lymphozyten.

Die gezeigten Balkendiagramme sind eine repräsentative Darstellung der CD4⁺ Zellen, die gemeinsam mit alloreaktiven CD11b⁺ Zellen für 48 h inkubiert wurden. Zusätzlich erfolgte eine Hemmung von TREM-1 (LP17: 1 ng/μl) und eine Blockade des Apoptose-Signalwegs mit Inhibitoren für Caspase, Fas/FasL und iNOS. Ohne alloreaktive CD11b⁺ Zellen aus dem Donorherz konnte kein Effekt der klassischen Apoptoseinhibitoren auf naive CD4⁺ Zellen detektiert werden (A). Eine Inkubation mit CD11b⁺ Zellen unter Hemmung von TREM-1 führte hingegen zu einer starken Reduktion der CD4⁺ Zellen (B). Dieser zelltoxische Einfluss CD11b⁺ Zellen auf CD4⁺ Zellen konnte mit den klassischen Inhibitoren des Apoptose-Signalwegs nicht unterbunden werden (B; n = 2 bis 4; ± SEM).

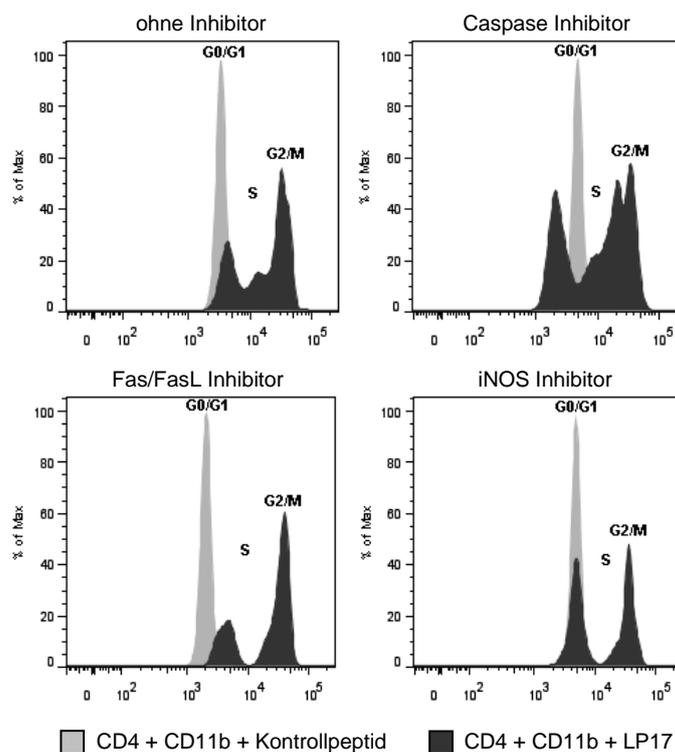


Abb. 67: Phase des Zellzyklus von CD4⁺ T Zellen unter Inhibition der klassischen Apoptoseaktivatoren.

Die repräsentativen Histogramme zeigen CD4⁺ T Lymphozyten, die mit alloreaktiven CD11b⁺ Zellen (von Tag 20 *post transplantationem*) für 48 h inkubiert wurden. Es zeigte sich eine starke Veränderung im Zellzyklus CD4⁺ Zellen hin zur G2/M Phase unter LP17 Behandlung, die durch die klassischen Apoptoseinhibitoren nicht unterbunden werden konnte ($n = 2$).

Zusammenfassend zeigten die Untersuchungen naiver CD4⁺ T Zellen bei einer Ko-Inkubation mit TREM-1⁺ CD11b⁺ APC eine starke Reduzierung der Zellzahl CD4⁺ Lymphozyten im Verlauf einer Behandlung mit LP17. Die Theorie einer apoptotischen Funktion der CD11b⁺ Zellen konnte dabei nicht bestätigt werden.

3.5. *Initiale Inhibition von TREM-1 im Verlauf der chronischen Abstoßungsreaktion*

Aus den bisherigen Ergebnissen konnte gezeigt werden, dass TREM-1⁺ APC *post transplantationem* in das Donorherz einwandern und die Ausprägung einer chronischen Abstoßungsreaktion u.a. über CD4⁺ T Zellen beeinflussen können. Es bleibt die Frage offen, ob eine initiale Inhibition von TREM-1 in der frühen Phase der angeborenen Immunantwort ausreichend ist um eine Transplantatfunktion nach allogener Herztransplantation zu verlängern.

Für diese Untersuchung wurde folgendes experimentelles Design gewählt (s. Abb. 68). Es erfolgte eine heterotope Transplantation von bm12 Donorherzen in B6 Empfängertiere. Diese wurden ab Tag 3 täglich mit LP17 behandelt. An Tag 50 wurden die Versuchstiere in zwei

Gruppen aufgeteilt. Eine Gruppe wurde weiterhin bis Tag 150 mit LP17 therapiert, was eine dauerhafte Inhibierung von TREM-1 zur Folge hatte. Die zweite Gruppe wurde ab Tag 50 mit dem Kontrollpeptid bis Tag 150 behandelt, sodass eine Blockade der angeborenen Immunantwort über TREM-1 aufgehoben wurde (LP17 Stopp). Die Analyse der Transplantatfunktion bis Tag 150 ergab keine signifikante Veränderung zwischen einer kontinuierlichen (LP17) und initialen Hemmung (LP17 Stopp) von TREM-1 (s. Abb. 69).

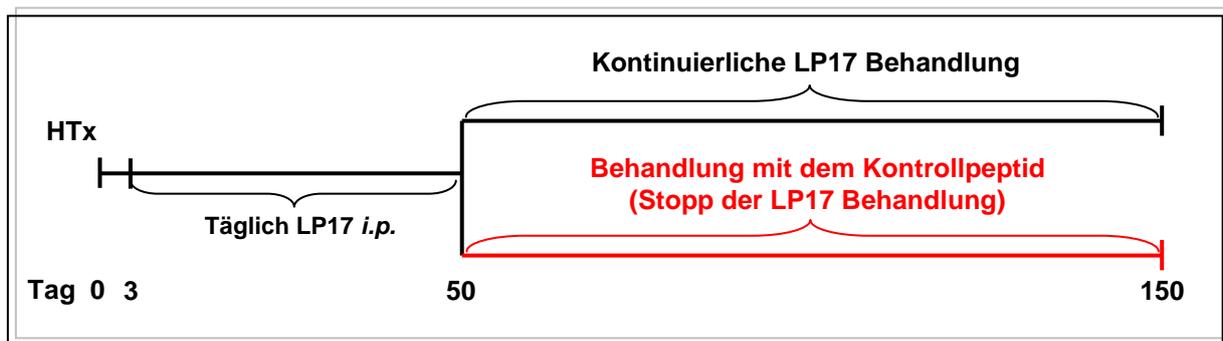


Abb. 68: Experimentelles Design für die Untersuchung von TREM-1 in der initialen Phase der angeborenen Immunität während der chronischen Abstoßungsreaktion.

Herzen von bm12 Spendertieren wurden heterotop in B6 Rezipienten transplantiert (HTx) und ab Tag 3 täglich mit LP17 behandelt. Ab Tag 50 wurde eine Gruppe weiterhin mit LP17 behandelt; der zweiten Gruppe wurde das Kontrollpeptid injiziert. Die Rezipienten wurden bis Tag 150 behandelt und die Herzen palpatorisch analysiert und für Überlebensdaten verwendet. Die Auswertung aller weiteren Versuche erfolgte an Tag 120.

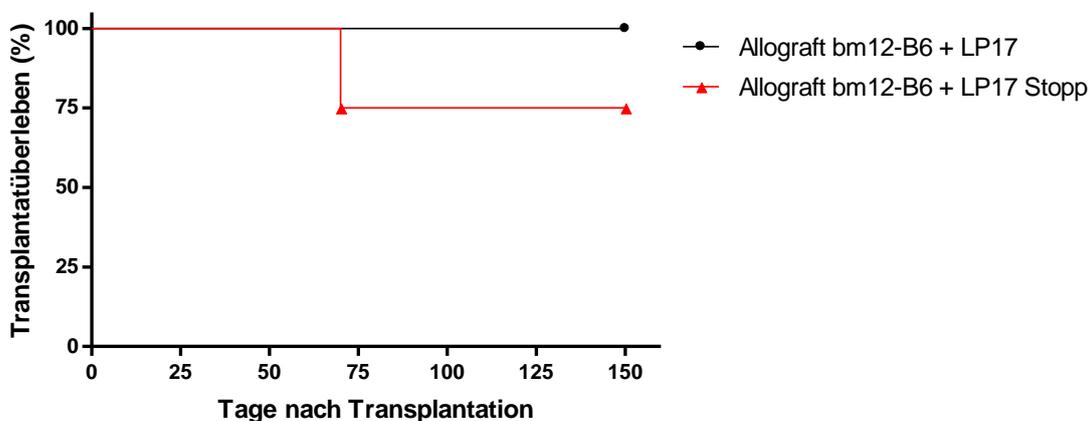


Abb. 69: Transplantatfunktion der Donorherzen bei Inhibierung von TREM-1 in der frühen Phase der angeborenen Immunität.

B6 Tiere wurden heterotrop mit bm12 Donorherzen transplantiert und bis Tag 50 mit LP17 behandelt. Es erfolgte die Aufteilung in zwei Gruppen. Eine Gruppe wurde weiter kontinuierlich für TREM-1 depletiert (-●-; $n = 5$). Für die zweite Gruppe erfolgte die Behandlung mit LP17 nur in der initialen Phase, bis Tag 50. Anschließend wurde LP17 abgesetzt und weiter mit dem Kontrollpeptid bis Tag 150 behandelt (-▲-; $n = 5$). Das Überleben allogener Herztransplantate wurde mittels Fingerpalpation überwacht. Überlebensdaten werden als Kaplan-Meier Plot dargestellt.

Für alle weiteren Untersuchungen wurde Tag 120 nach Organverpflanzung als Endzeitpunkt gewählt. In der histologischen Auswertung zeigte sich in beiden Gruppen eine geringe

perivaskuläre Leukozyteninfiltration mit sehr geringem parenchymalen und vaskulärem Schaden des transplantierten Organs (s. Abb. 70 und 71). Eine Analyse der Organfibrose, mit Hilfe einer Masson's Trichrom Färbung und einer quantitativen Messung der Genexpression von *collagen type I*, zeigte ebenfalls keinen Unterschied zwischen initialer und kontinuierlicher Inhibierung von TREM-1 und eine sehr geringe Kollagenexpression in beiden Gruppen (s. Abb. 72 und 73).

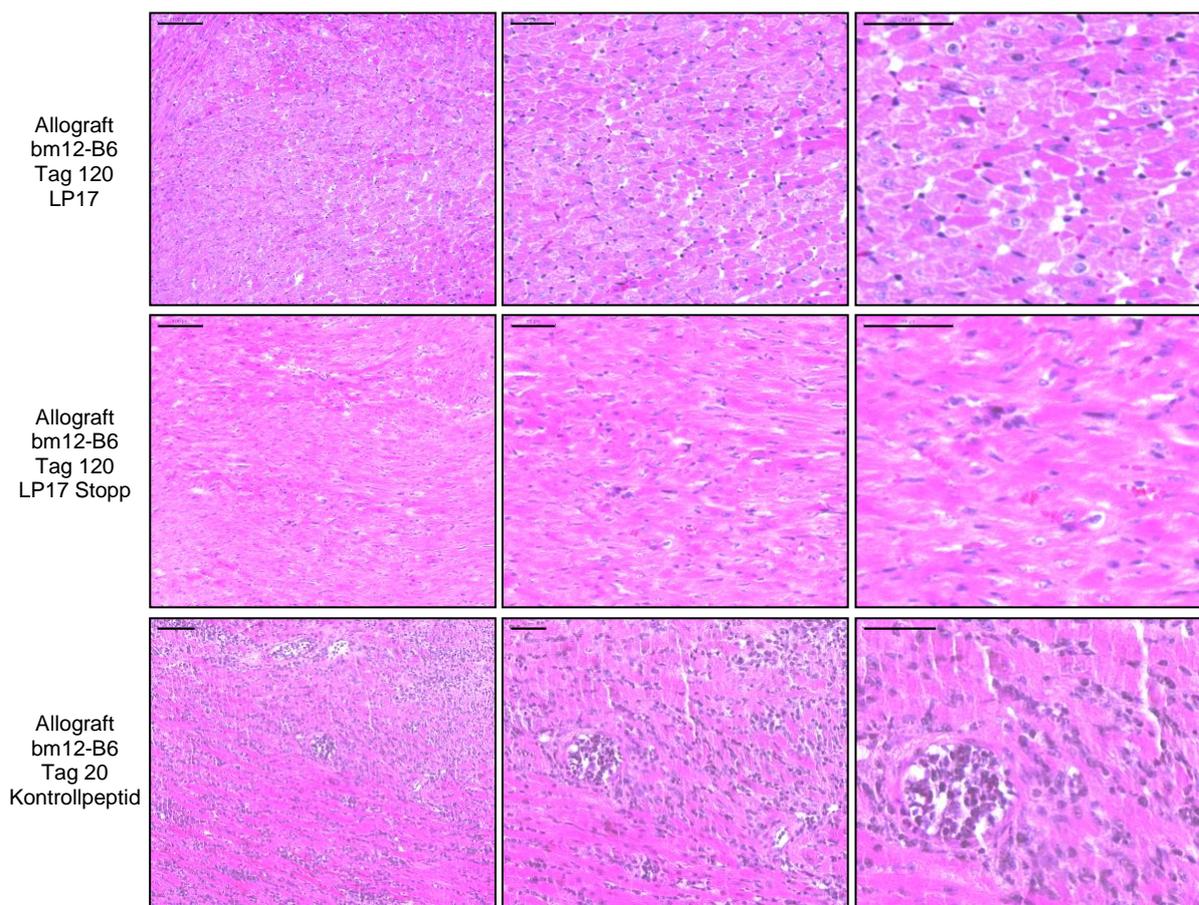


Abb. 70: Histologische Darstellung der Abstoßungsreaktion nach kontinuierlicher (LP17) oder initialer (LP17 Stopp) Inhibierung von TREM-1.

Die histologische Auswertung zeigte eine geringe Leukozyteninfiltration aber keine weiteren typischen Abstoßungscharakteristika nach dauerhafter oder initialer Hemmung von TREM-1 im Vergleich zu einer kontinuierlicher Behandlung der Rezipienten mit dem Kontrollpeptid bis Tag 20. Die gefärbten Myokardschnitte repräsentieren ein Transplantat aus einer Gruppe von $n = 5$ Tieren (Messbalken: linke Spalte, 100 µm; mittlere und rechte Spalte, 50 µm).

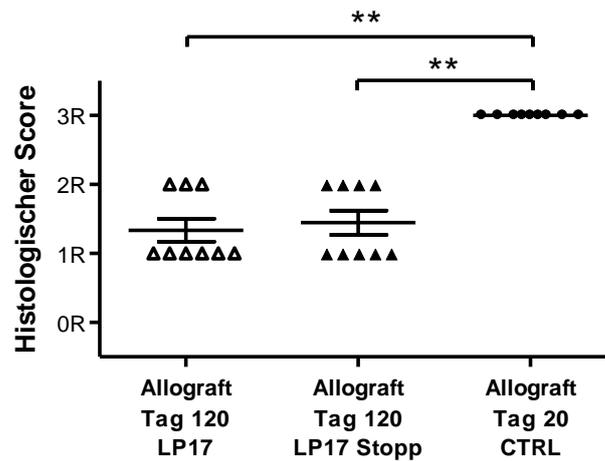


Abb. 71: Histologisches Scoring der chronischen Abstoßungsreaktion nach kontinuierlicher (LP17) oder initialer (LP17 Stopp) Blockade von TREM-1 an Tag 120.

Der histologische Score zeigte keinen Unterschied zwischen einer kontinuierlichen oder initialen Blockade von TREM-1, jedoch eine starke Verbesserung des Scorings im Vergleich zur Kontrollgruppe (Kontrollpeptid bis Tag 20; $n = 9$; \pm SEM).

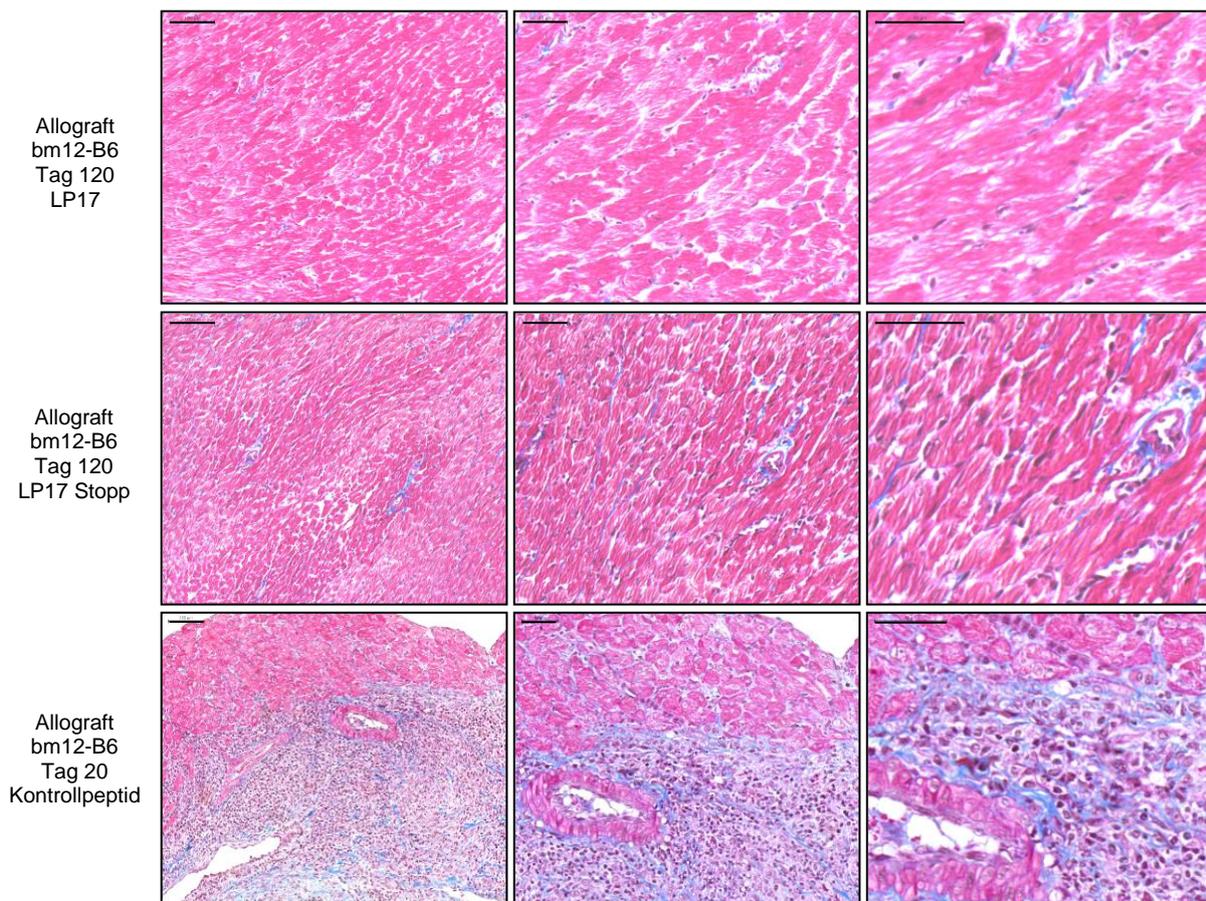


Abb. 72: Darstellung der Kollageneinlagerung in Donorherzen bei initialer (LP17 Stopp) und kontinuierlicher (LP17) Inhibition von TREM-1.

Die Organfibrose zeigt sich in beiden Gruppen nur gering ausgeprägt im Vergleich zur Gruppe, die mit dem Kontrollpeptid bis Tag 20 behandelt wurde. Die Myokardschnitte repräsentierten ein Transplantat aus einer Gruppe von $n = 5$ Tieren. Messbalken: linke Spalte, 100 μ m; mittlere und rechte Spalte, 50 μ m (Kollagenfasern in blau).

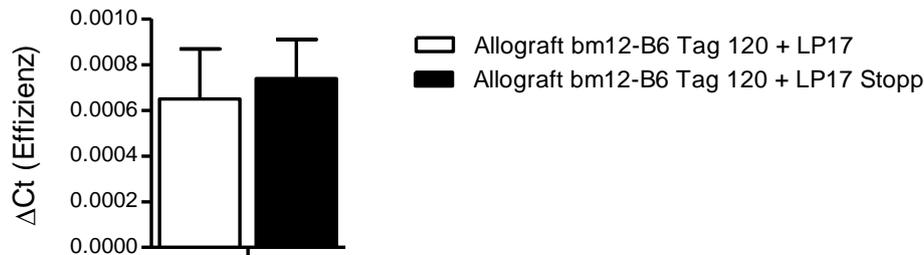


Abb. 73: Expression von Kollagen an Tag 120 post transplantationem.

Weder eine kontinuierliche (LP17) noch eine initiale (LP17 Stopp) Inhibierung von TREM-1 führte zu einem Unterschied in der *collagen type I* Expression an Tag 120 nach Organtransplantation ($n = 5$, \pm SEM).

Diese primären Beobachtungen zeigten deutlich, dass eine initiale Inhibierung von TREM-1 ausreichend ist, um das Überleben der Transplantate dauerhaft zu sichern. Eine Analyse der infiltrierenden TREM-1⁺ und CD11b⁺ Zellen zeigte eine signifikante Reduktion bei kontinuierlicher wie auch initialer Gabe von LP17 im Verlauf der chronischen Abstoßungsreaktion, im Vergleich zur allogenen Gruppe mit Kontrollbehandlung (s. Abb. 74 und 75). Im Bezug auf die Anzahl der CD11b⁺ Zellen konnte eine geringe aber wiederkehrende leukozytäre Infiltration nach dem Absetzen von LP17 festgestellt werden (s. Abb. 76).

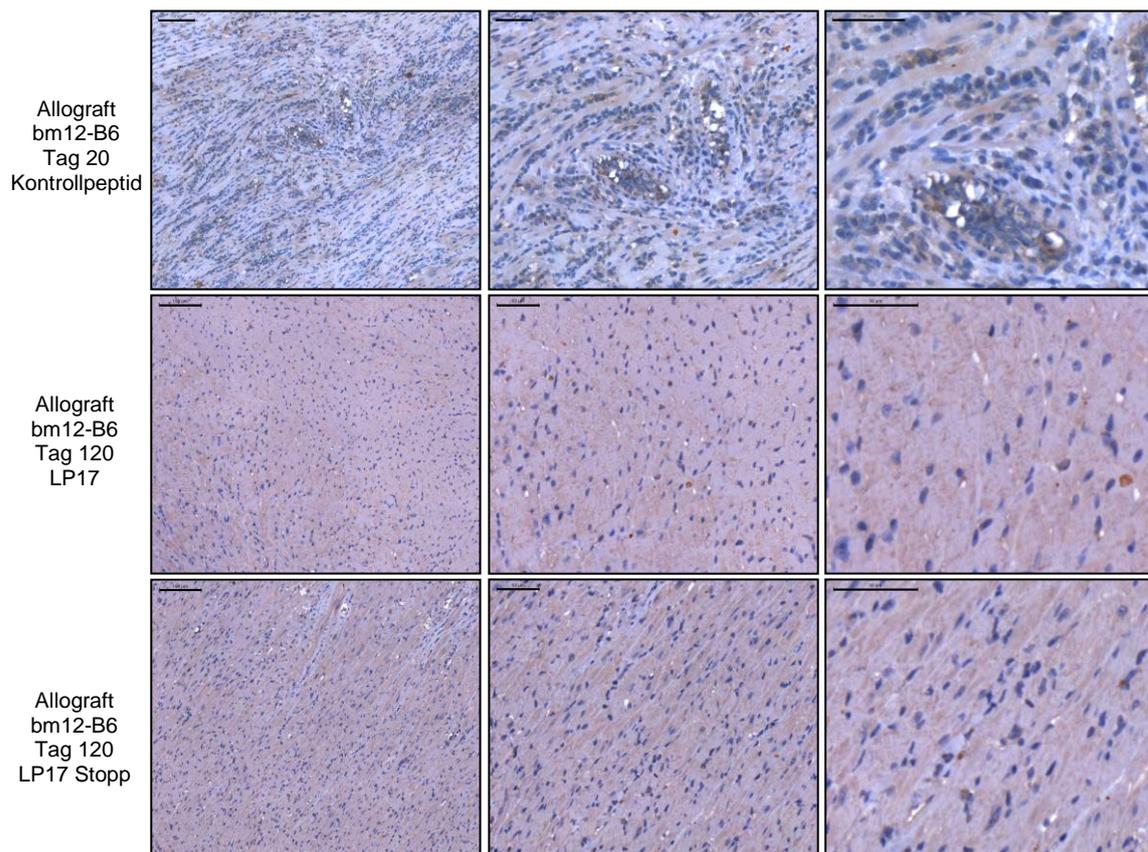


Abb. 74: Infiltration von TREM-1⁺ Zellen bei Behandlung der Rezipienten mit LP17 oder dem Kontrollpeptid im Langzeitversuch.

Gezeigt werden TREM-1⁺ Färbungen von repräsentativen Gewebeschnitten ($n = 5$) von Spenderherzen an Tag 120 nach initialer und kontinuierlicher Behandlung von LP17. Als Kontrolle für eine starke TREM-1⁺ Infiltration wird ein Gewebeschnitt an Tag 20 nach allogener (bm12-B6) Transplantation angegeben, bei Behandlung der Rezipienten mit dem Kontrollpeptid. Es zeigt sich eine starke Reduktion der TREM-1⁺ Zellen an Tag 120 bei initialer oder kontinuierlicher Hemmung von TREM-1 (Messbalken: linke Spalte, 100 μ m; mittlere und rechte Spalte, 50 μ m).

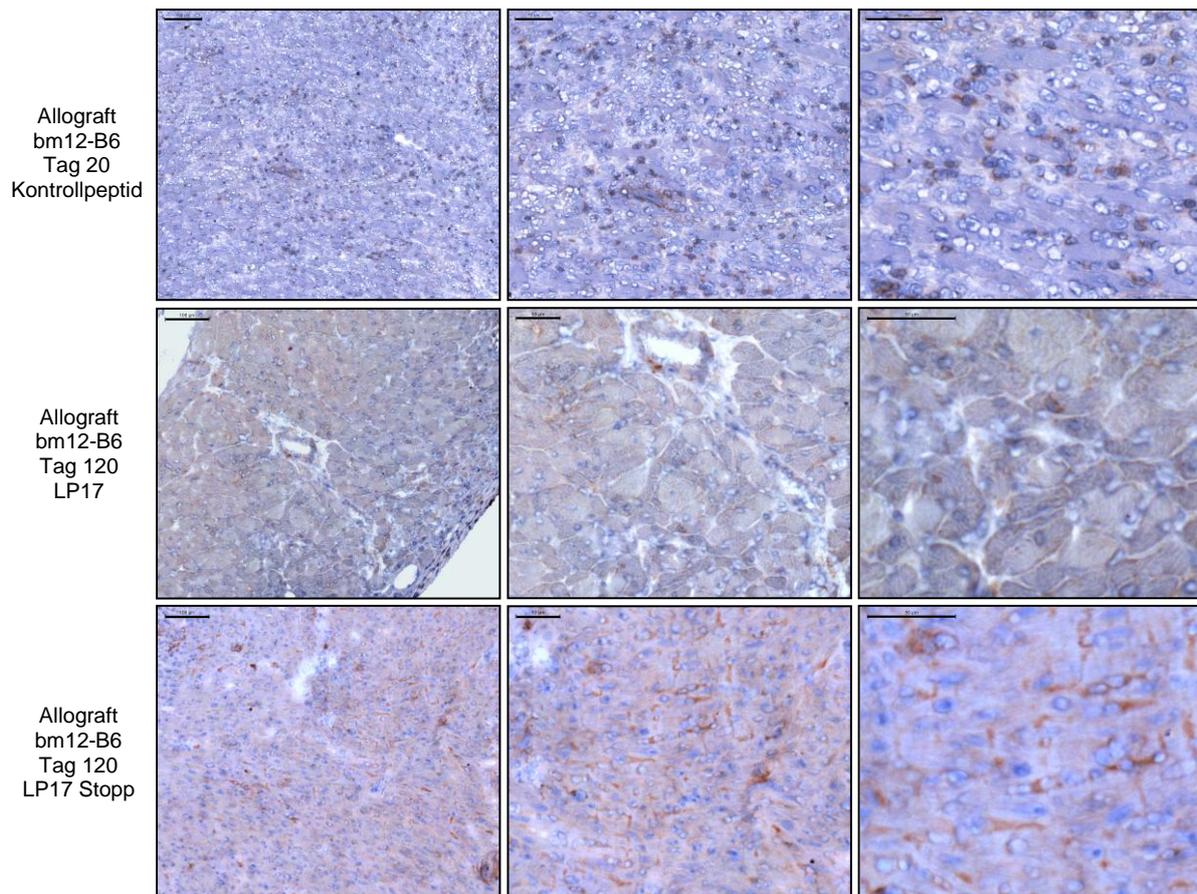


Abb. 75: Infiltration der CD11b⁺ Zellen bei initialer und kontinuierlicher Blockierung von TREM-1.

Repräsentative Gewebeschnitte ($n = 5$) einer allogenen (bm12-B6) Herztransplantation an Tag 20 und 120 zeigen bei initialer (LP17 Stopp) und kontinuierlicher (LP17) Hemmung von TREM-1 eine deutliche Reduktion der CD11b⁺ Zellen. Als Kontrolle dient eine Abstoßungsreaktion an Tag 20 bei Behandlung der Rezipienten mit dem Kontrollpeptid (Messbalken: linke Spalte, 100 µm; mittlere und rechte Spalte, 50 µm).

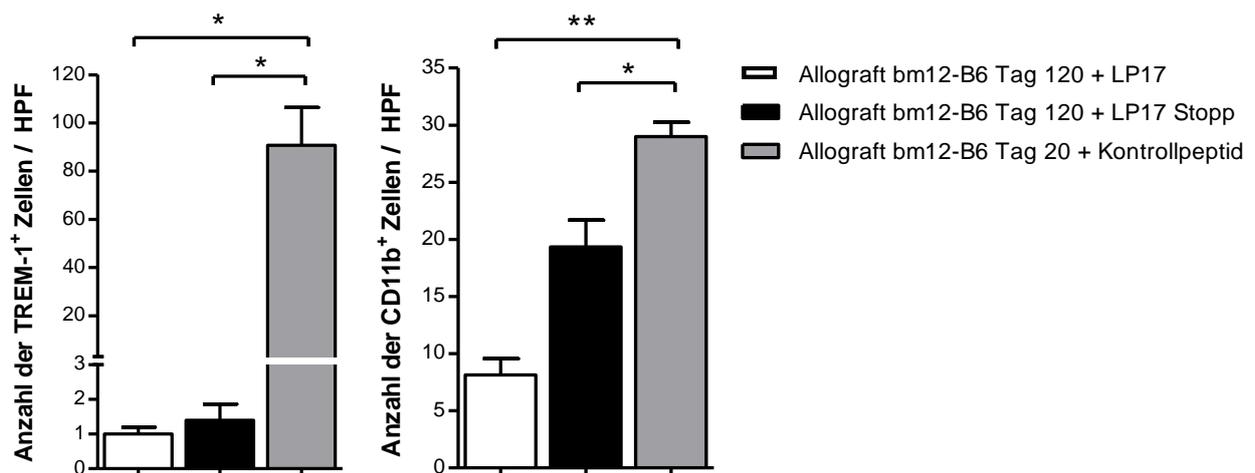


Abb. 76: Anzahl der TREM-1⁺ und CD11b⁺ Zellen bei initialer und kontinuierlicher Hemmung von TREM-1.

Gefärbte Myokardschnitte mit α TREM-1 und α CD11b Antikörper wurden pro Gesichtsfeld (HPF) für TREM-1⁺ und CD11b⁺ Zellen ausgezählt. Es zeigte sich eine signifikante Verminderung der TREM-1⁺ und CD11b⁺ Zellen bei initialer (LP17 Stopp) oder kontinuierlicher (LP17) Inhibierung von TREM-1 an Tag 120, im Vergleich zu einer Abstoßungsreaktion an Tag 20 ($n = 5$, \pm SEM; * $p \leq 0,05$; ** $p < 0,001$).

Eine Doppelfluoreszenzfärbung für TREM-1 und CD11b bestätigte ebenfalls die bisherigen Ergebnisse. Es konnten auch mit dieser Methode kaum TREM-1⁺ CD11b⁺ APC an Tag 120 bei initialer (LP17 Stopp) oder kontinuierlicher (LP17) Inhibierung von TREM-1 detektiert werden (s. Abb. 77).

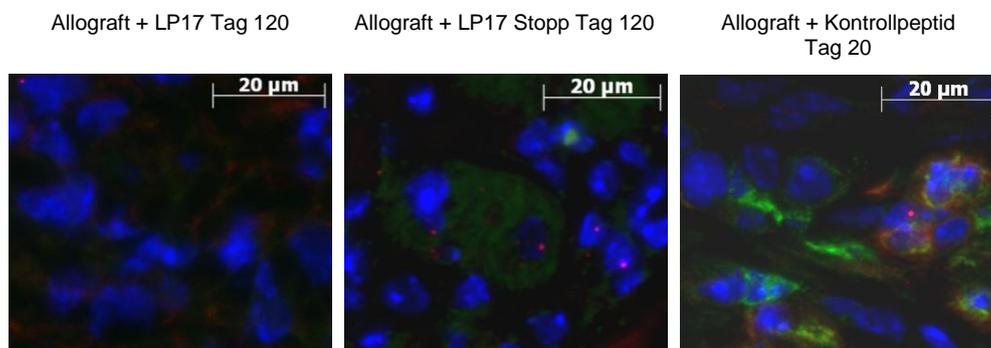


Abb. 77: Doppelfluoreszenzfärbung der CD11b⁺ TREM-1⁺ Zellen bei initialer und kontinuierlicher TREM-1 Inhibition.

Repräsentative Färbungen von Herztransplantaten an Tag 20 und 120 zeigen TREM-1⁺ Zellen in rot, CD11b⁺ Zellen in grün, Zellkerne in blau (Hoechst). Im Allograft an Tag 20 mit Kontrollpeptid-Behandlung konnte eine vermehrte Anzahl an TREM-1⁺ CD11b⁺ Zellen nachgewiesen werden. Diese waren an Tag 120 bei initialer (LP17 Stopp), wie auch kontinuierlicher (LP17) Inhibierung von TREM-1 kaum detektierbar ($n = 5$).

3.5.1 *Auswirkungen einer initialen Inhibierung von TREM-1 auf die adaptive Immunantwort*

Es konnte beobachtet werden, dass eine Blockierung von TREM-1 in der initialen Phase der angeborenen Immunantwort ausreichend ist, um das Überleben der allogenen Transplantate zu sichern. Im Folgenden sollte geklärt werden, ob im langfristigen Verlauf der chronischen Abstoßungsreaktion die Immunantwort der T Lymphozyten durch eine frühe Inhibierung von TREM-1 beeinflusst wird.

Für die Analyse der Infiltration von T Zellen wurden an Tag 20 (Behandlung der Rezipienten mit dem Kontrollpeptid) und Tag 120 (kontinuierliche oder initiale LP17 Behandlung der Empfängertiere) Donorherzen entnommen und Gewebeschnitte angefertigt. Die repräsentativen Myokardschnitte zeigten eine Reduktion der infiltrierenden CD4⁺ und CD8⁺ Zellen bei initialer (LP17 Stopp) oder kontinuierlicher (LP17) Inhibierung von TREM-1, im Vergleich zur Kontrollpeptid-behandelten Gruppe an Tag 20. Außerdem konnte, wie bei den CD11b⁺ Zellen, ein geringer Anstieg der CD4⁺ T Lymphozyten nach absetzen der TREM-1 Inhibition detektiert werden. Die Infiltration von CD8⁺ T Zellen wurde in beiden Gruppen unter Inhibierung von TREM-1 signifikant gehemmt (s. Abb. 78-80).

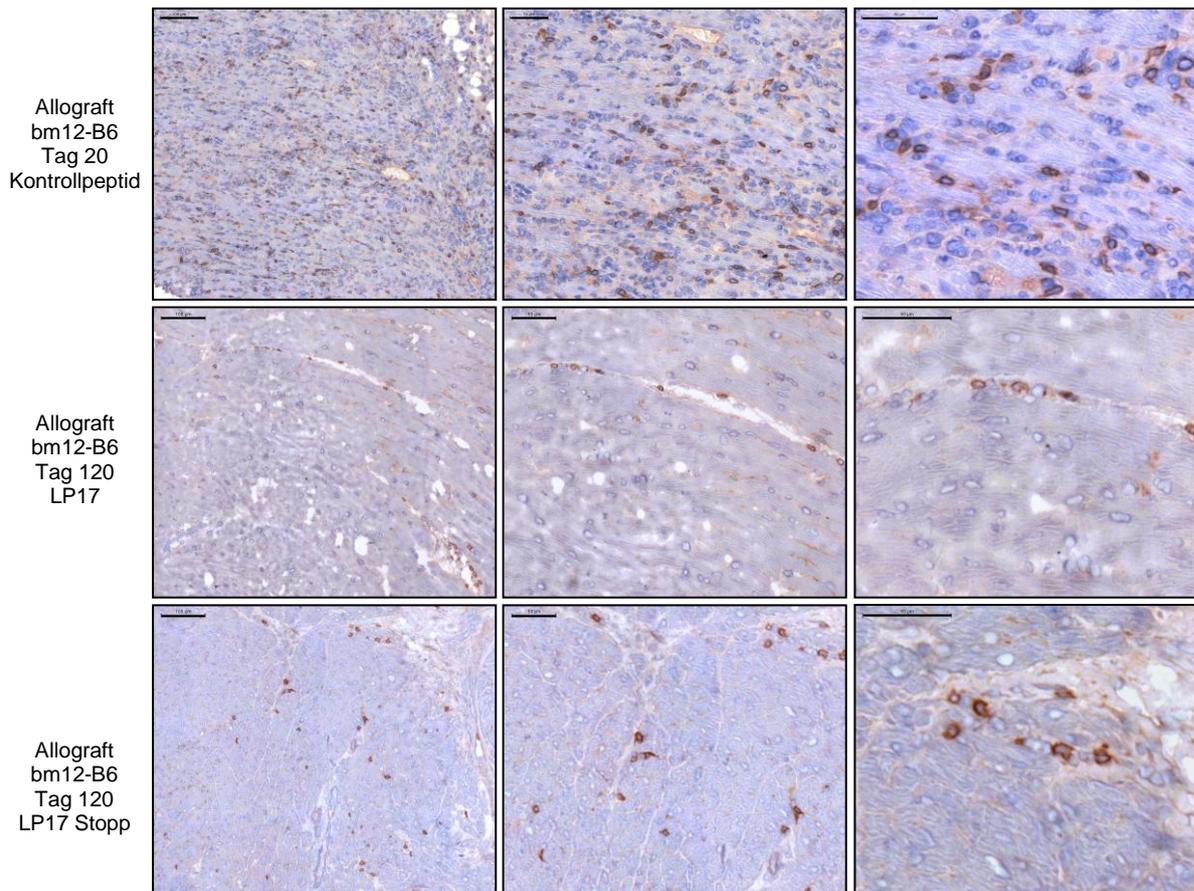


Abb. 78: Immunhistologie von CD4⁺ T Zellen bei initialer und dauerhafter Blockade von TREM-1.

Repräsentative Gewebeschnitte von CD4⁺ T Zellen an Tag 20 und 120 nach Organtransplantation unter Inhibition von TREM-1. Es zeigt sich eine verminderte Infiltration CD4⁺ T Lymphozyten bei initialer (LP17 Stopp) oder kontinuierlicher (LP17) Inhibierung von TREM-1 im Vergleich zu einer Behandlung der Rezipienten mit dem Kontrollpeptid bis Tag 20 *post transplantationem* ($n = 5$; Messbalken: linke Spalte, 100 μm ; mittlere und rechte Spalte, 50 μm).

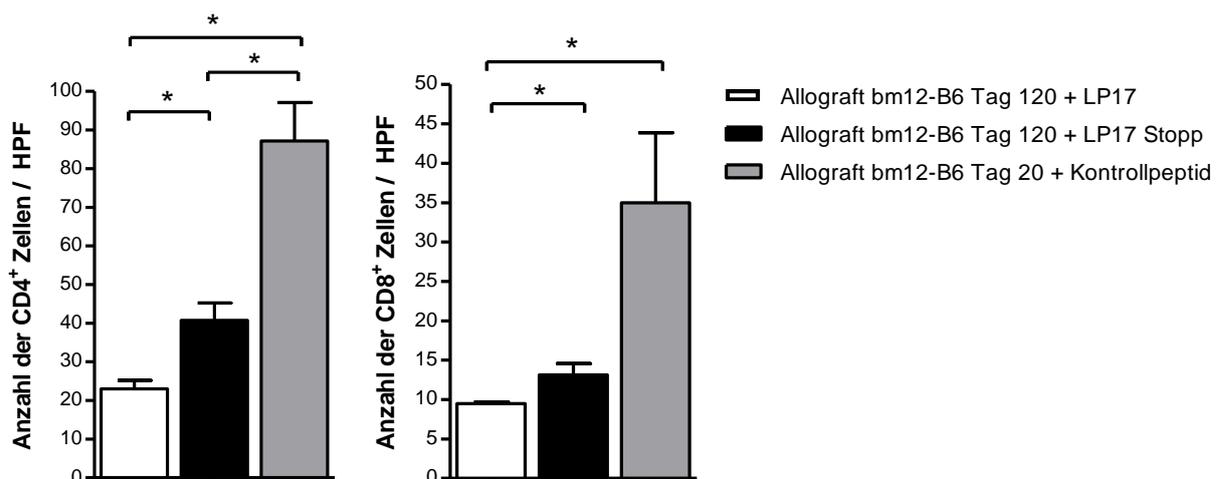


Abb. 79: Anzahl der CD4⁺ und CD8⁺ T Zellen bei einer initialen und kontinuierlichen Hemmung von TREM-1.

T Lymphozyten wurden mittels immunohistochemischer Färbung von allogenen Transplantaten an Tag 20 und 120 pro Gesichtsfeld (HPF) ausgezählt. Die Grafik zeigt, dass eine initiale (LP17 Stopp) und kontinuierliche (LP17) Inhibierung von TREM-1 zu einer verminderten Infiltration der CD4⁺ und CD8⁺ T Zellen führt, im Vergleich zu der Kontrollpeptid-behandelten Gruppe ($n = 3$ bis 5 , \pm SEM; $*p \leq 0,05$).

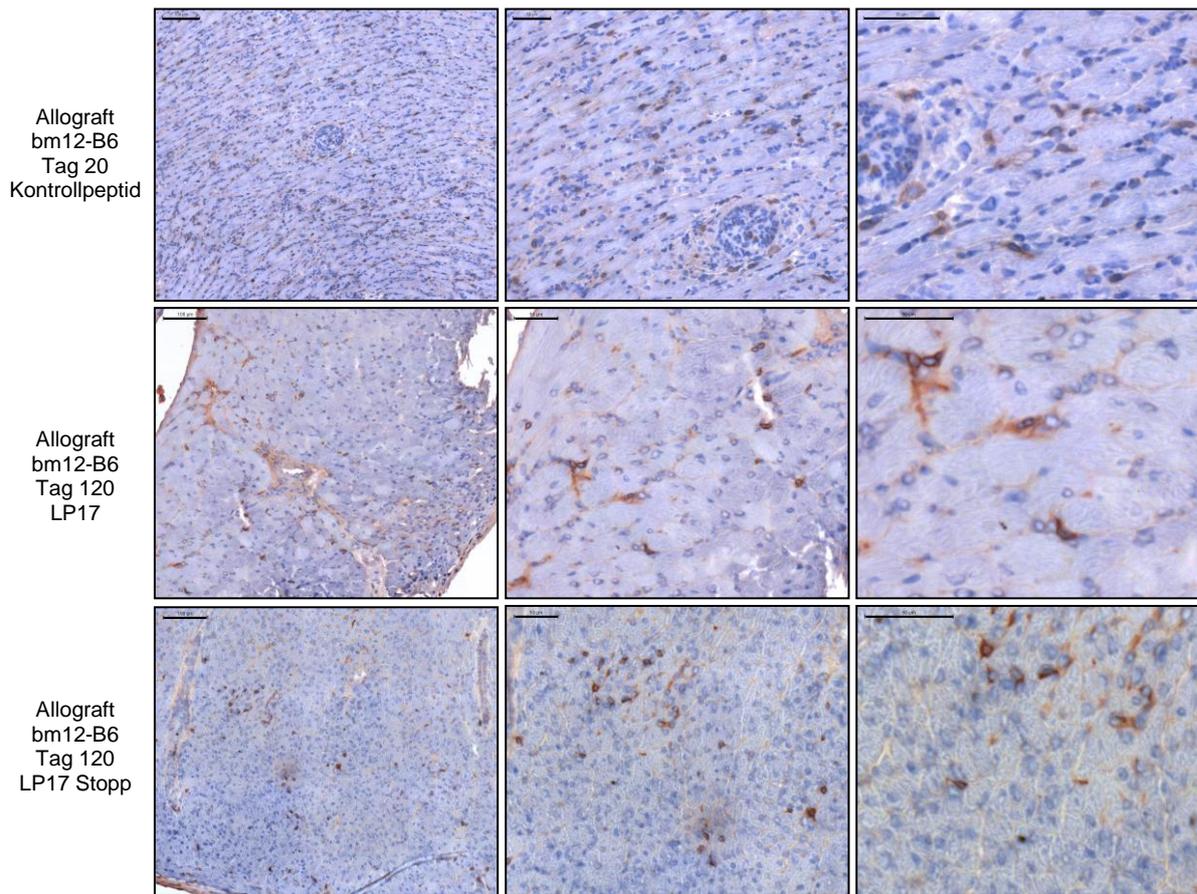


Abb. 80: CD8⁺ T Zellinfiltrate in der chronischen Abstoßungsreaktion unter initialer und dauerhafter Hemmung von TREM-1.

Exemplarisch dargestellte Gewebeschnitte von isolierten allogenen Transplantaten an Tag 20 und 120. Es zeigt sich eine Reduktion der CD8⁺ Zellen bei initialer (LP17 Stopp) und kontinuierlicher (LP17) Hemmung von TREM-1, im Vergleich zu der Kontrollgruppe an Tag 20 ($n = 5$; Messbalken: linke Spalte, 100 µm; mittlere und rechte Spalte, 50 µm).

Interessanterweise, zeigten CD4⁺ T Lymphozyten im Bezug auf die Zytokinexpression einen verminderten IL-17A und IFN γ Spiegel unter kontinuierlicher Hemmung von TREM-1 im Vergleich zu einer initialen Blockade von TREM-1 (s. Abb. 81).

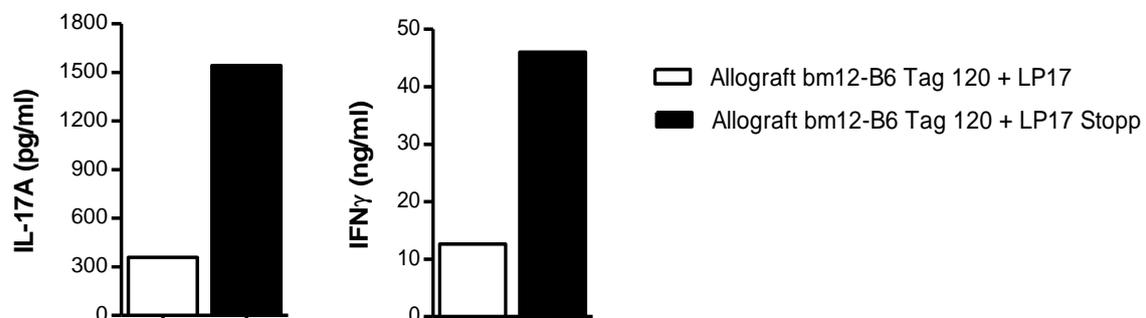


Abb. 81: IL-17A und IFN γ Expression von CD4⁺ Zellen während initialer (LP17 Stopp) oder kontinuierlicher (LP17) Inhibierung von TREM-1 im Verlauf der chronischen Abstoßungsreaktion.

Im Verlauf einer initialen Blockade von TREM-1 zeigt sich eine reduzierte Expression der Zytokine IL-17A und IFN γ von CD4⁺ Zellen nach Organtransplantation. Für die Auswertung wurden CD4⁺ Zellen aus drei allogenen transplantierten Donorherzen an Tag 120 isoliert und gepoolt, für 48 h inkubiert und der Überstand mittels ELISA gemessen.

Wie bereits erwähnt, markiert Ki67 ein proliferationsabhängiges Antigen. Die Untersuchung des Proliferationsverhaltens von infiltrierenden CD4⁺ Zellen im Verlauf einer frühen oder dauerhaften Blockade von TREM-1 zeigte keinen Unterschied. Wird die Proliferation aber mit den allogenen CD4⁺ Zellen an Tag 20 nach Organtransplantation verglichen, so findet sich in beiden Gruppen eine signifikante Verringerung proliferierender CD4⁺ T Zellen (s. Abb. 82).

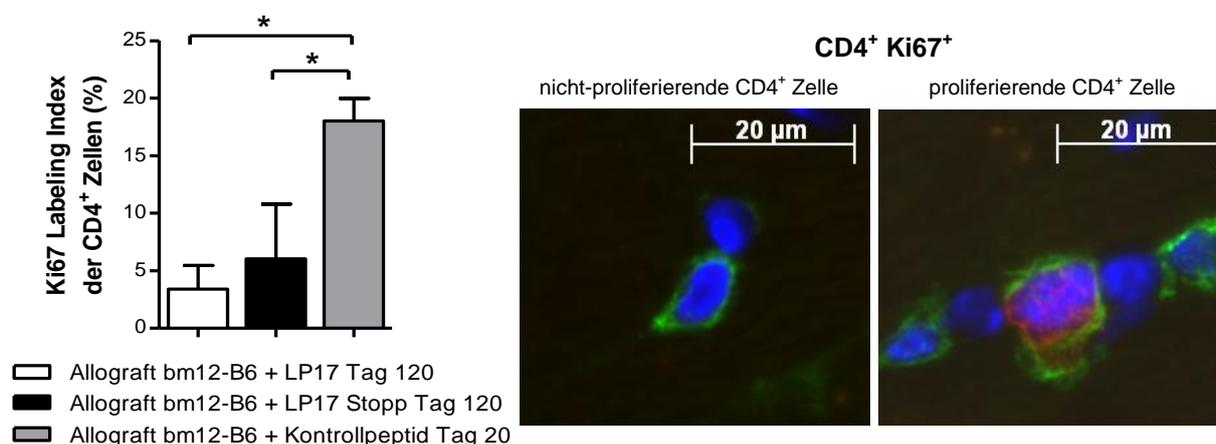


Abb. 82: Proliferationsindex der CD4⁺ Ki67⁺ Zellen bei initialer und dauerhafter TREM-1 Inhibierung.

Die Darstellung des Ki67 Labeling Index an Tag 120 zeigt zwischen einer frühen und kontinuierlichen TREM-1 Blockierung keinen Unterschied. Im Vergleich zu einem allogenen Setting an Tag 20 hingegen, konnte ein signifikanter Anstieg des Ki67 Labeling Indizes gezeigt werden ($n = 3$; \pm SEM; $*p \leq 0,05$). Gewebeschnitte von Transplantaten an Tag 120 wurden mit einem α CD4 (grün) und α Ki67 (rot) Antikörper gefärbt. Die Kern-Gegenfärbung wurde mit Hoechst (blau) durchgeführt. Die repräsentativen Bilder zeigen ein Beispiel nicht-prolierender und prolierender CD4⁺ Zellen.

3.6. TREM-1 in der akuten Transplantatabstoßung

In der vorliegenden Studie sollte TREM-1 nicht nur im chronischen Modell, sondern auch im akuten Verlauf einer Herztransplantatabstoßung untersucht werden. Dazu wurden Balb/c Spenderherzen heterotop in B6 Mäuse transplantiert. Durch den kompletten MHC-Mismatch in diesem Transplantationsmodell wurde eine starke Alloreaktion provoziert, die zu einer Abstoßung des transplantierten Organs mit einer MST von 8 Tagen führte (s. Abb. 83). Die histo-morphologischen Untersuchungen zeigen an Tag 4 eine zelluläre Infiltration mit einer angehenden Schädigung der Gefäßendothelzellen. Das Versagen des transplantierten Organs konnte an Tag 7 durch einen luminalen Verschluss der Gefäße bei starker zellulärer Infiltration nachgewiesen werden (s. Abb. 84 und 85).

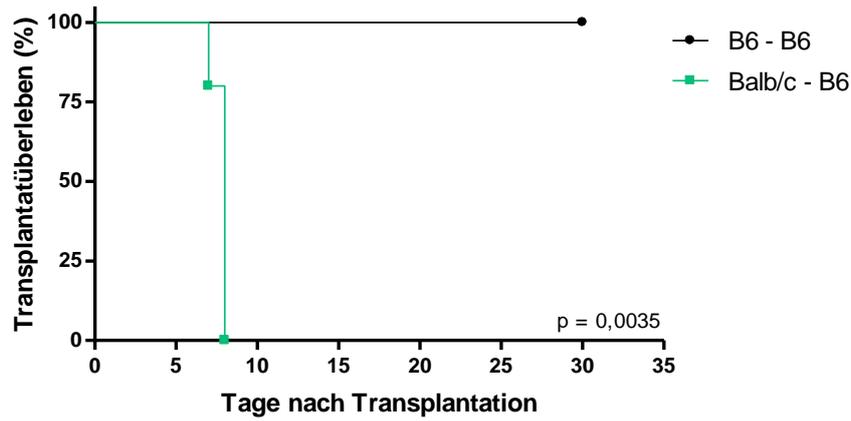


Abb. 83: Transplantatfunktion nach akuter Abstoßungsreaktion.

Mittels Palpation konnte das Überleben der Transplantate bestimmt werden und zeigt eine dauerhafte Akzeptanz der Transplantate im syngenem Transplantationsmodell (-●-; $n = 5$). Balb/c Herzen, die in B6 Empfänger transplantiert wurden, waren nach spätestens 8 Tagen komplett abgestoßen (-■-; $n = 5$). Überlebensdaten werden als Kaplan-Meier Plot dargestellt.

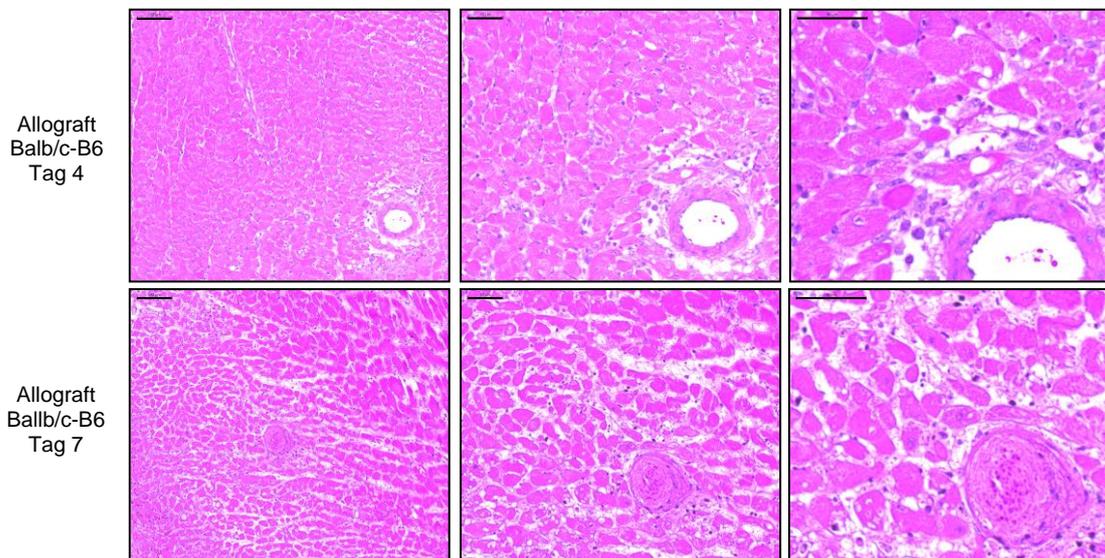


Abb. 84: Histologische Darstellung der Herzen nach akuter Abstoßungsreaktion.

Die histologische Darstellung zeigt eine zunehmende Leukozyteninfiltration bei akuter Abstoßungsreaktion. Außerdem konnte ein luminaler Gefäßverschluss und einen parenchymalen und vaskulären Schaden des transplantierten Organs an Tag 7 im Vergleich zu Tag 4 *post transplantationem* festgestellt werden. Die gefärbten Myokardschnitte repräsentierten ein Transplantat aus einer Gruppe von $n = 5$ Tieren (Messbalken: linke Spalte, 100 μm ; mittlere und rechte Spalte, 50 μm).

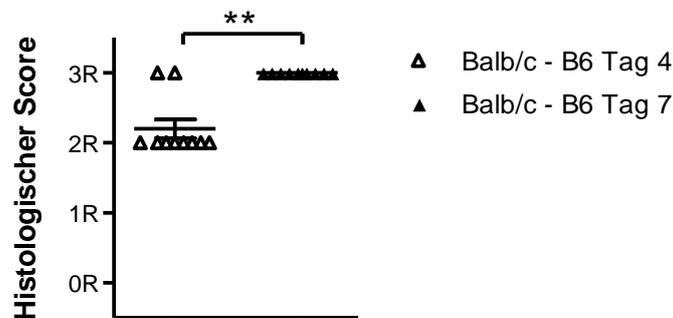


Abb. 85: Histologisches Scoring im Verlauf einer akuten Abstoßungsreaktion nach Herztransplantation.

Die quantitative Auswertung der Histologie zeigt einen signifikanten Unterschied im histologischen Score zwischen Tag 4 und 7 der akuten Abstoßungsreaktion ($n = 10$, \pm SEM; $**p < 0,001$).

Da TREM-1 auch in akuten Entzündungsreaktionen beschrieben wurde (62, 72), erfolgte die Analyse der TREM-1⁺ Zellen auch während einer akuten Abstoßungsreaktion nach Herztransplantation. An Tag 4 und 7 *post transplantationem* zeigte sich ein progredienter Anstieg der TREM-1⁺ Zellen in den allogenen Transplantaten (s. Abb. 86 und 87).

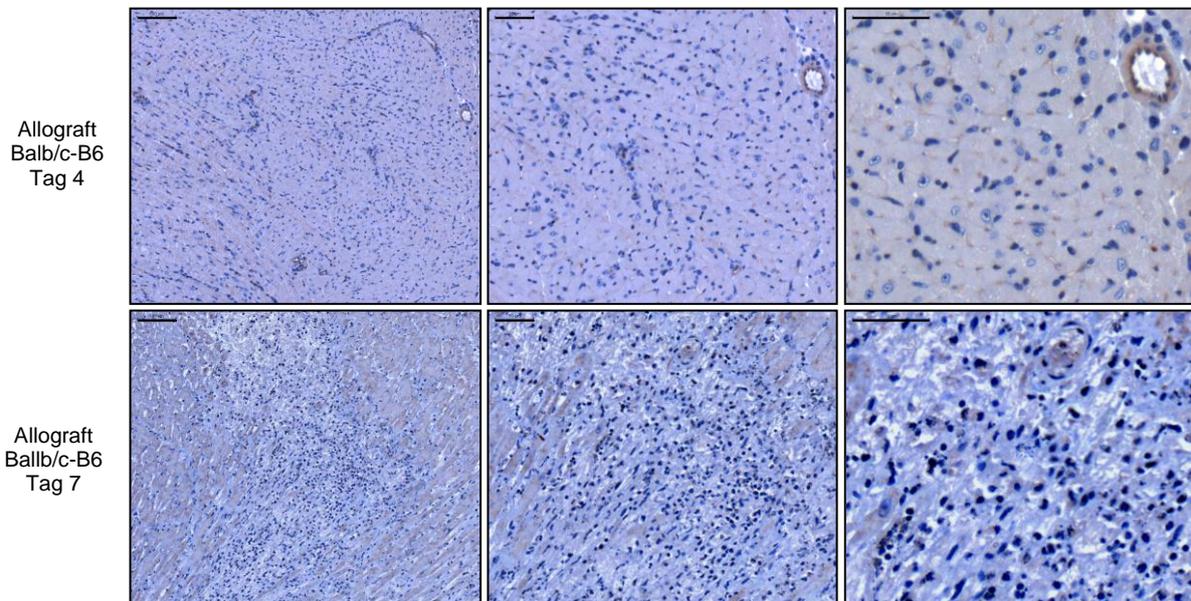


Abb. 86: Infiltration von TREM-1⁺ Zellen während der akuten Transplantatabstoßung.

Gezeigt werden TREM-1⁺ Zellen nach immunhistologischer Färbung von Gewebeschnitten ($n = 5$) einer allogenen akuten Transplantatabstoßung an Tag 4 und 7. TREM-1⁺ Zellen zeigen sich erhöht an Tag 7 *post transplantationem* (Messbalken: linke Spalte, 100 µm; mittlere und rechte Spalte, 50 µm).

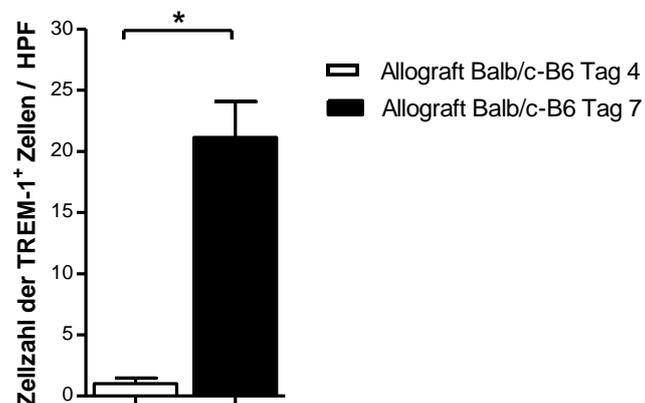


Abb. 87: Anzahl der TREM-1⁺ Zellen in der murinen akuten Abstoßungsreaktion.

Nach Färbung der Gewebeschnitte wurden die TREM-1⁺ Zellen pro Gesichtsfeld (HPF) gezählt und zeigen, im Vergleich zu der allogenen Abstoßung an Tag 4, einen stark signifikanten Anstieg an Tag 7 im Allograft (Balb/c-B6; $n = 5$, \pm SEM; $*p \leq 0,05$).

3.6.1 Blockade von TREM-1 im Verlauf einer subakuten Abstoßung ist insuffizient für das Überleben der Transplantate

Die Inhibierung von TREM-1 in der chronischen Abstoßungsreaktion führt zu einem Überleben der transplantierten Herzen. Da TREM-1⁺ Zellen auch in der akuten Transplantat-

abstoßung detektiert werden konnten, wurde in diesem Kapitel die Rolle von TREM-1 im Bezug auf eine etwaige Regulation des akuten Abstoßungsverhaltens genauer betrachtet. Ab Tag -1 vor Herztransplantation wurde den Rezipienten LP17 und das Kontrollpeptid verabreicht, jedoch konnten keine Verlängerung der Transplantatfunktion gezeigt werden (s. Abb. 88).

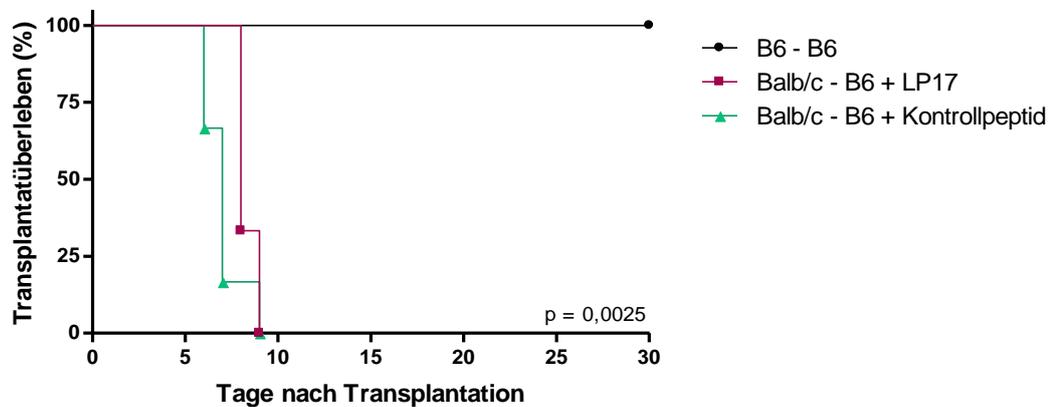


Abb. 88: Transplantatfunktion in der akuten Abstoßung bei Inhibierung von TREM-1.

Mit Hilfe der Fingerpalpation wurde das Überleben der Transplantate überwacht und zeigte bei syngener Transplantation eine vollständige Akzeptanz (-●-; $n = 5$). Die Blockade von TREM-1 verlängerte nicht das Überleben allogener Herzen (-■-; MST: 8 Tage; $n = 6$). Bei Tieren, die mit dem Kontrollpeptid behandelt wurden zeigte sich eine MST von 7 Tagen (-▲-; $n = 6$). Überlebensdaten werden als Kaplan-Meier Plot dargestellt.

Um die Rolle von TREM-1 im Verlauf einer Abstoßungsreaktion mit kompletten MHC-Mismatch dennoch genauer analysieren zu können, wurde ein Herztransplantationsmodell mit subakutem Abstoßungsverhalten gewählt. Dafür erfolgte die Transplantation von Balb/c Donorherzen heterotop in Rag1^{-/-} Empfängertiere. Anschließend wurden die Rezipienten an Tag 3 *post transplantationem* mit 5×10^6 CD3⁺ Zellen *i.p.* rekonstituiert. Ab Tag 3 wurden die Rezipienten kontinuierlich mit LP17 oder dem Kontrollpeptid *i.p.* behandelt. Im Verlauf der subakuten Abstoßungsreaktion zeigte sich ein Überleben der Transplantate unter Inhibierung von TREM-1 bis zu 70 Tagen, jedoch fand sich auch ein Transplantatfunktionsverlust von etwa 70%. Bei einer Behandlung der Rezipienten mit dem Kontrollpeptid ergab sich ein Abstoßungsverhalten der Donorherzen mit einer von MST 24 Tagen. Die unbehandelte Kontrollgruppe zeigte ein MST von 21 Tagen (s. Abb. 89).

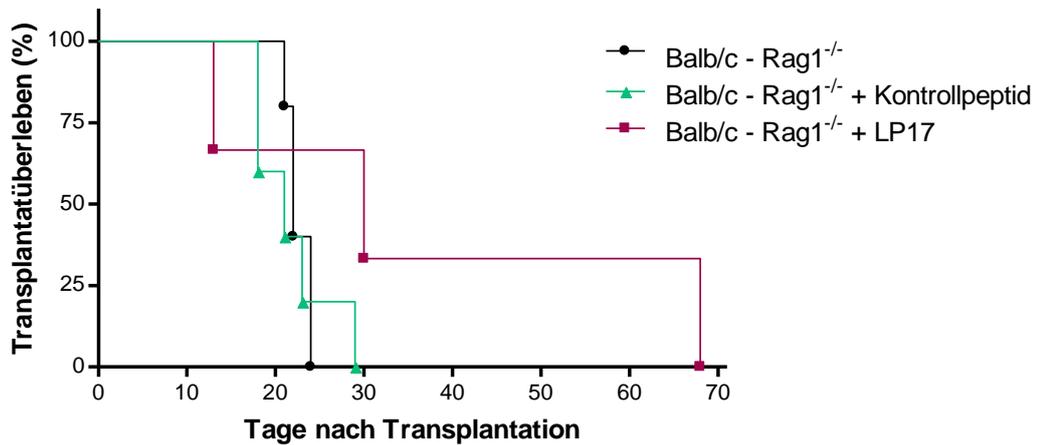


Abb. 89: Transplantatfunktion in der subakuten Abstoßung bei Blockade von TREM-1.

Das Überleben der Herztransplantate von Balb/c Spendertieren wurde palpatorisch in Rag1^{-/-} Rezipienten überwacht. An Tag 3 erfolgte die Injektion von 5×10^6 CD3⁺ Zellen bei gleichzeitiger Behandlung der Rezipienten mit LP17 oder dem Kontrollpeptid. Durch die Hemmung von TREM-1 konnte ein verlängertes Überleben der Transplantate beobachtet werden (Syngen -●-, MST: 22 Tage; Allogen + Kontrollpeptid -▲-, MST: 21 Tage; Allogen + LP17 -■-, MST: 30 Tage; $n = 5$ bis 6). Überlebensdaten werden als Kaplan-Meier Plot dargestellt.

Die histo-morphologische Untersuchung zeigte bei den Kontrolltieren eine perivaskuläre Infiltration von Zellen, die von einem parenchymalen und vaskulärem Schaden des Organs begleitet wurde. Bei einer Inhibierung von TREM-1 waren diese Abstoßungscharakteristika nur gering ausgeprägt (s. Abb. 90 und 91). Eine Fibrogenese mit konsekutivem fibrotischen Organumbau konnte durch eine Blockade von TREM-1 im subakuten Abstoßungsverlauf unterbunden werden (s. Abb. 92 und 93).

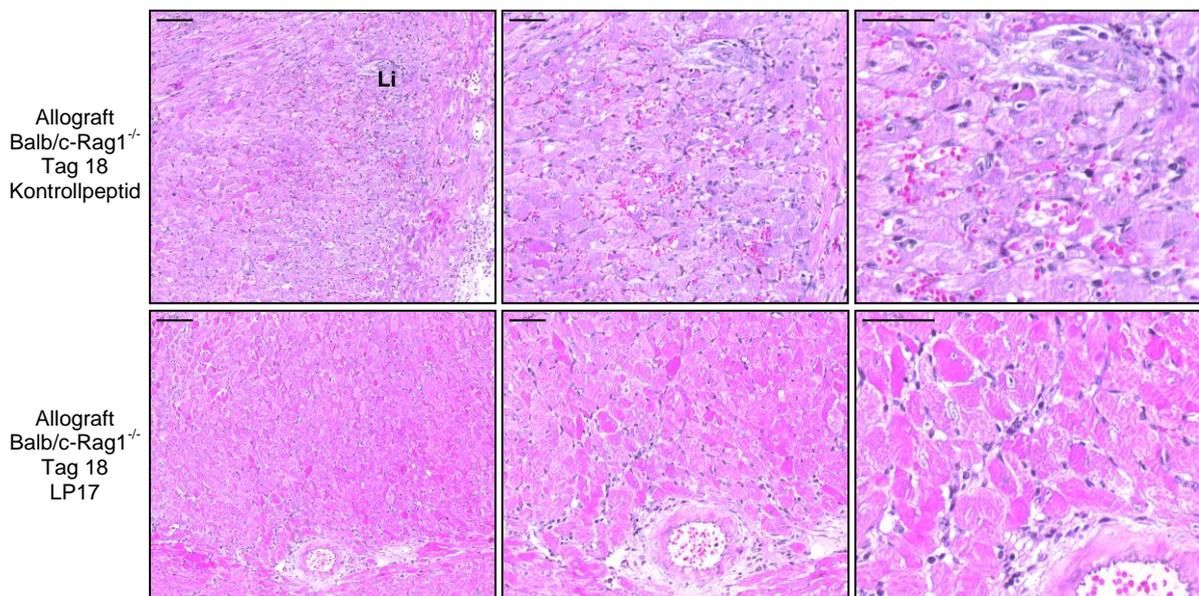


Abb. 90: Histologie der subakuten Abstoßungsreaktion bei TREM-1 Inhibition.

Die ausgewählten Färbungen zeigen Allografts an Tag 18 nach akuter Abstoßungsreaktion. Es kommt zu einer vermehrten perivaskulären Infiltration von Zellen (Li) mit vaskulärem und parenchymalen Schaden des Organs und lumenalem Verschluss der Gefäße während der Behandlung der Rezipienten mit dem Kontrollpeptid, im Vergleich zu einer Behandlung der Empfängertiere mit LP17. Die gefärbten Myokardschnitte repräsentierten ein Transplantat aus einer Gruppe von $n = 5$ Tieren (Messbalken: linke Spalte, 100 μ m; mittlere und rechte Spalte, 50 μ m).

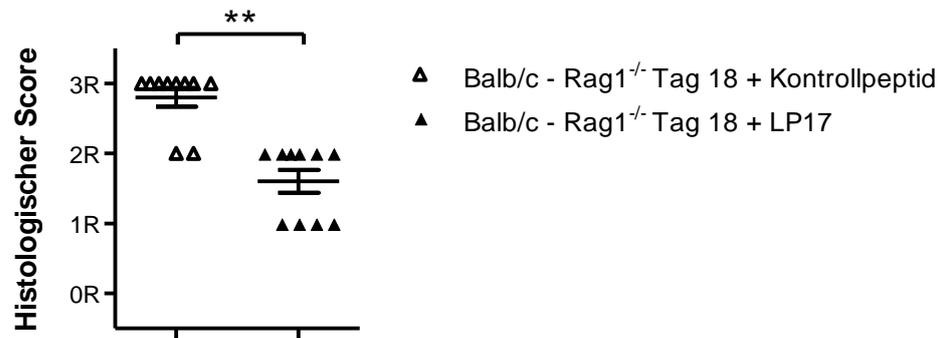


Abb. 91: Histologischer Score in der subakuten Abstoßungsreaktion.

Die quantitative Auswertung der Histologie zeigt einen geringeren Histoscore durch eine Behandlung der Empfängertiere mit LP17, im Vergleich zu einer Behandlung mit dem Kontrollpeptid bis zu Tag 18 *post transplantationem* ($n = 10$; \pm SEM; $**p < 0,001$).

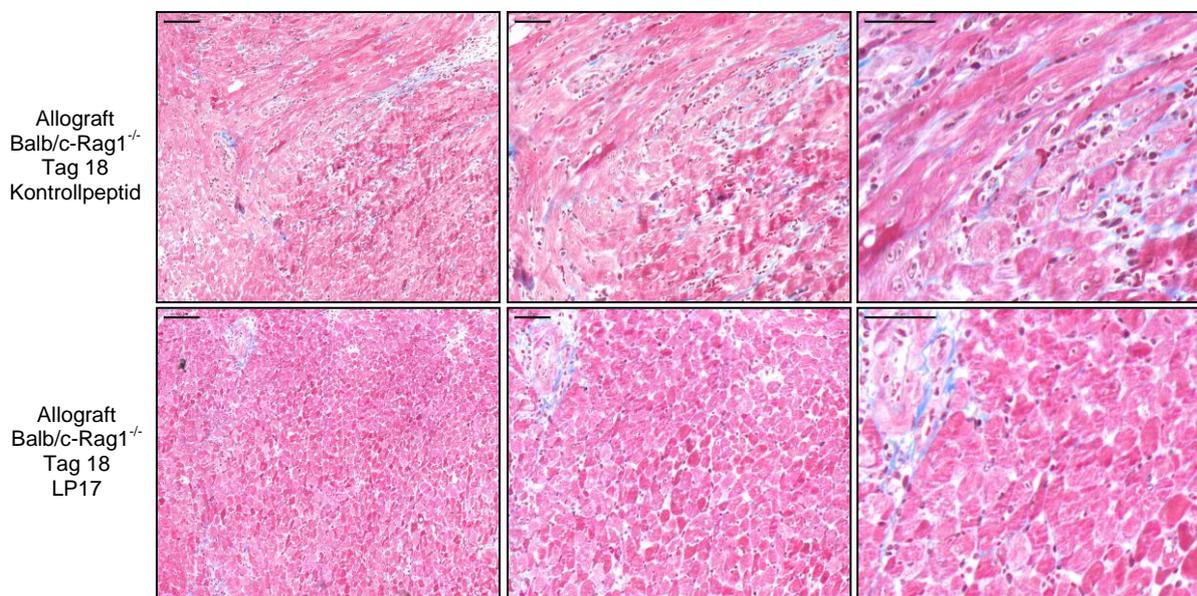


Abb. 92: Kollageneinlagerung in der subakuten Abstoßungsreaktion während Inhibierung von TREM-1.

Repräsentative Gewebeschnitte zeigen eine reduzierte Ausprägung der Organfibrose unter Blockade von TREM-1 während einer subakuten Abstoßungsreaktion ($n = 5$; Messbalken: linke Spalte, 100 μ m; mittlere und rechte Spalte, 50 μ m; Kollagenfasern in blau).

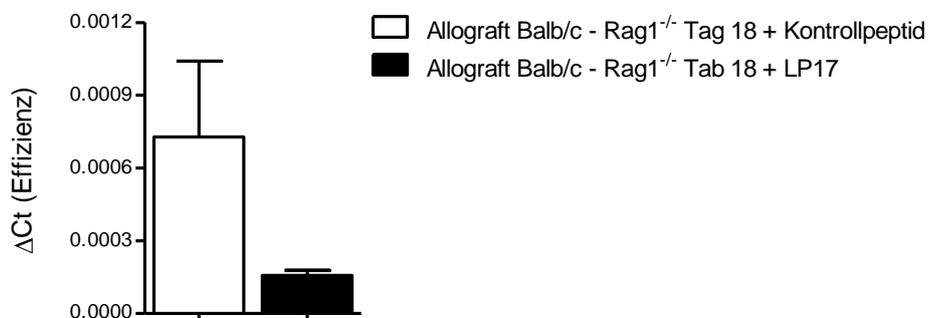


Abb. 93: Kollagenexpression an Tag 18 nach subakuter Abstoßungsreaktion.

Eine Inhibierung von TREM-1 führt zu einer Reduktion von Kollagen während einer subakuten Abstoßungsreaktion der Herzen. Messung von *collagen type I* mit qPCR ($n = 5$, \pm SEM).

Eine Analyse der zellulären Infiltrate ergab eine signifikante Verminderung der TREM-1⁺ und CD11b⁺ Zellen durch eine Behandlung der Rezipienten mit LP17 (s. Abb. 94-96). Somit könnte die Hemmung des angeborenen Immunsystems über TREM-1 auch in der subakuten Abstoßungsreaktion eine wichtige Rolle spielen.

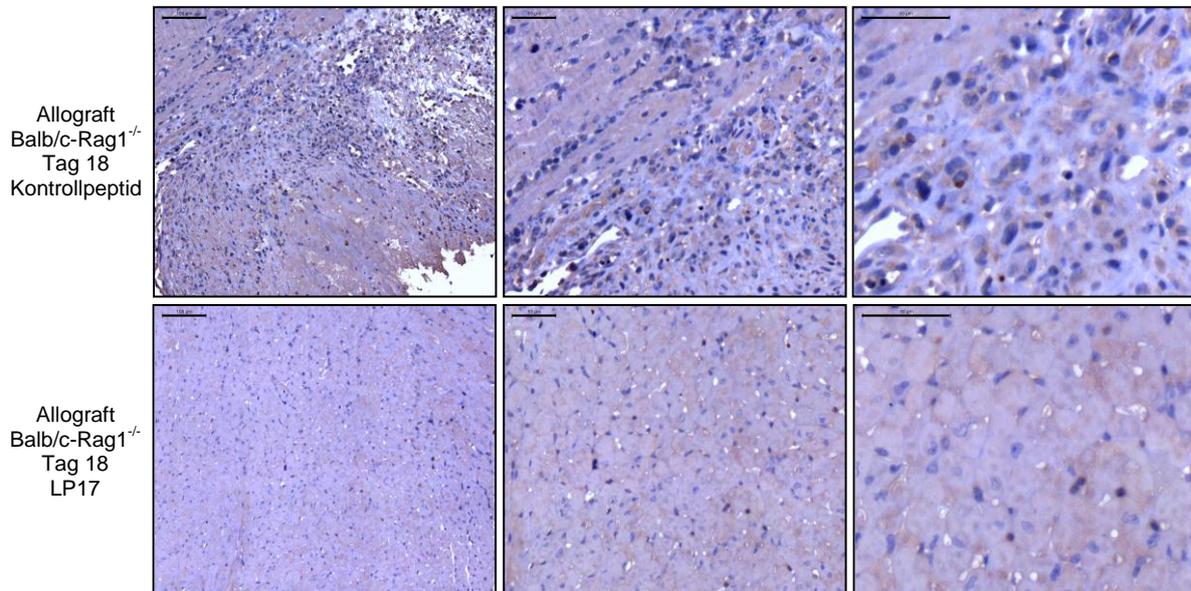


Abb. 94: Infiltration von TREM-1⁺ Zellen in Donorherzen während der subakuten Abstoßungsreaktion bei Behandlung der Rezipienten mit LP17.

Balb/c Herzen wurden heterotop in Rag1^{-/-} Empfänger transplantiert und an Tag 3 wurden die Rezipienten mit 5×10^6 CD3⁺ Zellen behandelt. Die kontinuierliche Inhibierung von TREM-1 führte zu einem starken Rückgang der TREM-1⁺ Zellen im Allograft, im Vergleich zur Kontrolle ($n = 5$; Messbalken: linke Spalte, Messbalken: linke Spalte, 100 µm; mittlere und rechte Spalte, 50 µm).

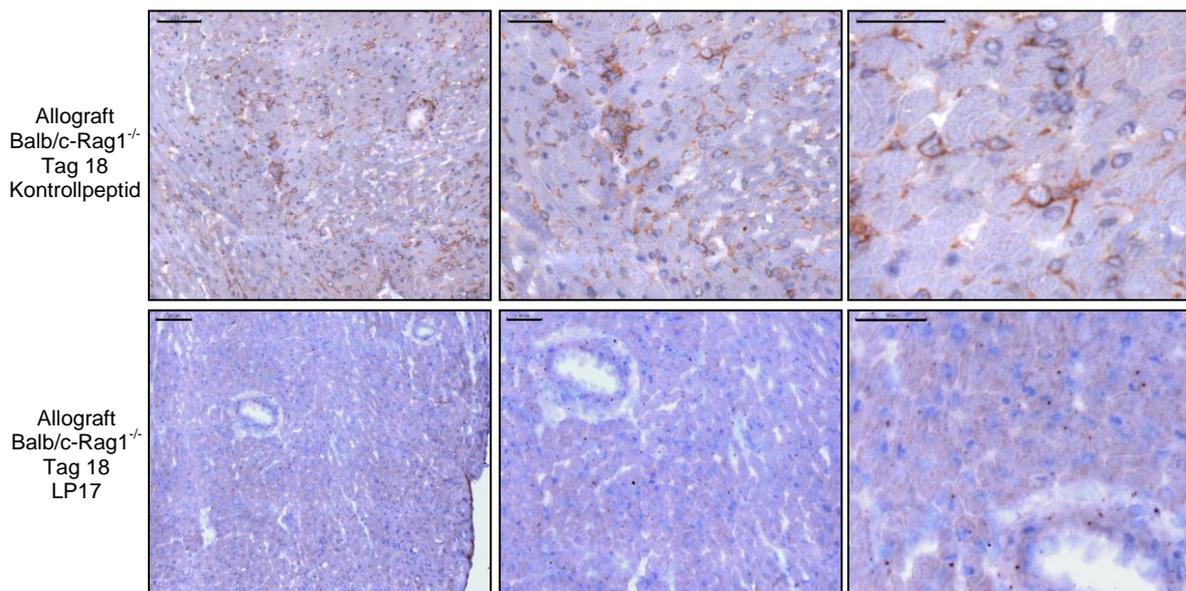


Abb. 95: Infiltration der CD11b⁺ Zellen in der subakuten Abstoßung während der Inhibierung von TREM-1.

Gezeigt werden Färbungen CD11b⁺ Zellen von repräsentativen Gewebeschnitten ($n = 5$) einer subakuten Transplantatabstoßung an Tag 18 unter Inhibierung von TREM-1. Empfänger wurden an Tag 3 mit 5×10^6 CD3⁺ Zellen behandelt. Die Histologie zeigt eine deutliche Verminderung der CD11b⁺ Zellen unter Hemmung von TREM-1 (Messbalken: linke Spalte, 100 µm; mittlere und rechte Spalte, 50 µm).

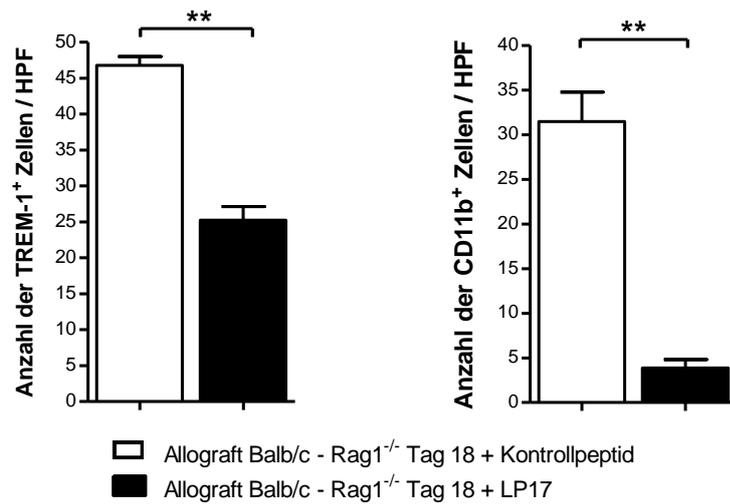


Abb. 96: Anzahl der TREM-1⁺ und CD11b⁺ Zellen bei Behandlung der Rezipienten mit LP17.

Quantitative Auszählung der Myokardschnitte von TREM-1⁺ und CD11b⁺ Zellen. Es zeigt sich eine signifikante Verminderung der TREM-1⁺ und CD11b⁺ Zellen unter Behandlung der Rezipienten mit LP17 an Tag 18 nach Organtransplantation und im Vergleich zu der Kontrollgruppe ($n = 5$, \pm SEM; ** $p < 0,001$).

Um, wie im chronischen Transplantationsmodell, auch im subakuten Transplantationsmodell die Infiltration von CD4⁺ und CD8⁺ T Lymphozyten zu untersuchen, wurden Myokardschnitte der Balb/c Donorherzen mit einem α CD4 und α CD8 Antikörper gefärbt. Die quantitative Auszählung ergab eine reduzierte Infiltration von CD4⁺ Zellen bei Hemmung von TREM-1. Interessanterweise, blieb die Anzahl der CD8⁺ Zellen unverändert (s. Abb 97-99).

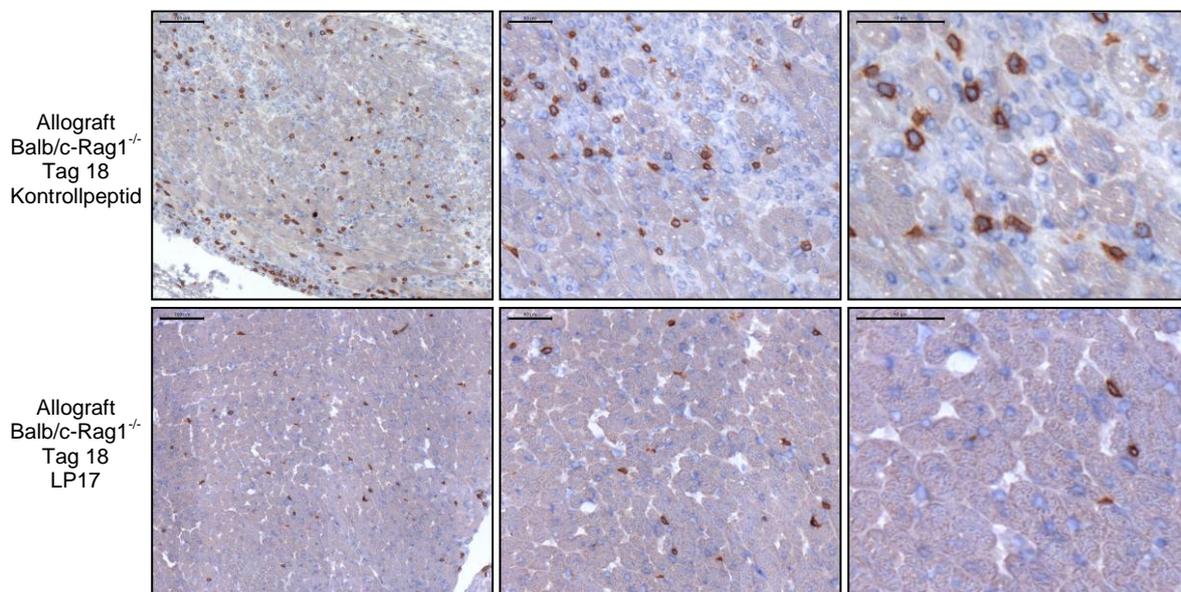


Abb. 97: CD4 Immunhistologie von Herzen nach subakuter Abstoßungsreaktion und Hemmung von TREM-1.

Infiltrierende CD4⁺ Zellen in exemplarisch dargestellten Gewebeschnitten nach Herztransplantation von Balb/c Donorherzen in Rag1^{-/-} Empfängertiere an Tag 18. Rezipienten wurden an Tag 3 *post transplantationem* mit 5×10^6 CD3⁺ Zellen *i.p.* behandelt. Die Histologie zeigt eine deutliche Verminderung der CD4⁺ Zellen bei Hemmung von TREM-1 ($n = 5$; Messbalken: linke Spalte, 100 μ m; mittlere und rechte Spalte, 50 μ m).

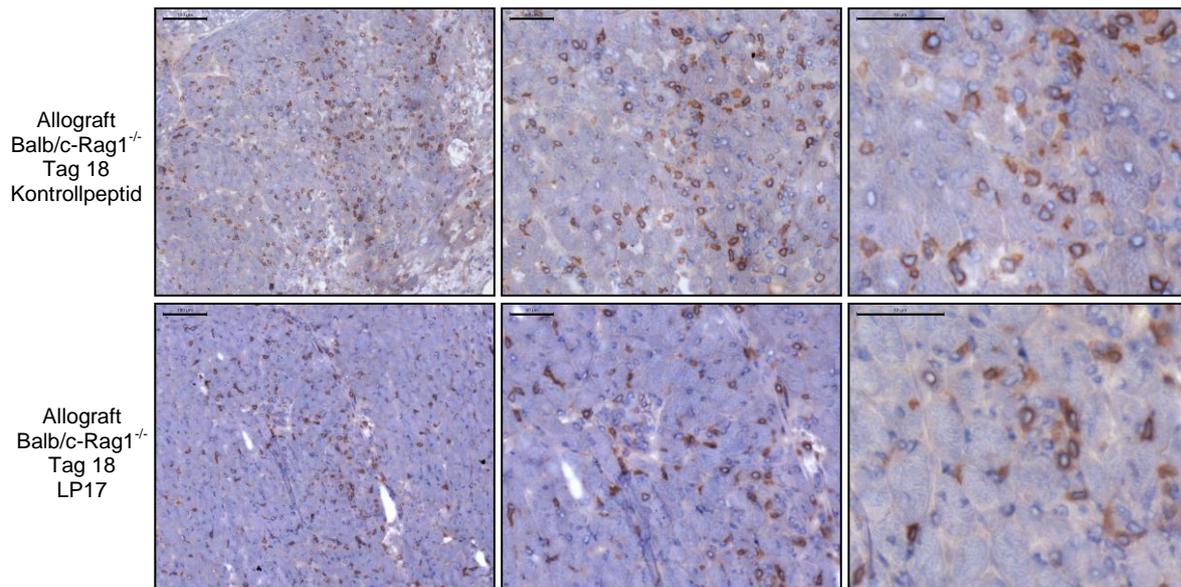


Abb. 98: Immunhistologie von CD8⁺ Zellen während der Inhibierung von TREM-1 in der subakuten Abstoßungsreaktion.

CD8⁺ Zellen wurden in Gewebeschnitten nach Entnahme der Donorherzen an Tag 18 *post transplantationem* histologisch angefärbt. Die repräsentativen Färbungen zeigen jeweils ein Beispiel für ein Allograft bei Behandlung der Empfängertiere mit LP17 oder dem Kontrollpeptid. Rezipienten wurden mit 5×10^6 CD3⁺ Zellen an Tag 3 *i.p.* behandelt. Es konnte kein Unterschied im Infiltrationsverhalten CD8⁺ T Zellen beobachtet werden ($n = 5$; Messbalken: linke Spalte, 100 μm ; mittlere und rechte Spalte, 50 μm).

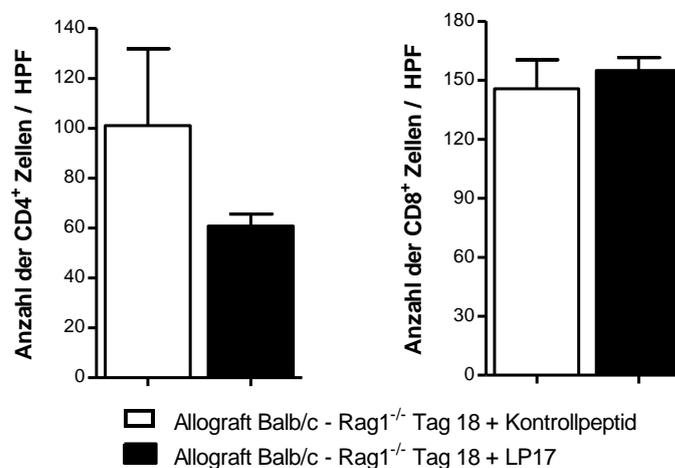


Abb. 99: Infiltration von CD4⁺ und CD8⁺ Zellen in der subakuten Abstoßung bei Blockade von TREM-1.

Rag1^{-/-} Empfängertiere wurde ein Balb/c Donorherz transplantiert und mit 5×10^6 CD3⁺ Zellen an Tag 3 nach Organtransplantation behandelt. Zusätzlich erfolgte eine kontinuierliche Hemmung von TREM-1 im Verlauf der Abstoßungsreaktion. Myokardschnitte wurden pro Gesichtsfeld (HPF) für CD4⁺ und CD8⁺ Zellen ausgezählt. Es zeigt sich eine Verminderung der CD4⁺ während sich die Anzahl der CD8⁺ Zellen nicht verändert ($n = 5$, \pm SEM).

3.7. Zusammenfassung der Ergebnisse

Für eine bessere Übersicht werden im Folgenden die generierten Daten dieser Dissertation zusammengefasst:

Etablierung eines murinen Tiermodells zur Untersuchung des Abstoßungsverhaltens der transplantierten Herzen

- i. Im Verlauf einer murinen chronischen Abstoßungsreaktion zeigt sich eine zelluläre Infiltration und luminaler Verschluss der Gefäße, die einen fibrotischen Organumbau zur Folge haben.
- ii. Die vermehrte Anzahl der CD4⁺ und CD8⁺ Zellen lieferte eine weitere Bestätigung für die ablaufende Abstoßungsreaktion. Die erhöhte Expression von IL-17A und IFN γ CD4⁺ T Lymphozyten sowie der gesteigerte Proliferationsrate, verweisen auf die Aktivierung der adaptiven Immunantwort.

Die angeborene Immunantwort in der chronischen Abstoßungsreaktion

- iii. Die Wichtigkeit des angeborenen Immunsystems in der chronischen Abstoßung konnte durch ein verlängertes Überleben allogener Transplantate in Myd88^{-/-} Rezipienten gezeigt werden.

Determinierung von TREM-1 während der Transplantationsabstoßung

- iv. TREM-1⁺ Zellen konnten im humanem Gewebe nach chronischer Organabstoßung sowie im Verlauf der chronischen und akuten Abstoßungsreaktion in der Maus nachgewiesen werden.
- v. Eine quantitative Auswertung ergab eine signifikante Steigerung der TREM-1⁺ CD11b⁺ APC in murinen Allotransplantaten der Empfängertiere.

Funktionalität von TREM-1

- vi. Eine Hemmung von TREM-1 führte zu einem verlängerten Überleben der Herztransplantate. Dabei zeigten sich eine geringere Infiltration von Zellen und eine verminderte Kollageneinlagerung.
- vii. TREM-1⁺ CD11b⁺ APC wurden *in vitro* bei einer Blockade von TREM-1 in der Anzahl und im Aktivierungsmuster reguliert.
- viii. Es konnte eine zelltoxische Eigenschaft der CD11b⁺ Zellen auf naive CD4⁺ T Lymphozyten beobachtet werden. Eine Behandlung mit klassischen Apoptoseinhibitoren zeigte keinen Effekt.

- ix. Alloreaktive CD4⁺ T Zellen werden durch TREM-1⁺ CD11b⁺ APC in ihrer Differenzierung zu Th1 und Th17 Zellen gefördert und produzieren infolgedessen IL-17A und IFN γ .
- x. In der akuten Transplantatabstoßung zeigt die Blockade von TREM-1 keinen Effekt auf die Transplantatfunktion. Eine Inhibierung von TREM-1 in der subakuten Abstoßungsreaktion hingegen führte zu einem verlängerten Überleben der Transplantate und einer reduzierten Infiltration von TREM-1⁺, CD11b⁺ und CD4⁺ Zellen. Die Anzahl der CD8⁺ T Zellen änderte sich nur wenig.

TREM-1 in der initialen Phase des angeborenen Immunsystems

- xi. Die initiale Inhibierung von TREM-1 in der frühen Immunantwort war ausreichend, um ein langfristiges Überleben der Transplantate zu gewährleisten. Es konnte keine gesteigerte Organfibrose festgestellt werden.
- xii. Im Verlauf der kontinuierlichen Inhibierung von TREM-1 fand sich eine geringe Infiltration CD11b⁺ Zellen in die Transplantate. Nach dem Absetzen der TREM-1 Blockade konnte eine wiederkehrende Einwanderung von CD11b⁺ Zellen beobachtet werden. Dieses Phänomen trat auch bei CD4⁺ und CD8⁺ T Zellen auf. Die Expression der Zytokine IL-17A und IFN γ von CD4⁺ Zellen war bei initialer Hemmung von TREM-1 erhöht.

*Der Weg der Paradoxe ist der Weg zur Wahrheit.
Um die Wirklichkeit zu prüfen, muss man
sie auf dem Seil tanzen lassen.
(Oscar Wilde)*

4. DISKUSSION

In der vorliegenden Studie konnte TREM-1 eine wichtige Funktion in der chronischen Abstoßungsreaktion nach Herztransplantation zugeordnet werden. TREM-1 zeigte sich als ko-stimulatorischer Rezeptor auf CD11b⁺ APC, der über die Produktion von Zytokinen eine Abstoßungsreaktion gegen das Spenderorgan fördern kann. Eine Blockade von TREM-1 führte zu einer Reduktion der infiltrierenden Zellpopulationen und einer verminderten Expression pro-inflammatorischer Zytokine.

Die exakte Pathogenese einer chronischen Abstoßungsreaktion ist noch unklar, zeigt aber eine große Vielfalt an morphologischen Besonderheiten. Im Verlauf einer chronischen Abstoßungsreaktion bildet sich in den koronaren Gefäßen eine Lumeneinengung. Die unterschiedlich starke Verdickung der Intima wird durch die Proliferation von Endothelzellen vermittelt. Ursache für die alloreaktive Reaktion mit konsekutiver Transplantatvaskulopathie ist das Zusammenspiel von APC mit der adaptiven Immunantwort und der Produktion pro-inflammatorischer Zytokine (23-25). Im Laufe einer chronischen Abstoßungsreaktion unterstützt das Spektrum immunologischer Abwehrreaktionen gegen das Spenderorgan neben der Transplantvaskulopathie auch eine Transplantatfibrose. Im Detail wird der Verlauf einer Abstoßungsreaktion durch das angeborene Immunsystem und dessen extrazellulären (z.B. PRR, TLR) und intrazellulären (z.B. Myd88) Faktoren beeinflusst (78). Eine Aktivierung extrazellulärer Strukturen z.B. über PRR fördert intrazelluläre Signalkaskaden, die ihre Funktionalität in einer konsekutiven Steigerung der adaptiven Immunantwort ausüben und z.B. alloreaktive Entzündungsreaktionen im Spenderorgan initiieren können. Weitere extrazelluläre Faktoren des angeborenen Immunsystems, wie z.B. der Rezeptor TREM-1, weisen ko-stimulatorische Funktionen auf. TREM-1 wird auf Monozyten/Makrophagen und DC exprimiert und kann über die Ko-Stimulation des PRR-Signalwegs zu einem 25fachen Anstieg der inflammatorischen Immunantwort führen (45, 56). Verschiedene Studien konnten durch eine Inhibition von TREM-1 positive Effekte während akuter und chronischer

Entzündungsreaktionen nachweisen (72). Jedoch wurde TREM-1 im Verlauf der Abstoßungsreaktion nach Organtransplantation noch keine Funktion zugeordnet.

Primär muss für das Überleben allogener Transplantate eine Inhibierung der adaptiven Immunantwort erfolgen. Dies kann durch verschiedene Immunsuppressiva erreicht werden, zeigt aber in vielen Fällen gravierende Nebenwirkungen für den Patienten. Ein weiterer Ansatzpunkt zur Sicherung der Organfunktion ist die Minderung der angeborenen Immunantwort, getriggert durch APC.

In der vorliegenden Studie wurde ein neues Konzept zur effektiven Hemmung des Abstoßungsprozesses in der Maus getestet. Es basierte auf der Hypothese, dass APC über den Ko-Rezeptor TREM-1 eine Schlüsselfunktion in der Abstoßung des Spenderorgans einnehmen. Ziel war es, über eine Inhibition der TREM-1⁺ APC und der damit reduzierten angeborenen Immunantwort eine Transplantatvaskulopathie und Transplantatfibrose nach Organtransplantation zu unterbinden und so die Transplantatfunktion zu sichern.

4.1. Infiltration alloreaktiver Zellpopulationen im Verlauf der chronischen Abstoßungsreaktion im heterotropen Mausmodell

Tiermodelle bieten die Möglichkeit, *in vitro* gewonnene Forschungsergebnisse in einem komplexen immunologischen System zu testen. Das etablierte murine Herztransplantationsmodell hat diesbezüglich einige Vorteile, wie die Verfügbarkeit genetisch genau definierter Inzuchtlinien, eine relativ hohe Erfolgsquote der Transplantation und die einfache artgerechte Haltung der Versuchstiere. In der vorliegenden Doktorarbeit wurde ein heterotopes Herztransplantationsmodell verwendet. Das originäre Herz hält den Blutkreislauf aufrecht, das transplantierte Herz weist hingegen nur ein Pendelblutvolumen auf und dient der Erforschung immunologischer Phänomene im Verlauf einer Abstoßungsreaktion. Es zeigt sich eine Abweichung von den physiologischen Bedingungen, da das Herz nicht gegen den Blutdruck arbeiten muss. Für die immunologischen Untersuchungen spielt diese Tatsache jedoch nur eine untergeordnete Rolle. Trotz limitiertem Blutfluss in Ventrikel und Vorhöfe des transplantierten Herzens wird das Myokard aufgrund der kontinuierlichen Kontraktionen des Herzmuskels adäquat durchblutet und ist somit dem Immunsystem des Transplantatempfängers ausgesetzt (79).

Das verwendete chronische Transplantationsmodell weist besondere genetische Unterschiede zwischen den beiden Mauspopulationen auf (80). Es handelt sich um ein allogenes Transplantationsmodell mit einem Antigen-Mismatch, der auf eine Abweichung im I-A Locus des MHC-Klasse-II-Komplexes beruht. Dieses Tierversuchsmodell hat den Vorteil, dass es sich in der Zeitspanne der Abstoßungsreaktion durch eine reduzierte Perfusion komprimieren lässt (24). Die Zeichen einer chronischen Abstoßungsreaktion sind so bereits

nach 3-4 Wochen voll ausgeprägt. Die histologischen Charakteristika einer chronischen Transplantatabstoßung wie perivaskuläre Leukozyteninfiltration, vaskulärer und parenchymaler Schaden des transplantierten Organs, gesteigerte Gefäßvaskulopathie und Organfibrose waren nach kompletter wie auch reduzierter Perfusion der Spenderherzen evident, zeigten sich jedoch in der zeitlichen Ausprägung unterschiedlich.

Untersuchungen von T Lymphozyten und deren vielseitigen Effektormechanismen konnten mit Entzündungsreaktionen in verschiedensten Krankheitsbildern aber auch mit Abstoßungsreaktionen nach Organtransplantation in Verbindung gebracht werden. So zeigten viele Studien in dem gewählten chronischen Transplantationsmodell eine starke Infiltration von CD4⁺ und CD8⁺ T Zellen in das Allograft und deren Beteiligung am Abstoßungsprozess (26, 81, 82). Die ablaufende Alloreaktivität konnte auch in der vorliegenden Studie bestätigt werden und äußerte sich zunächst in einer erhöhten absoluten Zellzahl der CD45⁺ Leukozyten im allogenen Transplantat nach Organtransplantation. Detailliertere Untersuchungen der Zellsubpopulationen zeigten eine erhöhte absolute Anzahl von CD4⁺ und CD8⁺ Zellen im Allograft. Überraschend war, dass die relative Verteilung der einzelnen T Zellsubpopulationen keine Veränderung aufwies. Dieses Phänomen wurde auch im Verlauf einer chronischen Abstoßungsreaktion von anderen Arbeitsgruppen aufgezeigt. Hierbei änderte sich in Abhängigkeit von IL-16 oder IL-17 die absolute Zellzahl einzelner T Zell-Subpopulationen im Allograft, während die relative Zellzahl keinen Unterschied aufwies (26, 82). Die Untersuchungen im Rahmen dieser Doktorarbeit und die Beobachtungen in der Literatur lassen darauf schließen, dass bei einer chronischen Abstoßungsreaktion vorrangig die Erhöhung der absoluten Lymphozyten-Zellzahl im Allotransplantat den entzündungsfördernden Faktor darstellt und nicht unbedingt eine Veränderung in der Zusammensetzung der einzelnen Zellsubpopulationen vorhanden sein muss.

4.2. Das therapeutische Potential von Myd88 in der Organtransplantation

TLR gehören zu der Gruppe der PRR und erkennen Pathogen-assoziierte molekulare Strukturen. Sie aktivieren nicht nur eine sofort einsetzende angeborene Immunabwehr, sondern sind zudem in der Lage eine adaptive Immunantwort auszulösen. Bei einer Aktivierung der meisten TLR erfolgt die Signaltransduktion über das Adaptermolekül Myd88 und führt zu einer Produktion pro-inflammatorischer Zytokine und einer Expression kostimulatorischer Moleküle (35, 36). Neben der Verbindung zu den TLR interagiert Myd88 auch mit dem IL-1 und IL-18 Rezeptor (37, 69). Myd88 wird von leukozytären Zellen exprimiert, die in das Spenderorgan infiltrieren und als zentrale Mediatoren eine Abstoßungsreaktion beeinflussen können. Diesbezüglich konnte in einer Studie nach

Nierentransplantation mit chronischer Abstoßungsreaktion die Ausprägung einer Transplantatvaskulopathie durch eine Defizienz von Myd88 verringert werden (38, 39, 83). Eine Defizienz im Adaptermolekül Myd88 könnte auch den Verlauf einer chronischen Abstoßungsreaktion nach Herztransplantation beeinflussen und das Überleben der Transplantate verlängern. Die vorliegenden Ergebnisse dieser Untersuchungen zeigten eine Reduktion der chronischen Abstoßungsreaktion nach Herztransplantation in Myd88^{-/-} Empfänger-tieren. Neben dem verlängerten Überleben der Transplantate konnte auch eine reduzierte Infiltration inflammatorischer Zellen, eine verminderte Ausprägung der Transplantatvaskulopathie und des parenchymalen und vaskulären Schaden des Organs beobachtet werden.

Diese Daten zeigten die Wichtigkeit des angeborenen Immunsystems im Verlauf einer chronischen Abstoßungsreaktion. Eine potentielle Therapie durch eine Inhibition von Myd88 wäre jedoch mit etlichen Schwierigkeiten behaftet, da Myd88 eine entscheidende homöostatische Rolle im angeborenen Immunsystem spielt. Der Einfluss von Myd88 auf die Homöostase multipler Organe konnte in einer Studie nachgewiesen werden. Es wurde in gezeigt, dass Kinder mit einer autosomal rezessive Mutation im Gen Myd88 auch Haut-, Gelenk-, Hirnhautentzündungen und Septikämien aufwiesen, die auf eine Abwehrschwäche des angeborenen Immunsystems zurück zu führen waren (84). Eine präzise Regulation der Aktivität des angeborenen Immunsystems ist daher notwendig, um eine überschießende Immunantwort im Verlauf einer Abstoßungsreaktion zu verhindern. Der Hauptfokus der vorliegenden Dissertation liegt auf der Inhibierung eines ko-stimulatorischen Rezeptors, der auf APC exprimiert wird und an der Regulierung und Vernetzung verschiedenster intrazellulärer Signalkaskaden in der angeborenen Immunantwort beteiligt ist.

4.3. Detektion von TREM-1 im Spenderorgan während einer chronischen Abstoßungsreaktion im Menschen

Bisherige klinische Studien zeigten, dass TREM-1 auf APC in akuten und chronischen Entzündungsreaktionen exprimiert ist (72). So fand sich eine erhöhte Expression von humanem TREM-1⁺ Zellen in Virusinfektionen, Sepsis, akuter Pankreatitis oder rheumatoider Arthritis (60, 61, 64, 85). In der vorliegenden Untersuchung konnte TREM-1 in humanem Gewebe nach Herz- und Nierentransplantationen im Verlauf einer chronischen Abstoßungsreaktion nachgewiesen werden.

Der Mechanismus von TREM-1 zeigt sich in einer Produktion pro-inflammatorischer Zytokine durch Inkubation TREM-1⁺ Zellen mit LPS oder anderen Liganden des TLR Signalwegs (60, 64, 85). Auf humanen Monozyten zeigte eine Stimulation mit LPS oder GM-CSF + IL-4 in Anwesenheit von TREM-1 eine erhöhte Expression der Oberflächenmoleküle CD40, CD86

und MHC-II, die eine Differenzierung der Monozyten in DC zur Folge hatte und TREM-1⁺ Zellen antigen-präsentierende Eigenschaften zuordnen lies (45, 56).

Zusammenfassend kann Ko-Rezeptor TREM-1 auf APC die Aktivität der Immunantwort im Mensch beeinflussen und so aktiv an humanen Entzündungsprozessen teilnehmen. Um die Funktion von TREM-1 genauer analysieren zu können wurden alle fortführenden Untersuchungen im murinen Transplantationsmodell während einer chronischen Abstoßungsreaktion durchgeführt und in den folgenden Kapiteln genauer erläutert.

4.4. Funktion von TREM-1 in murinen Abstoßungsreaktionen nach kardialer Organtransplantation

Die Erkennung von Fremdantigenen durch APC ist essentiell für eine Aktivierung der alloreaktiven Immunantwort von T Zellen. Zusätzlich zu den humanen Studien fanden sich Untersuchungen im Tiermodell, die sich mit den antigen-präsentierenden Eigenschaften von TREM-1 beschäftigten. Diesbezüglich analysierte eine Forschungsgruppe die Expression von TREM-1 auf F4/80⁺ CD11b⁺ Zellen und diskutierte diese phänotypische Eigenschaften von TREM-1⁺ Zellen im Verlauf von Entzündungsreaktionen und Tumorwachstum (76). Während einer bakteriellen Entzündung oder einer chronisch entzündlichen Darmerkrankung konnte TREM-1 auf Ly6G^{high} (86) bzw. CX3CR1^{low} Ly6C^{high} (54) und CD14⁺ bzw. CD89⁺ (63) APC Zellen nachgewiesen werden. Im Rahmen dieser Dissertation zeigte eine Analyse der infiltrierenden Leukozytensubpopulationen im Verlauf einer chronischen Abstoßungsreaktion zunächst eine Infiltration von TREM-1⁺ Zellen in das Allograft. Eine detailliertere Charakterisierung der TREM-1⁺ Leukozyten ergab eine Positivität in den Oberflächenmarkern für CD11b, F4/80 und MHC-II.

Die Ergebnisse in der vorliegenden Studie und die Untersuchungen in der Literatur weisen TREM-1⁺ Zellen antigen-präsentierende Eigenschaften zu. Eine Aktivierung von TREM-1⁺ APC könnte daher einen wichtigen Baustein in der chronischen Abstoßungsreaktion nach kardialer Organtransplantation darstellen und durch eine Expression pro-inflammatorischer Zytokine die Alloreaktivität gegen das Spenderorgan unterstützen. Diese aufgestellte Hypothese für den Mechanismus der Transplantatabstoßung wird im Folgenden weiter diskutiert.

TREM-1 exprimierende APC können über den TREM-1/DAP12-Signalweg die Produktion und Sekretion pro-inflammatorischer Zytokine aktivieren. Diese Effekte von TREM-1 wurden bereits in akuten wie auch in chronischen Entzündungsreaktionen in der Maus nachgewiesen (46, 63, 87). Für die Option einer TREM-1 Blockade oder der nachfolgenden Signalkaskade, könnten Versuchstiere mit einer Defizienz in dem Adaptermolekül DAP12 verwendet werden. Jedoch ist zu berücksichtigen, dass DAP12 neben der Signaltransduktion im TREM-1-

Signalweg auch nach einer Aktivierung von TREM-2 zu tragen kommt (48). Die Untersuchungen von TREM-1 würden daher mit einer DAP12^{-/-} Maus gegebenenfalls zu ambivalenten Ergebnissen führen, da zudem durch TREM-2 oftmals gegensätzliche Effekte induziert werden (55).

Um die Funktion von TREM-1 im Verlauf der chronischen Abstoßungsreaktion genauer analysieren zu können wurde ein antagonistisches Peptid (LP17) verwendet. Eine Inhibition von TREM-1 durch LP17 führte bei einem hämorrhagischen und septischen Schock oder im Verlauf einer chronisch entzündlichen Darmerkrankung zu positiven Effekten (63, 74, 88). Dies konnte auch bei einer chronischen Abstoßungsreaktion nach allogener Herztransplantation verifiziert werden. Das verwendete Transplantationsmodell zeigte im Verlauf einer chronischen Abstoßungsreaktion eine Infiltration perivaskulärer Leukozyten, einen parenchymalen und vaskulären Schaden des Organs und eine gesteigerte Transplantatvaskulopathie, die zu einem luminalen Verschluss koronarer Gefäße führt. Durch die kontinuierliche Blockade von TREM-1 konnten die histopathologischen Auswirkungen im Allograft stark reduziert und das Überleben der transplantierten Herzen verlängert werden. Eine TREM-1 Inhibition bedingte eine reduzierte Infiltration von TREM-1⁺ sowie CD11b⁺ Zellen in das transplantierte Herz.

Als Nächstes stellten wir uns die Frage, ob TREM-1 in der initialen Phase der angeborenen Immunantwort eine Rolle spielt und welche Funktion TREM-1 im frühen Abwehrmechanismus gegen das Spenderorgan im Verlauf der chronischen Abstoßungsreaktion einnimmt? Es zeigte sich, dass eine Blockade von TREM-1 in der frühen Phase der Alloreaktivität für ein dauerhaftes Überleben der Spenderherzen nach Organtransplantation ausreicht. Neben einer verminderten Transplantatvaskulopathie konnte auch eine reduzierte Infiltration TREM-1⁺ CD11b⁺ Leukozyten beobachtet werden. Nach Absetzen der TREM-1 Blockade zeigte sich im Langzeitversuch eine geringe, aber wiederkehrende Infiltration der CD11b⁺ Zellen in das allogene Transplantat. Dies ist ein Hinweis auf eine erneute Aktivierung der angeborenen Immunantwort, jedoch erwies sich die Reaktivierung letztendlich nicht als gravierend genug um das Überleben der transplantierten Organe zu gefährden. Der Effekt einer initialen Inhibition von TREM-1 im Verlauf der chronischen Abstoßungsreaktion manifestierte sich auch in der Regulation der adaptiven Immunität und führte zu einer dauerhaften Reduktion infiltrierender CD4⁺ und CD8⁺ T Lymphozyten. Wie auch bei CD11b⁺ Zellen migrierte eine geringe Anzahl an CD4⁺ und CD8⁺ T Lymphozyten nach Absetzen der TREM-1 Inhibition erneut in das allogene Transplantat. Die wiederkehrende adaptive Immunantwort ist jedoch zu schwach um sich negativ auf die Transplantatfunktion auszuwirken.

TREM-1⁺ APC können durch die Induktion inflammatorischer Zytokine eine Entzündungsreaktion steigern (43, 45), die sich wiederum in einer Proliferation und Infiltration von T Lymphozyten äußern kann. De facto zeigte sich eine Verbindung zwischen alloreaktiven TREM-1⁺ APC und der Aktivität von T Lymphozyten. Die Proliferation und Infiltration von CD4⁺ T Zellen nach Absetzen der initialen TREM-1 Inhibition war in den vorliegenden Untersuchungen nur geringfügig erhöht. Im Gegensatz zur geringen Steigerung einer Infiltration von CD4⁺, CD8⁺ T Lymphozyten und der geringen Reaktivierung der Proliferation von CD4⁺ T Zellen zeigte sich, dass die Zytokinproduktion, insbesondere IL-17 und IFN γ , nach Absetzen der initialen TREM-1 Blockade deutlich Anstieg. Weitere Untersuchungen wären nötig um dieses Phänomen genauer analysieren zu können.

Die Ergebnisse der initialen Inhibierung von TREM-1 sind im Kontext der klinisch-angewandten immunsuppressiven Therapie zu betrachten. Derzeit werden im Therapieverlauf hauptsächlich Immunsuppressiva zur Inhibierung der Aktivität des erworbenen Immunsystems verwendet, die ein Langzeitüberleben der transplantierten Organe weitgehend sicherstellt. Allerdings zeigt diese dauerhafte Medikation ein erhebliches Nebenwirkungsspektrum inklusive toxischer Effekte auf das Transplantat (31). Die vorliegenden Daten zeigten, dass eine Inhibierung von TREM-1 in der initialen Phase der Alloreaktivität die Ausprägung einer chronischen Abstoßungsreaktion nachhaltig unterdrücken kann. Somit könnte eine Kombination der initialen TREM-1-Inhibition mit herkömmlichen Immunsuppressiva ein therapeutisches Regime zur Unterdrückung einer chronischen Abstoßungsreaktion in der Transplantationsmedizin darstellen und gleichzeitig nebenwirkungsarm sein.

In weiteren Untersuchungen wurde TREM-1 auch in der akuten Abstoßungsreaktion genauer betrachtet. Wie histologisch nachgewiesen werden konnte, erfolgte im gewählten akuten Transplantationsmodell die Abstoßung des Spenderherzens innerhalb von Tagen und äußert sich in einem vaskulären Schaden des Organs, der innerhalb von einer Woche zum Funktionsverlust des allogenen Transplantates führt. Im kompletten MHC-Mismatch einer akuten Abstoßungsreaktion nach kardialer Transplantation und Inhibition von TREM-1 konnte kein verlängertes Überleben der Transplantate beobachtet werden. Der Grund dafür wird in der extrem rasch ablaufenden Immunreaktion gegen das transplantierte Organ, wie auch in der möglicherweise fehlenden Inhibition einer MHC-I induzierten Immunreaktion durch CD8⁺ T Lymphozyten vermutet. Die funktionelle Relevanz von CD11b⁺ APC im Verlauf einer akuten Abstoßungsreaktion ist jedoch unumstritten (81, 89). Die Tatsache, dass TREM-1⁺ Zellen histologisch in der akuten Abstoßungsreaktion nachgewiesen werden konnten, unterstützte dies und führte zu Untersuchungen in einem Tiermodell mit subakutem Abstoßungsverlauf.

Durch eine Rekonstitution von Rag1^{-/-} Empfängertieren konnte eine zeitlich gedehnte Abstoßungsreaktion erreicht werden und eine Untersuchung von TREM-1⁺ Zellen auch im Tiermodell eines kompletten Antigen-Mismatches ermöglichen. Die kontinuierliche Inhibition von TREM-1 führte in dieser Situation neben dem verlängerten Überleben der Transplantate auch zu einer verminderten Infiltration von TREM-1⁺ und CD11b⁺ Zellen. Im kompletten Antigen-Mismatch mit bekannter, ausgeprägter MHC-I Aktivierung zeigte sich die Anzahl der CD4⁺ Zellen während der Hemmung von TREM-1 reduziert. Die Anzahl der CD8⁺ T Zellpopulation wies jedoch keine Veränderung auf. In der Literatur wird die maßgebliche Rolle von CD4⁺ und CD8⁺ T Zellen im Verlauf einer akuten Abstoßungsreaktion unterschiedlich diskutiert. CD4⁺ wie auch CD8⁺ T Zellen wurden in der akuten Abstoßung nach Organtransplantation nachgewiesen (10, 90). Die Annahme liegt daher nahe, dass im Verlauf der subakuten Abstoßungsreaktion zusätzlich zu den CD4⁺ T Zellen auch CD8⁺ T Lymphozyten eine wichtige Rolle spielen.

4.5. TREM-1⁺ CD11b⁺ APC aktivieren die Differenzierung von Effektor T Zellen im Verlauf der chronischen Abstoßungsreaktion

Die Abstoßung des Transplantats resultiert aus einem Zusammenspiel von verschiedenen angeborenen und erworbenen Effektormechanismen (10). Schwerpunkt dieser Doktorarbeit bestand in der Funktionsanalyse von TREM-1⁺ CD11b⁺ APC im Verlauf einer chronischen Abstoßungsreaktion und die Konsequenz einer Blockade des TREM-1 Signalwegs. Die Ergebnisse dieser Untersuchung zeigten eine TREM-1-abhängige Infiltration inflammatorischer Zellen und deren Expression pro-inflammatorischer Zytokine nach Organtransplantation.

Eines der produzierten Zytokine infiltrierender APC ist IL-23. Durch seine pro-inflammatorischen Eigenschaften kann IL-23 Effektor T Zellen aktivieren, die ihrerseits IL-17 produzieren (91). IL-23 ist ein Zytokin der IL-12 Familie und wird vorrangig von APC sezerniert (92). In der vorliegenden Studie konnte gezeigt werden, dass alloreaktive CD11b⁺ APC IL-23 produzieren und die Differenzierung von Th17 Zellen im Verlauf einer chronischen Abstoßungsreaktion einleiten können. In Bezug auf die Alloreaktivität bei einer Organabstoßung konnte durch eine Blockade von IL-23 und somit der Reduktion der Th17 Zell-Differenzierung, das Überleben des transplantierten Organs verlängert werden (93, 94). In der vorliegenden Untersuchung zeigte eine Inhibition von TREM-1 neben der verringerten Infiltration von CD11b⁺ APC in das Allograft auch eine verminderte IL-23 Expression CD11b⁺ Zellen. Dies deutet auf eine verminderte Differenzierung und Stabilisierung von Th17 Zellen während einer TREM-1 Inhibition hin. Alloreaktive TREM-1⁺

CD11b⁺ APC sind somit in der Lage die adaptive Immunantwort direkt zu beeinflussen und den Verlauf einer chronischen Abstoßungsreaktion am Herzen zu unterstützen (s. Abb. 100).

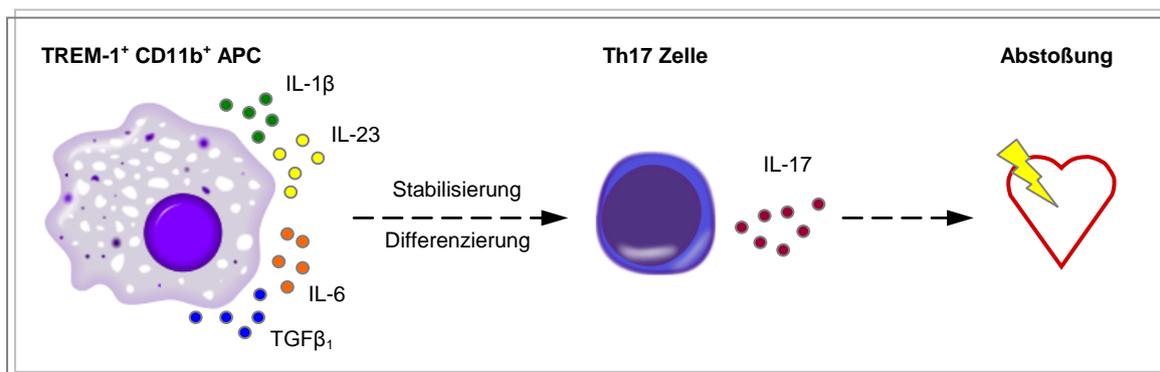


Abb. 100: Schematische Darstellung des möglichen Mechanismus TREM-1⁺ CD11b⁺ APC im Verlauf einer chronischen Abstoßungsreaktion.

Die Verbindung von IL-17 als auslösender Faktor für die Initiierung einer Abstoßungsreaktion war lange Zeit in der Transplantationsimmunologie umstritten. So wurde angenommen, dass IFN γ den entscheidenden Parameter für die entzündliche Schädigung des transplantierten Organs im Verlauf einer Abstoßungsreaktion darstellt. Umso überraschender war es, wie zu Beginn des neuen Jahrtausends die Wichtigkeit von IL-17 in der Transplantatabstoßung bekannt wurde. Untersuchungen zeigten, dass eine Defizienz in IFN γ oder T-bet für das Überleben der Transplantate nach Herztransplantation nicht ausreichend war (23, 95). In der vorliegenden Untersuchung konnten IL-17, wie auch IFN γ als pro-inflammatorische Mediatoren im Verlauf der chronischen Abstoßungsreaktion am Herzen definiert werden. Eine mögliche Erklärung für eine chronische Abstoßungsreaktion wäre eine kombinierte Immunantwort gegen das Spenderorgan durch Th1 und Th17 Zellen. Die Konsequenz einer kontinuierlichen Blockade von TREM-1 zeigte sich nicht nur in einer verminderten Expression von IL-17, sondern auch von IFN γ und somit in einem verlängerten Transplantatüberleben.

Einen weiteren Hinweis der Alloreaktivität von TREM-1⁺ CD11b⁺ APC fand sich in der Regulation des Zellzyklus und im Proliferationsverhalten von CD4⁺ T Zellen. Eine Möglichkeit für eine gesteigerte Alloreaktivität gegen das transplantierte Organ ist eine erhöhte T Zell-Antwort. Im Verlauf einer adaptiven Immunantwort steigern T Lymphozyten ihr Proliferationsverhalten (96). Eine Verringerung des alloreaktiven Pools an T Zellen mit Hilfe von Immunsuppressiva ist jedoch mit Risiken und Nebenwirkungen für den Patienten verbunden (31, 97). Eine Alternative wäre die Kombination von Immunsuppressiva mit einer Blockade der TREM-1⁺ APC um eine konsekutive Aktivierung der adaptiven Immunantwort gegen das Spenderorgan zu minimieren. Die bisherigen Untersuchungen im Rahmen dieser Doktorarbeit zeigten einen direkten Zusammenhang von TREM-1⁺ APC mit CD4⁺ T Zellen,

die sich neben einer vermehrten T Zell-Infiltration und Expression von IL-17 und IFN γ auch in einer gesteigerten Proliferation äußerte.

4.6. Regulierung des fibrotischen Organumbaus in der chronischen Abstoßungsreaktion durch TREM-1

Die Organfibrose entspricht einer vermehrten, pathologischen Kollagenablagerung im Gewebe mit nachfolgendem Funktionsverlusts des Organs und entsteht sehr häufig im Verlauf einer chronischen Abstoßungsreaktion (98). Die Induktion des pro-fibrotischen Programms kann durch alloantigen-abhängigen (zelluläre und humorale Immunaktivität) und alloantigen-unabhängige (Beschaffenheit des Transplantats, Reperfusionsschäden und Infektionen) Faktoren ausgelöst werden (10, 99). Im Endeffekt führen jedoch beide auslösende Faktoren zu einem beschleunigten Funktionsverlust des transplantierten Spenderorgans. Das gewählte Transplantationsmodell der chronischen Abstoßungsreaktion unterliegt einem Antigen-Mismatch, der sich im I-A Komplex des MHC-II Komplexes äußert und im Laufe von ca. 4 Wochen zu einer progredienten chronischen Abstoßungsreaktion und der Ausbildung einer Transplantatfibrose führt (23, 81). Die auftretenden Schädigungen am Gewebe des transplantierten Organs werden hauptsächlich durch Zytokine, Chemokine und Wachstumsfaktoren vermittelt (21). TGF β_1 ist sowohl an der Regulation physiologischer Fibrosierungsprozesse, insbesondere an Wundheilung und Gewebereparatur, als auch an pathologischer Fibrosierung beteiligt (29, 100-103). TGF β_1 -induzierte Effekte bedingen die Kollagenablagerung im Gewebe mit konsekutiver Organfibrose (104). Zur Untersuchung der Organfibrose konnte in Tiermodellen dargelegt werden, dass die spezifische Inhibition TGF β_1 eine fibrotische Gewebeschädigung verhindert (100). Eine vermehrte Expression von TGF β_1 bedingt die Aktivierung kardialer Fibroblasten, die über eine gesteigerte Produktion von Kollagen konsekutiv eine Fibrogenese auslösen (29, 103). Zusätzlich induziert TGF β_1 die Expression weiterer Faktoren, wie den „Connective Tissue Growth Factor“, der durch seine Aktivierung eine Kollagenablagerung im Spenderorgan bedingen kann (103). Die erhöhte Expression und Aktivierung von TGF β_1 im Verlauf einer chronischen Abstoßungsreaktion ist eine Folge der Th1 und Th17 abhängigen Immunantwort. Insbesondere IL-17 ist an der Modulation der Entzündungsreaktion im Gewebe durch Aktivierung pro-inflammatorischer Zytokine und an der Initiierung der Fibrose beteiligt (28, 29, 105). Studien zeigten, dass IL-17 bei der Fibrogenese in verschiedenen Krankheitsbildern eine Rolle spielt (103, 105-107). Im Bezug auf Fibrose konnte gezeigt werden, dass IL-17 die Expression von Kollagen in kardialen Fibroblasten selbst beeinflusst und somit direkt auf die Fibrogenese im Verlauf einer chronischen Abstoßungsreaktion wirken kann (28, 29). In der vorliegenden Doktorarbeit wurde nachgewiesen, dass eine spezifische Blockade von TREM-1⁺ APC Zellen eine Fibrose im allogenen Transplantat unterbindet. Neben einer Reduktion von IL-17 zeigte sich auch

eine verminderte Kollagenablagerung im Allograft. Zusammenfassend könnte die Initialisierung des fibrotischen Programms über pro-inflammatorische Zytokine, insbesondere IL-17 erfolgen und zu einer myokardialen Schädigung und Kollagenablagerung während einer chronischen Abstoßungsreaktion führen (s. Abb. 101).

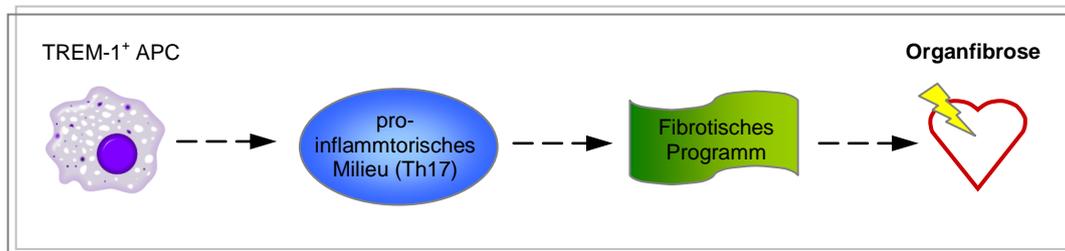


Abb. 101: Schematische Darstellung zu der Funktion von TREM-1 in der Ausbildung einer Organfibrose.

Neben dem Einfluss von IL-17 auf die Transplantatfibrose, stellt IL-6 ebenfalls einen wichtigen Faktor in der Fibrogenese dar. Eine Inhibierung von IL-6 im Verlauf einer chronischen Abstoßungsreaktion am Herzen zeigte eine reduzierte Organfibrose und eine Verlängerung des Transplantatüberlebens (108-110). Eine Blockade von TREM-1 im verwendeten Transplantationsmodell äußerte sich neben einer verminderten Th17 Antwort auch in einer reduzierten IL-6 Produktion von CD11b⁺ APC *in vivo*. Ein weiterer Diskussionspunkt für eine reduzierte Fibrogenese nach Inhibition von TREM-1 wäre der direkte Einfluss von IL-6 auf Th17 Zellen.

Neben den zuvor diskutierten pro-fibrotischen Phänomenen von IL-17 könnte auch eine Expression von IL-6 durch TREM-1⁺ CD11b⁺ APC einen fibrotischen Organumbau unterstützen und das Überleben der Transplantate im Verlauf einer chronischen Abstoßungsreaktion negativ beeinflussen.

Das Ganze ist mehr als die Summe seiner Teile.
(Aristoteles)

5. ZUSAMMENFASSUNG

In der modernen Medizin dient die Herztransplantation als „Goldstandard“ für die Behandlung der terminalen Herzinsuffizienz. Jedoch ist eine der schwerwiegenden Komplikationen nach solider Organtransplantation die Abstoßung des Spenderorgans. Eine chronische Abstoßungsreaktion manifestiert sich erst nach Jahren und führt im Langezeitverlauf zu einer erhöhten Kollagenablagerung im Transplantat mit der Konsequenz eines fibrotischen Organumbaus und einem fortschreitenden Funktionsverlust. Eine Inhibition des erworbenen Immunsystems kann zwar durch verschiedene Immunsuppressiva erreicht werden, ist aber nebenwirkungsreich. Daher ist das Ziel neuer Studien, unter Berücksichtigung der Mechanismen der Transplantatabstoßung, optimierte Strategien für eine gezielte Immunsuppression zu entwickeln. In diesem Zusammenhang mehren sich die Hinweise, dass APC, Zellen des angeborenen Immunsystems, einen wichtigen Ansatzpunkt zur Sicherung der Transplantatfunktion darstellen.

Um die Wichtigkeit des angeborenen Immunsystems im Verlauf der chronischen Abstoßungsreaktion zu erläutern, wurden Experimente mit Myd88^{-/-} Mäusen durchgeführt. Dies spiegelte die Idee wieder, dass durch eine Modulation des angeborenen Immunsystems das Ausmaß einer Entzündungsreaktion verringert werden kann. Durch eine Myd88 Defizienz konnte ein längeres Überleben der Transplantate gezeigt werden. Da aber Myd88 in vielen funktionell immunologischen und homöostatischen Prozessen eine wichtige Rolle spielt, ist es für eine therapeutische Grundlage in der humanen Transplantationsmedizin weitgehend ungeeignet (71).

Eine Alternative für die Blockade der angeborenen Immunantwort findet sich in TREM-1 wieder. TREM-1 ist ein Ko-Rezeptor der PRR, der auf Monozyten / Makrophagen und Neutrophilen exprimiert wird, die Aktivität der PRR verstärkt und pro-inflammatorisch wirkt. In der Humanmedizin wurde TREM-1 eine wichtige Funktion in einer Reihe von Entzündungsreaktionen zugeordnet (72). Hinsichtlich chronischer Abstoßungsreaktionen gibt es jedoch noch keine Untersuchungen. Ergebnisse dieser Doktorarbeit zeigten erstmals eine

Infiltration von TREM-1⁺ Zellen in humane Allotransplantate im Rahmen einer chronischen Abstoßungsreaktion.

Um die Funktionalität von TREM-1 genauer analysieren zu können, wurde ein murines Transplantationsmodell gewählt. Infiltrierende TREM-1⁺ Zellen im Verlauf einer chronischen Abstoßungsreaktion wiesen eine Positivität für CD11b, F4/80 und MHC-II auf und wurden als APC definiert. Eine kontinuierliche Inhibierung von TREM-1 über den gesamten Beobachtungszeitraum verringerte das Ausmaß der chronischen Abstoßungsreaktion und zeigte ein verlängertes Überleben der transplantierten Herzen. Neben einer reduzierten Infiltration IL-6 und IL-23-produzierender APC, war auch eine verminderte Anzahl alloreaktiver CD4⁺ und CD8⁺ T Zellen im allogenen Transplantat zu beobachten. Daher lag der Schluss nahe, dass eine Induktion von T Zellen in der chronischen Abstoßungsreaktion die Folge einer Interaktion mit infiltrierenden TREM-1⁺ CD11b⁺ APC sein könnte. Eine genauere Analyse konnte tatsächlich zeigen, dass das Proliferationsmuster sowie die Expression der Zytokine IL-17 und IFN γ von CD4⁺ T Lymphozyten von TREM-1⁺ APC abhängig ist. Der positive Effekt einer Inhibition von TREM-1 auf die Transplantatfunktion in einer chronischen Abstoßung, basierend auf einer verminderten Differenzierung von Th1 und Th17 Zellen, führte zu der Hypothese, dass eine initiale Inhibierung des angeborenen Immunsystems ausreichend sein könnte um ein langfristiges Überleben der Transplantate zu gewährleisten. Experimente in der vorliegenden Doktorarbeit konnten tatsächlich bestätigen, dass sich bei Hemmung von TREM-1 in der initialen Phase der angeborenen Immunantwort das Langzeitüberleben der Herztransplantate deutlich verlängerte.

Die Untersuchungen zur Fibrogenese nach Organtransplantation zeigten eine pathologische Kollagenablagerung im Gewebe mit nachfolgendem Funktionsverlust des Transplantats im Verlauf der chronischen Abstoßungsreaktion. IL-17 spielt in der Initialisierung des profibrotischen Programms eine besondere Rolle. Interessant war, dass eine Blockade von TREM-1 sich neben einer verminderten Expression von IL-17 und IFN γ auch in einer reduzierten Fibrogenese manifestierte.

Zusammenfassend sprechen die Ergebnisse dafür, dass der Ko-Rezeptor TREM-1 auf CD11b⁺ APC im Abstoßungsprozess immunregulatorisch auf die adaptive Immunantwort und die Fibrogenese, wie auch auf das Überleben der Transplantate wirkt. Diese Ergebnisse sind insbesondere von klinischer Relevanz, da TREM-1 bisher in Therapiestrategien des angeborenen Immunsystems zur Verlängerung des Transplantatüberlebens noch unzureichend untersucht wurde.

*Es gibt nur ein einziges Gut
für den Menschen. Die Wissenschaft.
Und nur ein einziges Übel. Die Unwissenheit.
(Sokrates)*

6. LITERATURVERZEICHNIS

1. Unbekannt. Anfang 16. Jhd. Beinwunder der Heiligen Cosmas und Damian aus Ditzingen, Kreis Ludwigsburg. Württembergisches Landesmuseum Stuttgart, WLM 989.
2. Hasegawa, T., Visovatti, S.H., Hyman, M.C., Hayasaki, T., and Pinsky, D.J. 2007. Heterotopic vascularized murine cardiac transplantation to study graft arteriopathy. *Nat Protoc* 2:471-480.
3. Schlich, T. 2011. The origins of organ transplantation. *Lancet* 378:1372-1373.
4. Carrel, A., and Guthrie, C.C. 1906. A NEW METHOD FOR THE HOMOPLASTIC TRANSPLANTATION OF THE OVARY. *Science* 23:591.
5. Carrel, A., and Guthrie, C.C. 1906. SUCCESSFUL TRANSPLANTATION OF BOTH KIDNEYS FROM A DOG INTO A BITCH WITH REMOVAL OF BOTH NORMAL KIDNEYS FROM THE LATTER. *Science* 23:394-395.
6. Carrel, A., and Charles, G. 1905. The transplantation of veins and organs. *Clinical Examination of Patiens: American Medicine*. 1101-1102.
7. HUME, D.M., MERRILL, J.P., MILLER, B.F., and THORN, G.W. 1955. Experiences with renal homotransplantation in the human: report of nine cases. *J Clin Invest* 34:327-382.
8. Charles, W. 1923. Some observations on the length of survival and function of homogenous kidney transplants. In *Preliminary report: Journal of Urology*. 275.
9. Sprangers, B., Kuypers, D.R., and Vanrenterghem, Y. 2011. Immunosuppression: does one regimen fit all? *Transplantation* 92:251-261.
10. Land, W.G. 2011. *Innate Alloimmunity, Part 1: Innate Immunity and Host Defense*. Pabst Science Publishers: Haberal Egitim Vakfi.
11. Hunt, S.A., and Haddad, F. 2008. The changing face of heart transplantation. *J Am Coll Cardiol* 52:587-598.
12. Gibson, T., and Medawar, P.B. 1943. The fate of skin homografts in man. *J Anat* 77:299-310.294.
13. Medawar, P.B. 1944. The behaviour and fate of skin autografts and skin homografts in rabbits: A report to the War Wounds Committee of the Medical Research Council. *J Anat* 78:176-199.
14. LaRosa, D.F., Rahman, A.H., and Turka, L.A. 2007. The innate immune system in allograft rejection and tolerance. *J Immunol* 178:7503-7509.
15. Neefjes, J., Jongasma, M.L., Paul, P., and Bakke, O. 2011. Towards a systems understanding of MHC class I and MHC class II antigen presentation. *Nat Rev Immunol*.

16. Caballero, A., Fernandez, N., Lavado, R., Bravo, M.J., Miranda, J.M., and Alonso, A. 2006. Tolerogenic response: allorecognition pathways. *Transpl Immunol* 17:3-6.
17. Abbas, A.K., Lichtman, A.H., and Pillai, S. 2007. *Cellular And Molecular Immunology*. Saunders Elsevier.
18. Dierselhuis, M., and Goulmy, E. 2009. The relevance of minor histocompatibility antigens in solid organ transplantation. *Curr Opin Organ Transplant* 14:419-425.
19. Spencer, C.T., Gilchuk, P., Dragovic, S.M., and Joyce, S. 2010. Minor histocompatibility antigens: presentation principles, recognition logic and the potential for a healing hand. *Curr Opin Organ Transplant* 15:512-525.
20. Vassalli, G., Gallino, A., Weis, M., von Scheidt, W., Kappenberger, L., von Segesser, L.K., Goy, J.J., and Cardiology, W.G.M.o.t.E.S.o. 2003. Alloimmunity and nonimmunologic risk factors in cardiac allograft vasculopathy. *Eur Heart J* 24:1180-1188.
21. Libby, P., and Pober, J.S. 2001. Chronic rejection. *Immunity* 14:387-397.
22. Russell, M.E. 2000. Cardiac allograft vasculopathy--a changing perspective. *Z Kardiol* 89 Suppl 9:IX/6-10.
23. Yuan, X., Paez-Cortez, J., Schmitt-Knosalla, I., D'Addio, F., Mfarrej, B., Donnarumma, M., Habicht, A., Clarkson, M.R., Iacomini, J., Glimcher, L.H., et al. 2008. A novel role of CD4 Th17 cells in mediating cardiac allograft rejection and vasculopathy. *J Exp Med* 205:3133-3144.
24. Brunner, S.M., Schiechl, G., Falk, W., Schlitt, H.J., Geissler, E.K., and Fichtner-Feigl, S. 2011. Interleukin-33 prolongs allograft survival during chronic cardiac rejection. *Transpl Int* 24:1027-1039.
25. Fischbein, M.P., Yun, J., Laks, H., Irie, Y., Fishbein, M.C., Bonavida, B., and Ardehali, A. 2002. Role of CD8+ lymphocytes in chronic rejection of transplanted hearts. *J Thorac Cardiovasc Surg* 123:803-809.
26. Itoh, S., Nakae, S., Axtell, R.C., Velotta, J.B., Kimura, N., Kajiwara, N., Iwakura, Y., Saito, H., Adachi, H., Steinman, L., et al. 2010. IL-17 contributes to the development of chronic rejection in a murine heart transplant model. *J Clin Immunol* 30:235-240.
27. Kolls, J.K., and Lindén, A. 2004. Interleukin-17 family members and inflammation. *Immunity* 21:467-476.
28. Venkatachalam, K., Mummidi, S., Cortez, D.M., Prabhu, S.D., Valente, A.J., and Chandrasekar, B. 2008. Resveratrol inhibits high glucose-induced PI3K/Akt/ERK-dependent interleukin-17 expression in primary mouse cardiac fibroblasts. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 294:H2078-2087.
29. Faust, S.M., Lu, G., Marini, B.L., Zou, W., Gordon, D., Iwakura, Y., Laouar, Y., and Bishop, D.K. 2009. Role of T cell TGFbeta signaling and IL-17 in allograft acceptance and fibrosis associated with chronic rejection. *J Immunol* 183:7297-7306.
30. Tellides, G., and Pober, J.S. 2007. Interferon-gamma axis in graft arteriosclerosis. *Circ Res* 100:622-632.
31. Paul, L.C. 2001. Overview of side effects of immunosuppressive therapy. *Transplant Proc* 33:2089-2091.

32. Bagchi, S., Husain Zaidi, S., and Prasad Mathur, R. 2011. Severe symptomatic hyponatremia--an uncommon presentation of tacrolimus nephrotoxicity. *Nephrol Dial Transplant* 26:2042-2044.
33. Baschant, U., and Tuckermann, J. 2010. The role of the glucocorticoid receptor in inflammation and immunity. *J Steroid Biochem Mol Biol* 120:69-75.
34. Segovia, J., Rodríguez-Lambert, J.L., Crespo-Leiro, M.G., Almenar, L., Roig, E., Gómez-Sánchez, M.A., Lage, E., Manito, N., and Alonso-Pulpón, L. 2006. A randomized multicenter comparison of basiliximab and muromonab (OKT3) in heart transplantation: SIMCOR study. *Transplantation* 81:1542-1548.
35. Kawai, T., and Akira, S. 2010. The role of pattern-recognition receptors in innate immunity: update on Toll-like receptors. *Nat Immunol* 11:373-384.
36. O'Neill, L.A., and Bowie, A.G. 2007. The family of five: TIR-domain-containing adaptors in Toll-like receptor signalling. *Nat Rev Immunol* 7:353-364.
37. Adachi, O., Kawai, T., Takeda, K., Matsumoto, M., Tsutsui, H., Sakagami, M., Nakanishi, K., and Akira, S. 1998. Targeted disruption of the MyD88 gene results in loss of IL-1- and IL-18-mediated function. *Immunity* 9:143-150.
38. Goldstein, D.R., Tesar, B.M., Akira, S., and Lakkis, F.G. 2003. Critical role of the Toll-like receptor signal adaptor protein MyD88 in acute allograft rejection. *J Clin Invest* 111:1571-1578.
39. Tesar, B.M., Zhang, J., Li, Q., and Goldstein, D.R. 2004. TH1 immune responses to fully MHC mismatched allografts are diminished in the absence of MyD88, a toll-like receptor signal adaptor protein. *Am J Transplant* 4:1429-1439.
40. Sugimoto, S., Lin, X., Okazaki, M., Lai, J., Tietjens, J.R., Huang, H., Patterson, G.A., Krupnick, A.S., Kreisel, D., and Gelman, A.E. 2009. Monocyte differentiation is controlled by MyD88 after mouse orthotopic lung transplantation. *Transplant Proc* 41:388-390.
41. Molloy, E.J. 2009. Triggering Receptor Expressed on Myeloid Cells (TREM) family and the application of its antagonists. *Recent Pat Antiinfect Drug Discov* 4:51-56.
42. Tessarz, A.S., and Cerwenka, A. 2008. The TREM-1/DAP12 pathway. *Immunol Lett* 116:111-116.
43. Klesney-Tait, J., and Colonna, M. 2007. Uncovering the TREM-1-TLR connection. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 293:L1374-1376.
44. Hunkapiller, T., and Hood, L. 1989. Diversity of the immunoglobulin gene superfamily. *Adv Immunol* 44:1-63.
45. Bouchon, A., Dietrich, J., and Colonna, M. 2000. Cutting edge: inflammatory responses can be triggered by TREM-1, a novel receptor expressed on neutrophils and monocytes. *J Immunol* 164:4991-4995.
46. Sharif, O., and Knapp, S. 2008. From expression to signaling: roles of TREM-1 and TREM-2 in innate immunity and bacterial infection. *Immunobiology* 213:701-713.
47. Li, J., Birkenheuer, A.J., Marr, H.S., Levy, M.G., Yoder, J.A., and Nordone, S.K. 2011. Expression and function of triggering receptor expressed on myeloid cells-1 (TREM-1) on canine neutrophils. *Dev Comp Immunol*.

48. Turnbull, I.R., Gilfillan, S., Cella, M., Aoshi, T., Miller, M., Piccio, L., Hernandez, M., and Colonna, M. 2006. Cutting edge: TREM-2 attenuates macrophage activation. *J Immunol* 177:3520-3524.
49. Hamerman, J.A., Jarjoura, J.R., Humphrey, M.B., Nakamura, M.C., Seaman, W.E., and Lanier, L.L. 2006. Cutting edge: inhibition of TLR and FcR responses in macrophages by triggering receptor expressed on myeloid cells (TREM)-2 and DAP12. *J Immunol* 177:2051-2055.
50. Allcock, R.J., Barrow, A.D., Forbes, S., Beck, S., and Trowsdale, J. 2003. The human TREM gene cluster at 6p21.1 encodes both activating and inhibitory single IgV domain receptors and includes NKp44. *Eur J Immunol* 33:567-577.
51. Washington, A.V., Schubert, R.L., Quigley, L., Disipio, T., Feltz, R., Cho, E.H., and McVicar, D.W. 2004. A TREM family member, TLT-1, is found exclusively in the alpha-granules of megakaryocytes and platelets. *Blood* 104:1042-1047.
52. Halpert, M.M., Thomas, K.A., King, R.G., and Justement, L.B. 2011. TLT2 potentiates neutrophil antibacterial activity and chemotaxis in response to G protein-coupled receptor-mediated signaling. *J Immunol* 187:2346-2355.
53. Colonna, M., and Facchetti, F. 2003. TREM-1 (triggering receptor expressed on myeloid cells): a new player in acute inflammatory responses. *J Infect Dis* 187 Suppl 2:S397-401.
54. Bouchon, A., Facchetti, F., Weigand, M.A., and Colonna, M. 2001. TREM-1 amplifies inflammation and is a crucial mediator of septic shock. *Nature* 410:1103-1107.
55. Klesney-Tait, J., Turnbull, I.R., and Colonna, M. 2006. The TREM receptor family and signal integration. *Nat Immunol* 7:1266-1273.
56. Bleharski, J.R., Kiessler, V., Buonsanti, C., Sieling, P.A., Stenger, S., Colonna, M., and Modlin, R.L. 2003. A role for triggering receptor expressed on myeloid cells-1 in host defense during the early-induced and adaptive phases of the immune response. *J Immunol* 170:3812-3818.
57. Gibot, S., Kolopp-Sarda, M.N., Béné, M.C., Bollaert, P.E., Lozniewski, A., Mory, F., Levy, B., and Faure, G.C. 2004. A soluble form of the triggering receptor expressed on myeloid cells-1 modulates the inflammatory response in murine sepsis. *J Exp Med* 200:1419-1426.
58. Gibot, S., Kolopp-Sarda, M.N., Béné, M.C., Cravoisy, A., Levy, B., Faure, G.C., and Bollaert, P.E. 2004. Plasma level of a triggering receptor expressed on myeloid cells-1: its diagnostic accuracy in patients with suspected sepsis. *Ann Intern Med* 141:9-15.
59. Gibot, S., Cravoisy, A., Levy, B., Bene, M.C., Faure, G., and Bollaert, P.E. 2004. Soluble triggering receptor expressed on myeloid cells and the diagnosis of pneumonia. *N Engl J Med* 350:451-458.
60. Wiersinga, W.J., Veer, C.T., Wieland, C.W., Gibot, S., Hooibrink, B., Day, N.P., Peacock, S.J., and van der Poll, T. 2007. Expression profile and function of triggering receptor expressed on myeloid cells-1 during melioidosis. *J Infect Dis* 196:1707-1716.
61. Wang, D.Y., Qin, R.Y., Liu, Z.R., Gupta, M.K., and Chang, Q. 2004. Expression of TREM-1 mRNA in acute pancreatitis. *World J Gastroenterol* 10:2744-2746.
62. Kamei, K., Yasuda, T., Ueda, T., Qiang, F., Takeyama, Y., and Shiozaki, H. 2010. Role of triggering receptor expressed on myeloid cells-1 in experimental severe acute pancreatitis. *J Hepatobiliary Pancreat Sci* 17:305-312.

63. Schenk, M., Bouchon, A., Seibold, F., and Mueller, C. 2007. TREM-1--expressing intestinal macrophages crucially amplify chronic inflammation in experimental colitis and inflammatory bowel diseases. *J Clin Invest* 117:3097-3106.
64. Kuai, J., Gregory, B., Hill, A., Pittman, D.D., Feldman, J.L., Brown, T., Carito, B., O'Toole, M., Ramsey, R., Adolfsson, O., et al. 2009. TREM-1 expression is increased in the synovium of rheumatoid arthritis patients and induces the expression of pro-inflammatory cytokines. *Rheumatology (Oxford)* 48:1352-1358.
65. Ho, C.C., Liao, W.Y., Wang, C.Y., Lu, Y.H., Huang, H.Y., Chen, H.Y., Chan, W.K., Chen, H.W., and Yang, P.C. 2008. TREM-1 expression in tumor-associated macrophages and clinical outcome in lung cancer. *Am J Respir Crit Care Med* 177:763-770.
66. Stewart, S., Winters, G.L., Fishbein, M.C., Tazelaar, H.D., Kobashigawa, J., Abrams, J., Andersen, C.B., Angelini, A., Berry, G.J., Burke, M.M., et al. 2005. Revision of the 1990 working formulation for the standardization of nomenclature in the diagnosis of heart rejection. *J Heart Lung Transplant* 24:1710-1720.
67. Munoz, N.M., and Leff, A.R. 2006. Highly purified selective isolation of eosinophils from human peripheral blood by negative immunomagnetic selection. *Nat Protoc* 1:2613-2620.
68. Yang, J., Riella, L.V., Boenisch, O., Popoola, J., Robles, S., Watanabe, T., Vanguri, V., Yuan, X., Guleria, I., Turka, L.A., et al. 2009. Paradoxical functions of B7: CD28 costimulation in a MHC class II-mismatched cardiac transplant model. *Am J Transplant* 9:2837-2844.
69. Klekotka, P.A., Yang, L., and Yokoyama, W.M. 2010. Contrasting roles of the IL-1 and IL-18 receptors in MyD88-dependent contact hypersensitivity. *J Invest Dermatol* 130:184-191.
70. Blyszczuk, P., Kania, G., Dieterle, T., Marty, R.R., Valaperti, A., Berthonneche, C., Pedrazzini, T., Berger, C.T., Dirnhofer, S., Matter, C.M., et al. 2009. Myeloid differentiation factor-88/interleukin-1 signaling controls cardiac fibrosis and heart failure progression in inflammatory dilated cardiomyopathy. *Circ Res* 105:912-920.
71. Zhu, J., and Mohan, C. 2010. Toll-like receptor signaling pathways--therapeutic opportunities. *Mediators Inflamm* 2010:781235.
72. Derive, M., Massin, F., and Gibot, S. 2010. Triggering receptor expressed on myeloid cells-1 as a new therapeutic target during inflammatory diseases. *Self Nonself* 1:225-230.
73. Ford, J.W., and McVicar, D.W. 2009. TREM and TREM-like receptors in inflammation and disease. *Curr Opin Immunol* 21:38-46.
74. Gibot, S., Alauzet, C., Massin, F., Sennoune, N., Faure, G.C., Béné, M.C., Lozniewski, A., Bollaert, P.E., and Lévy, B. 2006. Modulation of the triggering receptor expressed on myeloid cells-1 pathway during pneumonia in rats. *J Infect Dis* 194:975-983.
75. Win, T.S., Rehakova, S., Negus, M.C., Saeb-Parsy, K., Goddard, M., Conlon, T.M., Bolton, E.M., Bradley, J.A., and Pettigrew, G.J. 2009. Donor CD4 T cells contribute to cardiac allograft vasculopathy by providing help for autoantibody production. *Circ Heart Fail* 2:361-369.
76. Zanzinger, K., Schellack, C., Nausch, N., and Cerwenka, A. 2009. Regulation of triggering receptor expressed on myeloid cells 1 expression on mouse inflammatory monocytes. *Immunology* 128:185-195.

77. Ornatowska, M., Azim, A.C., Wang, X., Christman, J.W., Xiao, L., Joo, M., and Sadikot, R.T. 2007. Functional genomics of silencing TREM-1 on TLR4 signaling in macrophages. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 293:L1377-1384.
78. Jeong, E., and Lee, J.Y. 2011. Intrinsic and extrinsic regulation of innate immune receptors. *Yonsei Med J* 52:379-392.
79. Rahmani, M., Cruz, R.P., Granville, D.J., and McManus, B.M. 2006. Allograft vasculopathy versus atherosclerosis. *Circ Res* 99:801-815.
80. McKenzie, I.F., Morgan, G.M., Sandrin, M.S., Michaelides, M.M., Melvold, R.W., and Kohn, H.I. 1979. B6.C-H-2bm12. A new H-2 mutation in the I region in the mouse. *J Exp Med* 150:1323-1338.
81. Shimizu, K., Libby, P., Shubiki, R., Sakuma, M., Wang, Y., Asano, K., Mitchell, R.N., and Simon, D.I. 2008. Leukocyte integrin Mac-1 promotes acute cardiac allograft rejection. *Circulation* 117:1997-2008.
82. Kimura, N., Itoh, S., Nakae, S., Axtell, R.C., Velotta, J.B., Bos, E.J., Merk, D.R., Gong, Y., Okamura, H., Nagamine, C.M., et al. 2011. Interleukin-16 deficiency suppresses the development of chronic rejection in murine cardiac transplantation model. *J Heart Lung Transplant* 30:1409-1417.
83. Wang, S., Schmaderer, C., Kiss, E., Schmidt, C., Bonrouhi, M., Porubsky, S., Gretz, N., Schaefer, L., Kirschning, C.J., Popovic, Z.V., et al. 2010. Recipient Toll-like receptors contribute to chronic graft dysfunction by both MyD88- and TRIF-dependent signaling. *Dis Model Mech* 3:92-103.
84. von Bernuth, H., Picard, C., Jin, Z., Pankla, R., Xiao, H., Ku, C.L., Chrabieh, M., Mustapha, I.B., Ghandil, P., Camcioglu, Y., et al. 2008. Pyogenic bacterial infections in humans with MyD88 deficiency. *Science* 321:691-696.
85. Mohamadzadeh, M., Coberley, S.S., Olinger, G.G., Kalina, W.V., Ruthel, G., Fuller, C.L., Swenson, D.L., Pratt, W.D., Kuhns, D.B., and Schmaljohn, A.L. 2006. Activation of triggering receptor expressed on myeloid cells-1 on human neutrophils by marburg and ebola viruses. *J Virol* 80:7235-7244.
86. Weber, B., Saurer, L., Schenk, M., Dickgreber, N., and Mueller, C. 2011. CX3CR1 defines functionally distinct intestinal mononuclear phagocyte subsets which maintain their respective functions during homeostatic and inflammatory conditions. *Eur J Immunol* 41:773-779.
87. Gibot, S., Massin, F., Le Renard, P., Béné, M.C., Faure, G.C., Bollaert, P.E., and Levy, B. 2005. Surface and soluble triggering receptor expressed on myeloid cells-1: expression patterns in murine sepsis. *Crit Care Med* 33:1787-1793.
88. Gibot, S., Massin, F., Alauzet, C., Derive, M., Montemont, C., Collin, S., Fremont, S., and Levy, B. 2009. Effects of the TREM 1 pathway modulation during hemorrhagic shock in rats. *Shock* 32:633-637.
89. Qi, F., Adair, A., Ferenbach, D., Vass, D.G., Mylonas, K.J., Kipari, T., Clay, M., Kluth, D.C., Hughes, J., and Marson, L.P. 2008. Depletion of cells of monocyte lineage prevents loss of renal microvasculature in murine kidney transplantation. *Transplantation* 86:1267-1274.

90. Shelton, M.W., Walp, L.A., Basler, J.T., Uchiyama, K., and Hanto, D.W. 1992. Mediation of skin allograft rejection in scid mice by CD4+ and CD8+ T cells. *Transplantation* 54:278-286.
91. Aggarwal, S., Ghilardi, N., Xie, M.H., de Sauvage, F.J., and Gurney, A.L. 2003. Interleukin-23 promotes a distinct CD4 T cell activation state characterized by the production of interleukin-17. *J Biol Chem* 278:1910-1914.
92. Oppmann, B., Lesley, R., Blom, B., Timans, J.C., Xu, Y., Hunte, B., Vega, F., Yu, N., Wang, J., Singh, K., et al. 2000. Novel p19 protein engages IL-12p40 to form a cytokine, IL-23, with biological activities similar as well as distinct from IL-12. *Immunity* 13:715-725.
93. Cao, H., Lan, Q., Shi, Q., Zhou, X., Liu, G., Liu, J., Tang, G., Qiu, C., Xu, J., Fan, H., et al. 2011. Anti-IL-23 antibody blockade of IL-23/IL-17 pathway attenuates airway obliteration in rat orthotopic tracheal transplantation. *Int Immunopharmacol* 11:569-575.
94. Xie, A., Wang, S., Zhang, K., Wang, G., Ye, P., Li, J., Chen, W., and Xia, J. 2011. Treatment with interleukin-12/23p40 antibody attenuates acute cardiac allograft rejection. *Transplantation* 91:27-34.
95. Miura, M., El-Sawy, T., and Fairchild, R.L. 2003. Neutrophils mediate parenchymal tissue necrosis and accelerate the rejection of complete major histocompatibility complex-disparate cardiac allografts in the absence of interferon-gamma. *Am J Pathol* 162:509-519.
96. Wells, A.D. 2003. Cell-cycle regulation of T-cell responses--novel approaches to the control of alloimmunity. *Immunol Rev* 196:25-36.
97. Li, X.C., Strom, T.B., Turka, L.A., and Wells, A.D. 2001. T cell death and transplantation tolerance. *Immunity* 14:407-416.
98. Wynn, T.A. 2004. Fibrotic disease and the T(H)1/T(H)2 paradigm. *Nat Rev Immunol* 4:583-594.
99. Hornick, P., and Rose, M. 2006. Chronic rejection in the heart. *Methods Mol Biol* 333:131-144.
100. Faust, S.M., Lu, G., Wood, S.C., and Bishop, D.K. 2009. TGFbeta neutralization within cardiac allografts by decorin gene transfer attenuates chronic rejection. *J Immunol* 183:7307-7313.
101. Fichtner-Feigl, S., Strober, W., Geissler, E.K., and Schlitt, H.J. 2008. Cytokines mediating the induction of chronic colitis and colitis-associated fibrosis. *Mucosal Immunol* 1 Suppl 1:S24-27.
102. Fichtner-Feigl, S., Strober, W., Kawakami, K., Puri, R.K., and Kitani, A. 2006. IL-13 signaling through the IL-13alpha2 receptor is involved in induction of TGF-beta1 production and fibrosis. *Nat Med* 12:99-106.
103. Booth, A.J., and Bishop, D.K. 2010. TGF-beta, IL-6, IL-17 and CTGF direct multiple pathologies of chronic cardiac allograft rejection. *Immunotherapy* 2:511-520.
104. Ruiz-Ortega, M., Rodríguez-Vita, J., Sanchez-Lopez, E., Carvajal, G., and Egido, J. 2007. TGF-beta signaling in vascular fibrosis. *Cardiovasc Res* 74:196-206.
105. Burlingham, W.J., Love, R.B., Jankowska-Gan, E., Haynes, L.D., Xu, Q., Bobadilla, J.L., Meyer, K.C., Hayney, M.S., Braun, R.K., Greenspan, D.S., et al. 2007. IL-17-dependent cellular immunity to collagen type V predisposes to obliterative bronchiolitis in human lung transplants. *J Clin Invest* 117:3498-3506.
106. Dubin, P.J., McAllister, F., and Kolls, J.K. 2007. Is cystic fibrosis a TH17 disease? *Inflamm Res* 56:221-227.

107. Nakae, S., Nambu, A., Sudo, K., and Iwakura, Y. 2003. Suppression of immune induction of collagen-induced arthritis in IL-17-deficient mice. *J Immunol* 171:6173-6177.
108. Diaz, J.A., Booth, A.J., Lu, G., Wood, S.C., Pinsky, D.J., and Bishop, D.K. 2009. Critical role for IL-6 in hypertrophy and fibrosis in chronic cardiac allograft rejection. *Am J Transplant* 9:1773-1783.
109. Lei, J., He, F., Wu, M., Zheng, X., Chen, X., and Chen, Z. 2010. Administration of anti-interleukin-6 monoclonal antibody prolongs cardiac allograft survival. *Transpl Int* 23:1271-1281.
110. Booth, A.J., Grabauskiene, S., Wood, S.C., Lu, G., Burrell, B.E., and Bishop, D.K. 2011. IL-6 promotes cardiac graft rejection mediated by CD4+ cells. *J Immunol* 187:5764-5771.

7. ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

µl	Mikroliter
µm	Mikrometer
Abb.	Abbildung
AKT	Antiapoptotische Kinase
AP-1	„Activating Protein-1“
APC	Allophycocyanin
AT-Gehalt	Gehalt der Basen Adenin und Thymin
AVL	Antikörper-Verdünnungs-Lösung
B6	Maus: C57BL/6J
Balb/c	Maus: Balb/c AnNCrl
bm12	Maus: B6.C-H-2bm12/KhEg
BSA	„Bovine Serum Albumin“
bp	Basenpaar
ca.	Circa
Ca ⁺⁺	Kalzium
CAV	Transplantationsvaskulopathie
CBA	„Cytometric Bead Array“
CD	Gruppen immunphänotypischer Oberflächenmerkmale von Zellen („Cluster of Differentiation“)
cDNA	Komplementäre DNA („Complementary DNA“)
COS-7	Affennieren-Zelllinie (CV-1 in Origin SV40)
CpG	Phosphat-Guanosin-Oligodeoxynucleotid
CT-Wert	Schwellenwertzyklus („Threshold Cycle“ oder auch „Crossing Point“)
Da	Dalton
DAB	„Diaminobenzidine“
DAP12	„DNAX-Activating Protein of Molecular Mass 12 kDa“
DC Zelle	Dendritische Zellen (DC = „Dendritic cell“)
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DNA/DNS	Desoxyribonukleinsäure („Deoxyribonucleic acid“)
DNase	Enzym für die Hydrolyse der DNA
DSO	Deutsche Stiftung für Organtransplantation
dsRNA	Doppelsträngige RNA („Double Stranded RNA“)
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ELISA	Antikörperbasiertes Nachweisverfahren („Enzyme-linked Immunosorbent Assay“)
ER	Endoplasmatisches Retikulum
ERK	Extrazellulär regulierende Kinase
ev.	Eventuell
Fas	„Apoptosis Antigen 1“
FasL	Fas-Ligand (Apoptose-auslösendes Protein)
FCS	Fetales Kälberserum („Fetal Calf Serum“)
FITC	Fluorescein Isothiocyanat
FSC	„Forward Light Scatter“
G27	Kanüle mit dem Außendurchmesser von 27 („Gauge 27“)
GC-Gehalt	Gehalt der Basen Guanin und Cytosin

GMCSF	„Granulocyte Macrophage Colony-Stimulating Factor“
GvHD	Transplantat versus Host Reaktion („Graft Versus Host Disease“)
h	Stunde
H ₂ O ₂	Wasserstoffperoxid
HBSS	Hank's Salzlösung („Hank's Balanced Salt Solution“)
H.E.	Hematoxylin Eosin Färbung
HIV	Humane Immundefizienz-Virus
HLA	Haupthistokompatibilitätskomplex („Major Histocompatibility Complex“) beim Mensch
HPF	„High Power Field“
HRP	Meerrettichperoxidase („Horseradish Peroxidase“)
HTx	Herztransplantation
IBD	„Inflammatory Bowel Disease“)
IFN	Interferon
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
iNOS	„inducible“ Stickstoffmonoxid-Synthase
IRAK	IL-1 Rezeptor Kinase
IRF	„Interferon-Regulatory Factor“
ITAM	„Immunoreceptor Tyrosine-Based Activation Motif“
JAK2	Janus Kinase 2
Jhdt	Jahrhundert
k	Kilo
KGW	Körpergewicht
L	Liter
LP17	Antagonistisches Peptid zu TREM-1
LPS	Lipopolysaccharide
MACS	„Magnetic Cell Separation“-Puffer
MAP	„Mitogen-Activated Protein“
mHAgS	Neben-histokompatibilitätsantigene („Minor Histocompatibility Antigens“) beim Mensch
MHC	Haupthistokompatibilitätskomplex („Major Histocompatibility Complex“) bei der Maus
ml	Milliliter
MMF	Mykophenolat-Mofetil
mRNA	„Messenger RNA“
MST	„Median Survival Time“
MW	Mittelwert
Myd88	„Myeloid differentiation factor 88“
n	Anzahl
n. Chr.	Nach Christus
n.d.	Nicht detektierbar
NaCl	Natriumchlorid
NFκB	„Nuclear Factor 'Kappa-Light-Chain-Enhancer' of Activated B-cells“
NFAT	„Nuclear Factor of Activated T cells“
ng	Nanogramm
NK-Zelle	„Natural killer“-Zelle
NKp44	„Natural killer protein“
NOD	Nucleotide Oligomerization Domain

NTP	Nukleosidtriphosphat
OD-Wert	Optische Dichte
OKT3	Muromonab-CD3
PAM	TLR1/2 Ligand (Pam3 CysSK4)
PAMP	„Pathogen Associated Molecular Patterns
PBMC	mononukleäre Zellen des peripheren Blutes („Peripheral Blood Mononuclear Cell“)
PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung („Phosphate Buffered Saline“)
PCR	Real-Time Polymerase-Kettenreaktion („Real Time Polymerase Reaction“)
PE	Phycoerythrin
PerCP	Peridinin-Chlorophyll-Protein Complex
PGN	Peptidoglykan
PLi	Perivaskuläre Leukozyteninfiltration
PMA	Phorbol-12-Myristat-13-Acetat
poly(I:C)	Synthetische Doppelstrang-RNA, die durch Komplexbildung aus zwei Homopolymeren (Polyribinosinsäure u. Polyribocytidylsäure) gewonnen wird.
PRR	„Pattern Recognition Receptor“
Rag1	Maus: B6.129S7Rag1tm1Mom/J (Rag: „Recombination Activating Gene“)
RNA	Ribonukleinsäure („Ribonucleic acid“)
rpm	Umdrehungen pro Minute („Rounds per Minute“)
RPMI	Zellkulturmedium, dass am „Roswell Park Memorial Institute“ entwickelt wurde.
RT	Raumtemperatur
s.	Siehe
SDS	Natriumdodecylsulfat („Sodium Dodecyl Sulfate“)
sek	Sekunde
SEM	„Standard Error of the Mean“
siRNA	“Short interference RNA”
SSC	„Side Light Scatter“
ssRNA	Einzelstrang-RNA („Single Stranded RNA“)
sTREM	„Soluable TREM“
TAE Puffer	Tris-Acetat-EDTA-Puffer
TAK1	„Transforming Growth Factor β -activated Kinase 1
TAP	„Transporter associated with Antigen Processing“
TBS	Tris-gepufferte Salzlösung („Tris Buffered Saline“)
TCR	T Zell Rezeptor („T Cell Receptor“)
TGF β ₁	„Transforming Growth Factor β “
Th	T-Helfer
TIR-Domäne	Toll-like/IL-1 Rezeptor Domäne)
TLR	Toll-like Rezeptoren
TLT	TREM-like Transkript
TM	Schmelztemperatur
TNF	Tumornekrosefaktor
TRAF6	„TNF receptor associated factor 6“
TREM	„Triggering Receptor expressed on Myeloid Cells“
TRIF	„TIR Domain-Containing Adapter Protein Inducing IFN β “
T-TBS	TBS mit Tween
u.a.	Unter anderem

UV-Licht	Ultraviolettes Licht
v. Chr.	Vor Christus
VE	Vollentsalztes Wasser
vs.	Versus
w/o	ohne Stimulation
WT	„Wilde Type“
z.B.	zum Beispiel
ZS	Ziegenserum

8. ABBILDUNGSVERZEICHNIS

Abb. 1:	Beinwunder Cosmas und Damian.....	1
Abb. 2:	Geschichtliche Perspektive in der Herztransplantation	3
Abb. 3:	Mechanismen der Transplantabstoßung.....	5
Abb. 4:	Immunologische Mechanismen im Verlauf der Transplantatabstoßung.....	8
Abb. 5:	TLR4-, IL-1/IL-18 Rezeptor-Signalkaskade.....	11
Abb. 6:	TREM-1 Signalweg und dessen Einfluss auf die TLR4 Signalkaskade	14
Abb. 7:	Abdominal heterotope Herztransplantation.....	23
Abb. 8:	Abfolge der Anastomose.....	25
Abb. 9:	Isolierung von PBMC's mittels Biocoll.....	31
Abb. 10:	Berechnung der Zellzahl	31
Abb. 11:	Schematische Darstellung der Phenol-Chloroform-Extraktion	34
Abb. 12:	Darstellung des FSC und SSC.....	39
Abb. 13:	Darstellung der Zell-Subpopulationen im FSC vs. SSC	39
Abb. 14:	Zellzyklus-Analyse mit „Cycle Dye“	41
Abb. 15:	Fluoreszenzintensität der einzelnen Zytokine im CBA.....	42
Abb. 16:	Transplantatfunktion nach syngener und allogener Herztransplantation mit kompletter oder reduzierter Perfusion	43
Abb. 17:	Histologische Darstellung der Abstoßungsreaktion nach Herztransplantation an Tag 20.....	44
Abb. 18:	Histologisches Scoring bei unterschiedlicher Perfusion der Donorherzen	45
Abb. 19:	Histologie der syngen transplantierten Donorherzen	45
Abb. 20:	Progredienter Verlauf der chronischen Abstoßungsreaktion im bm12-B6 Tiermodell bei reduzierter Perfusion.....	46
Abb. 21:	Histologischer Score nach syngener und allogener Herztransplantation	46
Abb. 22:	Darstellung der Kollageneinlagerung in der chronischen Abstoßungsreaktion nach syngener und allogener Herztransplantation an Tag 20	47
Abb. 23:	Expression von Kollagen an Tag 20 <i>post transplantationem</i>	48
Abb. 24:	Zytokinkonzentration im Serum der Rezipienten nach allogener und syngener Herztransplantation.....	49
Abb. 25:	Absolute Anzahl der CD45 ⁺ Zellen an Tag 12 und 20 nach reduzierter Perfusion.....	50
Abb. 26:	Zytometrische Analyse der CD45 ⁺ CD11b ⁺ F4/80 ⁺ Zellen nach Organtransplantation an Tag 20.....	50
Abb. 27:	FACS Analyse der Leukozytensubpopulation in der syngenen und allogenen Herztransplantation.....	51
Abb. 28:	CD4 Immunhistologie von Herzen nach syngener und allogener Transplantation.....	52
Abb. 29:	Immunhistologie von CD8 ⁺ Zellinfiltraten nach syngener und allogener Transplantation der Herzen	52
Abb. 30:	Quantitative Auswertung der CD4 ⁺ und CD8 ⁺ Zellen nach syngener und allogener Transplantation der Herzen	53
Abb. 31:	Darstellung der erhöhten Expression von IL-17A und IFN γ der infiltrierenden CD4 ⁺ Zellen nach Organtransplantation.....	53
Abb. 32:	Proliferationsverhalten der CD4 ⁺ Ki67 ⁺ Zellen im Syngraft und Allograft an Tag 20	54
Abb. 33:	Transplantatfunktion nach syngener und allogener Herztransplantation in B6 oder Myd88 ^{-/-} Empfängertiere	55

Abb. 34:	Repräsentative Histologie von allogenen Donorherzen bei Transplantation in B6 oder Myd88 ^{-/-} Empfängertiere	55
Abb. 35:	TREM-1 ⁺ Zellen in Gewebe von Patienten nach Herztransplantation.....	56
Abb. 36:	Biopsien von Patienten nach Herztransplantation ohne Abstoßungsreaktion.....	57
Abb. 37:	TREM-1 ⁺ Zellen in Gewebe von Patienten nach Nierentransplantation.....	57
Abb. 38:	Progrediente Infiltration von TREM-1 ⁺ Zellen nach syngener und allogener Herztransplantation	58
Abb. 39:	Anzahl der TREM-1 ⁺ Zellen im Verlauf der murinen syngenen und allogenen Abstoßungsreaktion transplanteder Herzen.....	59
Abb. 40:	Darstellung der CD11b ⁺ TREM-1 ⁺ Zellen im Syngraft und Allograft an Tag 20.....	59
Abb. 41:	Erhöhte Infiltration von TREM-1 ⁺ CD11b ⁺ MHC-II ⁺ Zellen im Allograft einer chronischen Transplantatabstoßung	60
Abb. 42:	Infiltration von CD11b ⁺ Zellen in syngene und allogene Herztransplantate an Tag 20	60
Abb. 43:	Quantitative Auswertung der CD11b ⁺ Zellinfiltrate <i>post transplantationem</i>	60
Abb. 44:	Zytometrische Detektion von TREM-1 ⁺ CD11b ⁺ MHC-II ⁺ Zellen im Blut der Rezipienten an Tag 20 nach Organtransplantation.....	61
Abb. 45:	Darstellung der Transplantatfunktion bei Inhibierung von TREM-1.....	61
Abb. 46:	Histologie der Donorherzen bei Inhibierung von TREM-1.....	62
Abb. 47:	Histologisches Scoring syngener und allogener Transplantate im Verlauf einer chronischen Abstoßungsreaktion und einer Blockade von TREM-1	63
Abb. 48:	Ausprägung der Organfibrose im Verlauf einer TREM-1 Inhibition	64
Abb. 49:	Kollagenexpression bei Blockierung von TREM-1 in der chronischen Abstoßungsreaktion	64
Abb. 50:	Infiltration von TREM-1 ⁺ Zellen bei Behandlung der Rezipienten mit dem Kontrollpeptid oder LP17 im Verlauf der Abstoßungsreaktion	65
Abb. 51:	Anzahl der TREM-1 ⁺ Zellen im Transplantat während einer Behandlung mit LP17 oder dem Kontrollpeptid an Tag 20 <i>post transplantationem</i>	66
Abb. 52:	Infiltration der CD11b ⁺ Zellen in das transplantierte Herz unter Behandlung mit LP17 oder dem Kontrollpeptid	67
Abb. 53:	Doppelfluoreszenzfärbung der CD11b ⁺ TREM-1 ⁺ Zellen unter TREM-1 Inhibition.....	67
Abb. 54:	CD11b ⁺ Zellen in der chronischen Herztransplantation unter TREM-1 Inhibierung	68
Abb. 55:	Zytokinexpression von IL-6 und IL-23 in der chronischen Abstoßungsreaktion bei Inhibierung von TREM-1	68
Abb. 56:	Verringerung der IL-17A und IFN γ Produktion von CD4 ⁺ T Zellen nach Inkubation mit allogenen, TREM-1 inhibierten CD11b ⁺ Zellen	69
Abb. 57:	Immunhistologie von infiltrierenden CD4 ⁺ T Zellen bei Blockade von TREM-1.....	70
Abb. 58:	CD8 ⁺ T Zellinfiltrate nach allogener Herztransplantation und Hemmung von TREM-1	71
Abb. 59:	Anzahl der CD4 ⁺ und CD8 ⁺ T Zellen unter TREM-1 Inhibierung.....	71
Abb. 60:	IL-17 und IFN γ Expression von CD4 ⁺ Zellen während der chronischen Abstoßungsreaktion unter Inhibition von TREM-1.....	72
Abb. 61:	Proliferationsindex der CD4 ⁺ Ki67 ⁺ Zellen im Verlauf einer TREM-1 Inhibition an Tag 20 und 50.....	72
Abb. 62:	Zytokinexpression der CD11b ⁺ Zellen unter Inhibierung von TREM-1.....	73
Abb. 63:	Anzahl der CD4 ⁺ T Zellen unter Inkubation mit alloreaktiven CD11b ⁺ Zellen und einer Behandlung mit dem Kontrollpeptid oder LP17.....	74
Abb. 64:	Untersuchung der Peptidkonzentration für LP17 und Kontrollpeptid auf CD4 ⁺ T Lymphozyten bei Ko-Inkubation mit allogenen CD11b ⁺ Zellen <i>in vitro</i>	75

Abb. 65:	Stadium des Zellzyklus von CD4 ⁺ Lymphozyten bei Ko-Inkubation mit alloreaktiven CD11b ⁺ Zellen unter Hemmung von TREM-1.....	75
Abb. 66:	Blockade der klassischen Apoptose-Signalwege zeigt keine Auswirkung auf den zelltoxischen Einfluss CD11b ⁺ Zellen auf CD4 ⁺ T Lymphozyten.....	76
Abb. 67:	Phase des Zellzyklus von CD4 ⁺ T Zellen unter Inhibition der klassischen Apoptose-aktivatoren	77
Abb. 68:	Experimentelles Design für die Untersuchung von TREM-1 in der initialen Phase der angeborenen Immunität während der chronischen Abstoßungsreaktion	78
Abb. 69:	Transplantatfunktion der Donorherzen bei Inhibierung von TREM-1 in der frühen Phase der angeborenen Immunität.....	78
Abb. 70:	Histologische Darstellung der Abstoßungsreaktion nach kontinuierlicher (LP17) oder initialer (LP17 Stopp) Inhibierung von TREM-1.....	79
Abb. 71:	Histologisches Scoring der chronischen Abstoßungsreaktion nach kontinuierlicher (LP17) oder initialer (LP17 Stopp) Blockade von TREM-1 an Tag 120	80
Abb. 72:	Darstellung der Kollageneinlagerung in Donorherzen bei initialer (LP17 Stopp) und kontinuierlicher (LP17) Inhibition von TREM-1.....	80
Abb. 73:	Expression von Kollagen an Tag 120 <i>post transplantationem</i>	81
Abb. 74:	Infiltration von TREM-1 ⁺ Zellen bei Behandlung der Rezipienten mit LP17 oder dem Kontrollpeptid im Langzeitversuch	81
Abb. 75:	Infiltration der CD11b ⁺ Zellen bei initialer und kontinuierlicher Blockierung von TREM-1	82
Abb. 76:	Anzahl der TREM-1 ⁺ und CD11b ⁺ Zellen bei initialer und kontinuierlicher Hemmung von TREM-1	82
Abb. 77:	Doppelfluoreszenzfärbung der CD11b ⁺ TREM-1 ⁺ Zellen bei initialer und kontinuierlicher TREM-1 Inhibition	83
Abb. 78:	Immunhistologie von CD4 ⁺ T Zellen bei initialer und dauerhafter Blockade von TREM-1.....	84
Abb. 79:	Anzahl der CD4 ⁺ und CD8 ⁺ T Zellen bei einer initialen und kontinuierlichen Hemmung von TREM-1.....	84
Abb. 80:	CD8 ⁺ T Zellinfiltrate in der chronischen Abstoßungsreaktion unter initialer und dauerhafter Hemmung von TREM-1	85
Abb. 81:	IL-17A und IFN γ Expression von CD4 ⁺ Zellen während initialer (LP17 Stopp) oder kontinuierlicher (LP17) Inhibierung von TREM-1 im Verlauf der chronischen Abstoßungsreaktion	85
Abb. 82:	Proliferationsindex der CD4 ⁺ Ki67 ⁺ Zellen bei initialer und dauerhafter TREM-1 Inhibierung.....	86
Abb. 83:	Transplantatfunktion nach akuter Abstoßungsreaktion	87
Abb. 84:	Histologische Darstellung der Herzen nach akuter Abstoßungsreaktion	87
Abb. 85:	Histologisches Scoring im Verlauf einer akuten Abstoßungsreaktion nach Herztransplantation	87
Abb. 86:	Infiltration von TREM-1 ⁺ Zellen während der akuten Abstoßungsreaktion.....	88
Abb. 87:	TREM-1 ⁺ Zellen in der murinen akuten Abstoßungsreaktion	88
Abb. 88:	Transplantatfunktion in der akuten Abstoßung bei Inhibierung von TREM-1	89
Abb. 89:	Transplantatfunktion in der subakuten Abstoßung bei Blockade von TREM-1	90
Abb. 90:	Histologie der subakuten Abstoßungsreaktion bei TREM-1 Inhibition	90
Abb. 91:	Histologischer Score in der subakuten Abstoßungsreaktion.....	91
Abb. 92:	Kollageneinlagerung in der subakuten Abstoßungsreaktion während Inhibierung von TREM-1	91

Abb. 93:	Kollagenexpression an Tag 18 nach subakuter Abstoßungsreaktion	91
Abb. 94:	Infiltration von TREM-1 ⁺ Zellen in Donorherzen während der subakuten Abstoßungsreaktion bei Behandlung der Rezipienten mit LP17	92
Abb. 95:	Infiltration der CD11b ⁺ Zellen in der subakuten Abstoßung während der Inhibierung von TREM-1	92
Abb. 96:	Anzahl der TREM-1 ⁺ und CD11b ⁺ Zellen bei Behandlung der Rezipienten mit LP17	93
Abb. 97:	CD4 Immunhistologie von Herzen nach subakuter Abstoßungsreaktion und Hemmung von TREM-1	93
Abb. 98:	Immunhistologie von CD8 ⁺ Zellinfiltraten während der Inhibierung von TREM-1 in der subakuten Abstoßungsreaktion.....	94
Abb. 99:	Infiltration von CD4 ⁺ und CD8 ⁺ Zellen in der subakuten Abstoßung bei Blockade von TREM-1	94
Abb. 100:	Schematische Darstellung des möglichen Mechanismus TREM-1 ⁺ CD11b ⁺ APC im Verlauf einer chronischen Abstoßungsreaktion.....	105
Abb. 101:	Schematische Darstellung zu der Funktion von TREM-1 in der Ausbildung einer Organfibrose.	107

9. TABELLENVERZEICHNIS

Tabelle 1:	Darstellung der gängigsten Immunsuppressiva mit ihrem Wirkmechanismus in der soliden Organtransplantation	9
Tabelle 2:	Verwendete Antikörper und Detektionsreagenzien	20
Tabelle 3:	Histologischer Score nach ISHLT 2004	28
Tabelle 4:	Ergebnisse der Masson-Trichromfärbung.....	28
Tabelle 5:	Darstellung der verschiedenen Färbeprotokolle.....	29
Tabelle 6:	Sequenzen der Primerpaare (PCR)	36
Tabelle 7:	Definierte Primerkonditionen.....	37

10. LEBENS LAUF

Name: Mag. biol. Gabriela Schiechl
Adresse: Augsburgstr. 41
93051 Regensburg

Geburtsdatum: 4. August 1981, Radstadt (Österreich)
Staatsangehörigkeit: Österreich

::: aktuelle Tätigkeit

seit 09/2007: Promotion in den biomedizinischen Wissenschaften in der Graduiertenschule BioMediGS an der Klinik und Poliklinik für Chirurgie, Labor für Chronische Immunpathologie, Universität Regensburg
Betreuer: Prof. Dr. Stefan Fichtner-Feigl

::: Berufspraxis

09/2006 bis 07/2007: Wissenschaftliche Mitarbeiterin an der Klinik und Poliklinik für Innere Med. I, Neuro-Immuno-Endokrinologie, Uniklinik Regensburg

10/2004 bis 09/2006: Wissenschaftliche Mitarbeiterin am Institut für Pflanzenphysiologie und Forschungsassistentin am Institut für Molekularbiologie (Fa. ABT) der Universität Salzburg

07/2004 bis 09/2004: Ferialkraft im Landeskrankenhaus Salzburg (Pathologisches Institut)

01/2003 bis 12/2003: Büromitarbeiterin bei English and More (Sprachreiseunternehmen)

::: Universitäre Ausbildung

10/2003 bis 10/2005: Studium: Botanik/Pflanzenbiologie (Paris-Lodron Universität Salzburg)
Diplomarbeit: Nicotinic modulation of cell differentiation in the model system *Micrasterias denticulata*.
Magistra der Biologie

10/2000 bis 10/2003: Studium: Naturwissenschaften, (Paris-Lodron Universität Salzburg)
Bakkalaureat in Zellbiologie und Physiologie

::: Lehrtätigkeiten (Tutorien)

Universität Regensburg 2007:

- Mikrobiologie-Praktikum für Pharmakologen.

Universität Salzburg 2002 - 2005:

- Modellorganismen in den Naturwissenschaften.
- Stoffwechsel und Energiehaushalt.
- Vielfalt der Organismen: Funktionelle Pflanzenanatomie und Morphologie.
- Botanische Zellbiologie (Cytoskelett).
- Algologisch-moorkundliche Exkursion.
- Botanische Strukturanalyse (Fluoreszenzmikroskopie).

::: Schulausbildung

09/1995 bis 09/2000: Bundeshandelsakademie II in Salzburg, Österreich
Schulabschluss: Matura

:: Fachbezogene Weiterbildungen

Von Korrelation zum kausalen Modell: Netzwerkbasierte Analysen von Screening-Methoden (Microarray), Dresden 2011.

Training and education in laboratory animal science - FELASA (Federation of European Laboratory Animal Science Associations), Regensburg 2008.

3rd GEBIN Educational Course, Freiburg 2007.

:: erworbene Stipendien / Förderungen

Reisestipendium für die '15th Congress of the European Society for Organ Transplantation' (ESOT) von dem 'Deutschen Akademischen Austauschdienst' (DAAD). Glasgow, Schottland, September 2011.

Reisestipendium für 'I ESOT Basic Science Meeting – XI TTS Basic Science Symposium' in Brüssel, Belgien, März 2009.

Zuerkennung eines Leistungsstipendiums von der Universität Salzburg (Naturwissenschaftliche Fakultät) für Studiumsabschluss mit Auszeichnung, Dezember 2006.

Zuerkennung eines Förderungsstipendiums von der Universität Salzburg (Naturwissenschaftliche Fakultät), November 2004.

:: Poster und Vorträge während der Dissertation

15th Congress of the European Society for organ Transplantation (ESOT), Glasgow, Schottland. September 2011, **Vortrag**.

Summer School 'From molecules to disease', Regen, Deutschland. November 2010, **Vortrag**.

14. Chirurgische Forschungstage, Rostock, Deutschland. September 2010, **Vortrag in der „Bretschneider Preisträgersitzung“**.

American Transplant Congress, San Diego, Kalifornien. Mai 2010, **Poster**.

127. Kongress der Deutschen Gesellschaft für Chirurgie, Berlin, Deutschland. April 2010, **Vortrag**.

6th Spring School on Immunology of the Deutsche Gesellschaft für Immunologie (DGfI), Ettal, Deutschland. Februar 2010, **Poster**.

18. Jahrestagung der Deutschen Transplantationsgesellschaft, Berlin, Deutschland. Oktober 2009, **Poster**.

13. Chirurgische Forschungstage, München, Deutschland. September 2009, **Poster**.

I ESOT Basic Science Meeting – XI TTS Basic Science Symposium, Brüssel, Belgien. März 2009, **Poster**.

5th Forum of European Neuroscience, Wien, Österreich. Juli 2006, **Poster**.

16. Tagung des Österreichischen Arbeitskreis für Pflanzenphysiologie (ÖAPP), Mauterndorf, Österreich. Juni 2006, **Vortrag**.

Joint Meeting, The German Society of Physiology, München, Deutschland. März 2006, **Poster**.

9th Meeting of the Austrian Neuroscience Association, Obergurgl, Österreich. Juni 2005, **Poster**.

84th Annual Meeting, Deutsche Physiologische Gesellschaft, Göttingen, Deutschland. März 2005, **Poster**.

::: Publikationen

G. Schiechl, S.M. Brunner, R. Kesselring, M. Martin, M. Mack, H.J. Schlitt, E.K. Geissler, S. Fichtner-Feigl (2012). Inhibition of innate co-receptor TREM-1 signaling reduces CD4⁺ T cell activation and prolongs cardiac allograft survival. *AJT*. In Revision.

F. Boehm, M. Martin, R. Kesselring, G. Schiechl, E.K. Geissler, H.J. Schlitt, S. Fichtner-Feigl (2012). Deletion of Foxp3⁺ regulatory T cells in genetically targeted mice supports development of intestinal inflammation. *BMC Gastroent.* 12: 97-108.

D. Jauch, M. Martin, G. Schiechl, R. Kesselring, H.J. Schlitt, E.K. Geissler, S. Fichtner-Feigl (2011). Interleukin 21 controls tumour growth and tumour immunosurveillance in colitis-associated tumorigenesis in mice. *Gut.* 12: 1678-1686.

S.M. Brunner, G. Schiechl, W. Falk, H.J. Schlitt, E.K. Geissler, S. Fichtner-Feigl (2011). Interleukin-33 prolongs allograft survival during chronic cardiac rejection. *Transpl Int.* 10: 1027-1039.

G. Schiechl, B. Bauer, I. Fuss, S.A. Lang, C. Moser, P. Ruemmele, S. Rose-John, M.F. Neurath, E.K. Geissler, H.J. Schlitt, W. Strober, S. Fichtner-Feigl (2011). Tumor development in murine ulcerative colitis depends on MyD88 signaling of colonic F4/80⁺CD11b^(high)GR1^(low) macrophages. *J Clin Invest.* 121(5): 1692-1708.

G. Schiechl, R. H. Straub (2008): Chapter 22 Dehydroepiandrosterone. *Handbook of Systemic Autoimmune Diseases* 9: 249-256.

G. Schiechl, M. Himmelsbach, W. Buchberger, H.H. Kerschbaum and U. Lütz-Meindl (2008). Identification of acetylcholine and impact of cholinomimetic drugs on cell differentiation and growth in the unicellular green alga *Micrasterias denticulata*. *Plant Sci.* 175(3): 262-266.

::: Fähigkeiten und Kenntnisse

Molekularbiologie:	Restriktionsanalyse von Plasmiden, Klonierung und Transformierung, PCR (Light Cycler 480), Techniken der Transfektion
Biochemie und Immunologie:	Aufreinigung von Proteinen, Western blot, ELISA, FACS (Calibur und Canto II), Immunhistochemie, Chromatographie (Radioaktiv Assay)
Zellbiologie:	Kultivierung von primären Zellen und Bakterien-Kulturen, Zellisolation (Herz, Milz, Knochenmark, Lymphknoten), Mikroinjektion, Messungen von Membranpotentialen
Labortierkunde:	Herztransplantation in Maus und Ratte, Zuchtverfahren, Genetik, Anästhesiologie und Chirurgie bei Maus und Ratte
Software:	Microsoft Office (Word, Excel, Access, Power Point), Statistische Auswertung (Origin, Sigma Plot, GraphPad Prism 5), Bildbearbeitung (AxioVision, Corel Draw, Photoshop, XnView, Mirax Viewer), cytometrische Auswertung (FlowJo, FACSDiva, CellQuest), DNA Analyse (Primer3, LightCycler Universal ProbeLibrary), SoftMax
Sprachen:	Sehr gute Englischkenntnisse, Italienischkenntnisse

*Begegnet uns jemand, der uns Dank schuldig
ist, gleich fällt es uns ein. Wie oft können
wir jemand begegnen, dem wir Dank
schuldig sind, ohne daran zu denken.
(Johann Wolfgang von Goethe)*

11. W O R T E des D A N K E S

An dieser Stelle möchte ich allen herzlichen danken, die mir bei der Anfertigung dieser Arbeit mit Rat und Tat zur Seite standen.

Mein besonderer Dank gebührt *Prof. Dr. Stefan Fichtner-Feigl* für die hervorragende wissenschaftliche Betreuung und das hochinteressante Thema. Er förderte mich auf allen Ebenen und ermöglichte mir die Teilnahme an internationalen Kongressen. Seine Unterstützung, Engagement und seine Ausdauer haben diese Arbeit im Wesentlichen ermöglicht. Von seiner Bestrebung, ein Klima des engagierten Austausches zwischen Forschung und Klinik zu schaffen, habe ich sehr profitiert.

Herrn *Prof. Dr. Edward Geissler* möchte ich ebenfalls herzlich danken für die stets freundliche und hilfreiche Kommunikation und die gemeinsamen wissenschaftlichen Diskussionen. Er erwies sich als ein sehr hilfsbereiter und engagierter Mentor, der jederzeit bei Fragen zur Verfügung stand.

Weiterer Dank gebührt Frau *Prof. Dr. Birgit Sawitzki*, Leiterin der Arbeitsgruppe für medizinische Immunologie an der Charité in Berlin, für die Betreuung dieser Doktorarbeit als 2. Mentor und dem regelmäßigen wissenschaftlichen Austausch bei meiner Arbeit.

Für die sachkundige Auswahl und großzügige Bereitstellung zahlreicher Archivalien danke ich Frau *Dr. Petra Rümmele*, Institut der Pathologie.

Allen Mitarbeitern der Arbeitsgruppe danke ich herzlich für das gute Arbeitsklima und die Unterstützung, die ich jederzeit bekommen habe. Danke an *Manuela Kovács-Sautter* für die Einlernung in viele labor-technische Methoden und Korrekturlesen des Material- und Methodenteils bedanken. *Maria Martin* und *Dr. Rebecca Kesselring* gebührt besonderer Dank

für Lösungswege aus gedanklichen Sackgassen. *Stefan Brunner, Andrea Eder, Franziska Böhm, Dominik Jauch, Henrik Junger, Fides Mouris, Stefanie Nagl, Ekati Noeva, Christoph Rubner, Caroline Seebauer und Michael Worlicek* möchte ich besonders für ihre fachliche Unterstützung, ihre motivierte Zusammenarbeit und aufbauenden Worte danken.

Vielen Dank geht auch an *Dr. Beata Sacha*, die bereitwillig meine Arbeit mit ihrer fachlichen Kompetenz und Geduld Korrektur gelesen hat. Sie hat mich seit meinem Studium mit ihrem Fachwissen auf fachfremde Abenteuer begleitet und mich immer mit aufbauenden Worten unterstützt.

Ein großer Dank geht auch an die Tierpfleger des Zentralen Tierlabors in H4 und D3, die sich sehr um das Wohl der Versuchstiere gekümmert haben.

Darüber hinaus gilt ein großes Dankeschön meinen Freunden: insbesondere *Britta Schweikhardt mit Familie, Simon Tost, Christine Wagner, Christian Zuleger, Anke Hofmann, Judith Bausenwein, Dr. Christian Florian, Dr. Muriel Malaise und Dr. Elke Eggenhofer*, die mich mit vielen Gesprächen, Streicheleinheiten, Ablenkungsmanövern von der Forschung und mit Gaumenfreuden stets ermutigt und begeistert haben.

In besonderem Maße möchte ich mich bei meiner Familie bedanken, für die uneingeschränkte und selbstlose Unterstützung nicht nur während meines Studiums, sondern weit darüber hinaus. Sie stehen in allen Lebenslagen stets hilfreich an meiner Seite und geben mir auf meinem Lebensweg die nötige moralische Kraft, meine Ziele weiter zu verfolgen und zu erreichen. Vielen Dank dafür!

Zu guter Letzt geht mein ganz spezieller Dank an meinen Lebenspartner *Benjamin Brachner*, der unter anderem mit mir die Orthographie dieser Dissertation verbessert hat. Er hat mir stets Mut zugesprochen, mich in meiner Arbeit bestärkt und wusste mich in den richtigen Momenten zu motivieren. Seine Geduld und liebevolle Unterstützung hat mir immer wieder Kraft gegeben um Dinge anzupacken. Vielen lieben Dank für deine Liebe und für Alles, was du für mich getan hast!