

Aus dem
Institut für Virologie
der Veterinärmedizinischen Fakultät der Universität Leipzig

Untersuchungen zur Etablierung eines bovinisierten NSGTM-Maus-Modells

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Grades eines
Doktor medicinae veterinariae (Dr. med. vet.)
durch die Veterinärmedizinische Fakultät
der Universität Leipzig

eingereicht von
Anne Kühlmann
aus Blankenburg (Harz)

Leipzig, 2022

Mit Genehmigung der Veterinärmedizinischen Fakultät der Universität Leipzig

Dekan: Professor Dr. Dr. Thomas Vahlenkamp
Betreuer: Professor Dr. Dr. Thomas Vahlenkamp

Gutachter: Professor Dr. Dr. Thomas Vahlenkamp
Institut für Virologie
Veterinärmedizinische Fakultät, Universität Leipzig

Professor Dr. Christian Jassoy
Institut für Medizinische Mikrobiologie und Virologie
Universitätsklinikum Leipzig, Universität Leipzig

Tag der Verteidigung: 25. Januar 2022

Weitere betreuende Einrichtung:

*Fraunhofer-Institut für Zelltherapie und
Immunologie IZI in Leipzig*

Meiner Familie

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	IV
Abbildungsverzeichnis	VII
Tabellenverzeichnis	IX
1 Einleitung	1
2 Literaturübersicht	3
2.1 Immunsystem	3
2.2 Besonderheiten des bovinen Immunsystems	4
2.3 Humanisierte Mausmodelle	8
2.3.1 Humanes Nabelschnurblut	9
2.3.2 Marker humaner hämatopoetischer Vorläuferzellen	9
2.4 Bovine Mausmodelle	10
2.4.1 Transplantation boviner Leukozyten	10
2.4.2 Transplantation bovinen Gewebes	11
2.4.3 Infektionsversuche mit bovinen Infektionserregern	12
2.5 Bovines Nabelschnurblut	13
2.6 Marker boviner hämatopoetischer Vorläuferzellen	13
2.7 Ziele der vorliegenden Arbeit	14
3 Tiere, Material und Methoden	16
3.1 Verbrauchsmaterialien	16
3.2 Laborgeräte	17
3.3 Software	19
3.4 Gewinnung bovinen Materials	19
3.4.1 Gewinnung von Nabelschnurblut	19
3.4.2 Gewinnung von peripherem Blut	20

3.5	Aufarbeiten des bovinen Materials	20
3.5.1	Dichtegradientenzentrifugation	20
3.5.2	Stammzellisolierung	24
3.5.2.1	Positive Separation	26
3.5.2.2	T-Zell-Depletion	27
3.6	Tierexperimentelle Methoden	29
3.6.1	Versuchstiere	30
3.6.2	Präkonditionierung durch Bestrahlung	30
3.6.3	Markierung der Tiere	30
3.6.4	Transplantation und Versuchsgruppen	31
3.6.5	Scoring	32
3.6.6	Blutentnahme	33
3.6.7	Finale Präparation	34
3.7	Erfassung des Blutbildes	36
3.8	Durchflusszytometrische Analysen	36
3.8.1	Erfassung und Auswertung der Daten	38
3.8.2	Verwendete Antikörper	38
3.8.3	In vivo-Analysen	40
4	Ergebnisse	43
4.1	Gewinnung boviner mononukleärer Zellen	43
4.1.1	Dichtegradientenzentrifugation	44
4.2	Stammzellisolierung	48
4.2.1	Positive Separation	49
4.2.2	T-Zell-Depletion	51
4.3	Transplantationsverlauf	53
4.3.1	Versuchsgruppe A - CD34+/ c-kit+	55
4.3.1.1	Scoring	55
4.3.1.2	Blutbild	56
4.3.1.3	Durchflusszytometrische Analysen	59
4.3.2	Versuchsgruppe B - T-Zell-Depletion	65
4.3.2.1	Scoring	65
4.3.2.2	Blutbild	68
4.3.2.3	Durchflusszytometrische Analysen	71
4.3.3	Zusammenfassung des Transplantationsverlaufes	78
5	Diskussion	81
5.1	Gewinnung boviner mononukleärer Zellen	82
5.2	Stammzellisolierung	85
5.2.1	Positive Separation	86
5.2.2	T-Zell-Depletion	87
5.3	Transplantationsverlauf	89
5.3.1	Versuchsgruppe A - CD34+/ c-kit+	89
5.3.2	Versuchsgruppe B - T-Zell-Depletion	91
5.4	Bewertung und Ausblick	94
6	Zusammenfassung	96

7 Summary	99
8 Literaturverzeichnis	102
A Anhang	114
A.0.1 Tätowierschema	115
A.0.2 Mittels T-Zell-Depletion isolierte Zellfraktionen	116
A.0.3 Versuchsgruppe A - Blutbild	117
A.0.4 Versuchsgruppe B - Blutbild	121
Danksagung	128

Abkürzungsverzeichnis

ACD	Citrat-Dextrose-Lösung (<i>engl. Acid-Citrate-Dextrose</i>), Antikoagulans
bCBMC	mononukleäre Zellen des bovinen Nabelschnurblutes (<i>engl. bovine cord blood mononuclear cells</i>)
BG	beige
bMC	bovine mononukleäre Zellen (<i>engl. bovine mononuclear cells</i>)
bo	bovin, vom Rind stammend
bPBMC	mononukleäre Zellen des bovinen peripheren Blutes (<i>engl. bovine peripheral blood mononuclear cells</i>)
CBMC	mononukleäre Zellen des Nabelschnurblutes (<i>engl. cord blood mononuclear cells</i>)
CD	Gruppe zur Unterscheidung der Oberflächenmerkmale von Zellen (<i>engl. cluster of differentiation</i>)
CD34+	positiv für den Marker CD34
c-kit+	positiv für den Marker c-kit
DGZ	Dichtegradientenzentrifugation
DMSO	Dimethylsulfoxid
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure, Antikoagulans
FACS	Durchflusszytometrie (<i>engl. fluorescence activated cell sorting</i>)
FELASA	Federation of European Laboratory Animal Science Associations
FITC	Fluoresceinisothiocyanat, Fluorochrom
FKS	Fetales Kälberserum
FSC	Vorwärtsstreulicht (<i>engl. forward scatter</i>)
G	Gauge, Maßeinheit für Kanülen
g	Gramm bzw. Zentrifugationsbeschleunigung (je nach Zusammenhang)
Gra	Granulozyten; Parameter des Analysegerätes scil Vet abc
Gra absol	Granulozyten, absolut; Parameter des Analysegerätes scil Vet abc

GvHD	Graft-versus-Host Disease
HCT	Hämatokrit; Parameter des Analysegerätes scil Vet abc
HGB	Hämoglobin; Parameter des Analysegerätes scil Vet abc
Ig	Immunglobulin
IVC	individually ventilated cage
Lym	Lymphozyten; Parameter des Analysegerätes scil Vet abc
Lym absol	Lymphozyten, absolut; Parameter des Analysegerätes scil Vet abc
MALT	Mukosa-assoziierte lymphatische Gewebe
MC	mononukleäre Zellen (<i>engl. mononuclear cells</i>)
MCH	Mean Corpuscular Haemoglobin; Parameter des Analysegerätes scil Vet abc
MCHC	Mean Corpuscular Haemoglobin Concentration; Parameter des Analysegerätes scil Vet abc
MCV	Mean Corpuscular Volume; Parameter des Analysegerätes scil Vet abc
min	Minuten
Mo	Monozyten; Parameter des Analysegerätes scil Vet abc
Mo absol	Monozyten, absolut; Parameter des Analysegerätes scil Vet abc
MPV	Mean Platelet Volume; Parameter des Analysegerätes scil Vet abc
n	Höhe der Stichprobe/ Anzahl der Versuche
NaCl	Natriumchlorid
neugeb.	neugeboren
NK-Zellen	Natürliche Killerzellen
NOD	non-obese diabetic
NSB	Nabelschnurblut
NSGTM*	NOD-SCID-Gamma, immundefizienter Mausstamm*
p	Irrtumswahrscheinlichkeit
pB	peripheres Blut
PBL	Leukozyten des peripheren Blutes (<i>engl. peripheral blood leukocytes</i>)
PBMC	mononukleäre Zellen des peripheren Blutes (<i>engl. peripheral blood mononuclear cells</i>)
PBS	phosphatgepufferte Salzlösung (<i>engl. phosphate-buffered saline</i>)
PE	Phycoerythrin, Fluorochrom
PerCP	Peridinin-Chlorophyll-Protein, Fluorochrom
PLT	Thrombozyten; Parameter des Analysegerätes scil Vet abc
RBC	Erythrozyten; Parameter des Analysegerätes scil Vet abc
RDW	Red Cell Distribution Width; Parameter des Analysegerätes scil Vet abc
RPE	R-Phycoerythrin, Fluorochrom

RPMI	Roswell Park Memorial Institute Medium
RT	Raumtemperatur
SCID	Form der Immundefizienz (<i>engl. severe combined immunodeficiency</i>)
SD	Standardabweichung (<i>engl. standard deviation</i>)
SeF	Stammzell-enthaltende Fraktion
SEM	Standardfehler (<i>engl. standard error of the mean</i>)
SSC	Seitwärtsstreulicht (<i>engl. sideward scatter</i>)
TVV	Tierversuchsvorhaben
VE-Wasser	vollentsalztes, deionisiertes Wasser
VG	Versuchsgruppe
WBC	Leukozyten (<i>engl. white blood count</i>); Parameter des Analysegerätes scil Vet abc

* **Hinweis:** Wird im Folgenden der Begriff „NSG Maus“ verwendet, ist stets der markenrechtlich geschützte Name „NSGTM Maus“ gemeint (siehe oben).

Abbildungsverzeichnis

Abb. 1:	Anzahl der aus bovinem Nabelschnurblut und aus bovinem peripherem Blut gewonnenen mononukleären Zellen (bMC)	46
Abb. 2:	Exemplarische Darstellung des Effektes der Dichtegradientenzentrifugation (DGZ) auf zellulärer Ebene	48
Abb. 3:	Prozentuale Anteile der Stammzell-enthaltenden Fraktion (SeF) sowie der T-Lymphozyten nach T-Zell-Depletion boviner mononukleärer Zellen (bMC)	52
Abb. 4:	Vergleich der Zellvitalität unmittelbar nach positiver und nach negativer Zellseparation	53
Abb. 5:	Schematische Darstellung der Vorgehensweise für die vorliegende Arbeit	54
Abb. 6:	Prozentuale Veränderung des Körpergewichts der Mäuse der Versuchsgruppe A im Versuchszeitraum	56
Abb. 7:	Entwicklung der Gesamtleukozytenzahl im peripheren Blut der Mäuse der Versuchsgruppe A während des Versuchszeitraumes	57
Abb. 8:	Entwicklung der prozentualen Anteile an Granulozyten, Monozyten und Lymphozyten im peripheren Blut der Mäuse der Versuchsgruppe A	58
Abb. 9:	Entwicklung des Prozentsatzes boviner CD45-positiver Zellen im Blut der mit bovinen CD34-positiven oder c-kit-positiven Zellen transplantierten Mäuse der Versuchsgruppe A	60
Abb. 10:	Darstellung der Entwicklung des Prozentsatzes boviner und muriner CD45-positiver Zellen im Blut einer Maus der Versuchsgruppe A anhand durchflusszytometrischer Messungen	61
Abb. 11:	Entwicklung der prozentualen Anteile einzelner boviner Zellpopulationen im Blut einer mit c-kit-positiven Zellen transplantierten Maus der Versuchsgruppe A	62
Abb. 12:	Differenzierung der Population boviner CD3-positiver T-Lymphozyten im Blut einer mit c-kit-positiven Zellen transplantierten Maus der Versuchsgruppe A im gesamten Versuchszeitraum	63
Abb. 13:	Prozentualer Anteil boviner CD45-positiver Zellen in Blut, Milz und Knochenmark der Mäuse aus der Versuchsgruppe A bei Versuchsende	64
Abb. 14:	Prozentuale Veränderung des Körpergewichts der Mäuse der Versuchsgruppe B, denen neugeborene bovine Zellen transplantiert wurden	66

Abb. 15: Prozentuale Veränderung des Körpergewichts der Mäuse der Versuchsgruppe B, denen adult Zellen aus bovinem Nabelschnurblut transplantiert wurden	66
Abb. 16: Entwicklung des klinischen Scores der Mäuse der Versuchsgruppe B im Versuchszeitraum	67
Abb. 17: Entwicklung der Gesamtleukozytenzahl im Blut der Mäuse der Versuchsgruppe B	68
Abb. 18: Entwicklung der prozentualen Anteile an Lymphozyten, Monozyten und Granulozyten im peripheren Blut der Mäuse der Versuchsgruppe B	70
Abb. 19: Entwicklung des Prozentsatzes boviner CD45-positiver Zellen im Blut der Mäuse der Versuchsgruppe B	72
Abb. 20: Darstellung der Entwicklung des Prozentsatzes boviner und muriner CD45-positiver Zellen im Blut einer Maus der Versuchsgruppe B anhand durchflusszytometrischer Messungen	73
Abb. 21: Entwicklung der prozentualen Anteile einzelner boviner Zellpopulationen im Blut der neugeborenen transplantierten Mäuse der Versuchsgruppe B	74
Abb. 22: Differenzierung der Population boviner CD3-positiver T-Lymphozyten im Blut der neugeborenen transplantierten Mäuse der Versuchsgruppe B	76
Abb. 23: Prozentualer Anteil boviner CD45-positiver Zellen in Blut, Milz und Knochenmark der Mäuse der Versuchsgruppe B bei Versuchsende . . .	77
Abb. 24: Übersicht der Mittelwerte des prozentualen Anteils boviner CD45-positiver Zellen (bo CD45+) im Blut der Mäuse beider Versuchsgruppen während des Versuchszeitraumes	79
Abb. 25: Kaplan-Meier Überlebenskurve der Versuchsgruppen	80
Abb. 26: Tätowierschema der verwendeten Versuchstiere (Anhang)	115
Abb. 27: Entwicklung der Anzahl der Lymphozyten im peripheren Blut der Mäuse der Versuchsgruppe A während des Versuchszeitraumes (Anhang) .	117
Abb. 28: Entwicklung der Anzahl der Monozyten im peripheren Blut der Mäuse der Versuchsgruppe A während des Versuchszeitraumes (Anhang) . . .	118
Abb. 29: Entwicklung der Anzahl der Granulozyten im peripheren Blut der Mäuse der Versuchsgruppe A während des Versuchszeitraumes (Anhang) .	119
Abb. 30: Entwicklung der Anzahl der Lymphozyten im peripheren Blut der Mäuse der Versuchsgruppe B während des Versuchszeitraumes (Anhang) .	121
Abb. 31: Entwicklung der Anzahl der Monozyten im peripheren Blut der Mäuse der Versuchsgruppe B während des Versuchszeitraumes (Anhang) . . .	122
Abb. 32: Entwicklung der Anzahl der Granulozyten im peripheren Blut der Mäuse der Versuchsgruppe B während des Versuchszeitraumes (Anhang) .	123

Tabellenverzeichnis

Tab. 1:	Übersicht über die für die vorliegende Arbeit bedeutsamen CD-Antigene und ihre jeweilige Expression	7
Tab. 2:	Übersicht der für die magnetische Zellseparation pro Säulengröße maximal zu verwendenden Zellzahlen pro Säule	25
Tab. 3:	Zusammenfassung der für die positive Separation boviner hämatopoetischer Vorläuferzellen verwendeten Antikörper und MicroBeads	27
Tab. 4:	Zusammenfassung der für die T-Zell-Depletion verwendeten Antikörper und MicroBeads	28
Tab. 5:	Überblick über die im Rahmen der vorliegenden Arbeit gebildeten Versuchsgruppen	31
Tab. 6:	Zusammenfassung des angewendeten Score-Systems, nach dem die transplantierten Mäuse mindestens dreimal wöchentlich beurteilt wurden	33
Tab. 7:	Überblick über die mittels scil Vet abc bestimmten Blutparameter	36
Tab. 8:	Zusammenfassung der in der vorliegenden Arbeit verwendeten Antikörper für die durchflusszytometrischen Analysen	39
Tab. 9:	Übersicht der eingesetzten Antikörper für die durchflusszytometrische Erstanalyse des peripheren Blutes der transplantierten Mäuse	40
Tab. 10:	Übersicht der eingesetzten Antikörper für die durchflusszytometrische Verlaufsanalyse des peripheren Blutes der transplantierten Mäuse	41
Tab. 11:	Übersicht der Nabelschnurblutproben, welche einer positiven Separation auf das bovine CD34- beziehungsweise c-kit-Molekül unterzogen wurden	50
Tab. 12:	Zusammenfassung der Höhe der mittels T-Zell-Depletion isolierten Zellfraktionen (Anhang)	116
Tab. 13:	Übersicht über die erythrozytären Werte im Blutbild der Mäuse der Versuchsgruppe A (Anhang)	120
Tab. 14:	Übersicht über die erythrozytären Werte im Blutbild der Mäuse der Versuchsgruppe B (neugeb.NSB) (Anhang)	124
Tab. 15:	Übersicht über die erythrozytären Werte im Blutbild der Mäuse der Versuchsgruppe B (neugeb.pB) (Anhang)	126
Tab. 16:	Übersicht über die erythrozytären Werte im Blutbild der Mäuse der Versuchsgruppe B (adult NSB) (Anhang)	127

Einleitung

Humanisierte Mausmodelle haben innerhalb der vergangenen Jahrzehnte zu zahlreichen neuen wissenschaftlichen Erkenntnissen im humanmedizinischen Bereich beigetragen und werden nach wie vor vielfältig eingesetzt. Unter anderem ermöglichten sie in der Vergangenheit neue Erkenntnisse und Analysen zu humanen Stammzellen (MEYERROSE et al. 2003) sowie zur menschlichen Hämatopoese (SHULTZ et al. 2007). Auch die Entwicklung spezieller Krankheitsmodelle bedeutender Erkrankungen des Menschen, wie z.B. HIV, Dengue-Fieber und Ebola-Virus, im Organismus Maus wurden vorangetrieben und erlaubten völlig neue Einblicke in die genauen Infektionswege sowie die pathogenetischen Hintergründe einzelner humaner Krankheitserreger (SHULTZ et al. 2007; WATANABE et al. 2007; BREHM et al. 2010; ITO et al. 2012; SHULTZ et al. 2012; AKKINA 2013; GASKA und PLOSS 2015; LAI und CHEN 2018).

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit sollen diese Fortschritte genutzt und mittels Etablierung sogenannter „bovinisierter Mäuse“ auf eine andere Spezies, das Rind, adaptiert werden. Hierfür werden in der vorliegenden Arbeit, neben der im Fokus stehenden Transplantation boviner Zellen in den Organismus Maus, zunächst die notwendigen Vorarbeiten durchgeführt. Aufgrund lückenhafter oder gänzlich fehlender Literatur, insbesondere in Bezug auf die Aufarbeitung bestimmter boviner Ursprungsmaterialien (hier: Nabelschnurblut, NSB) oder hinsichtlich der Isolation boviner hämatopoetischer Vorläuferzellen, orientierten sich zahlreiche Arbeitsschritte eng an den bereits etablierten Methoden zur Entwicklung humanisierter Mäuse.

Das Modell der humanisierten Mäuse wurde in der Vergangenheit bereits mittels unterschiedlicher Methoden auf die Tierarten Hund und Schwein übertragen (NIEMEYER et al. 2001; FOOTE et al. 2013; HUANG et al. 2017). Die angestrebte Entwicklung eines bovinen Mausmodells könnte die Rindermedizin sowie die Forschung im Bereich ausgewählter boviner Infektionskrankheiten auf eine völlig neue Art und Weise vorantreiben. Das Rind bietet als Großtier vor allem in Bezug auf Haltung, Fütterung und Pflege als Versuchstier nur wenig günstige Voraussetzungen (BOERMANS et al. 1992).

Bereits die Erfüllung der Basisbedingungen ist aufwendig und kostenintensiv (SMITH et al. 1999). Zudem weisen Rinder eine vergleichsweise lange Gestationsperiode auf (SMITH et al. 1999). Stünde mit den sogenannten „bovinisierten Mäusen“ ein verlässliches und reproduzierbares Modell des bovinen Immunsystems im Versuchstier Maus zur Verfügung, könnte auf die bereits etablierten und optimierten Haltungs- und Umgebungsbedingungen des vielfältig eingesetzten Modelltieres Maus zurückgegriffen werden. Zudem bestünde die Möglichkeit, aus bovinem Probenmaterial gleicher Beschaffenheit genetisch einheitliche Versuchstiere zu entwickeln (BOERMANS et al. 1992; SMITH et al. 1999). Dies würde zu einer Minimierung individueller Eigenschaften und Reaktionen führen, mit denen im Großtiermodell Rind aufgrund fehlender genetischer Homogenität gerechnet werden müsste und die zu einer gewissen Verzerrung von Versuchsergebnissen führen könnten.

Der Nutzen des bovinen Kleintiermodells der „bovinisierten Maus“ könnte beispielsweise in der Entwicklung spezieller boviner Krankheitsmodelle liegen, mit Hilfe derer pathogenetische Mechanismen und Zusammenhänge besser nachvollzogen werden könnten und die darüber hinaus zukünftig womöglich für die Impfstoffentwicklung genutzt werden könnten. Auch Fortschritte im Bereich neuer diagnostischer und therapeutischer Methoden, in Bezug auf die Forschung zur Ontogenese des bovinen Organismus sowie im Zusammenhang mit bovinen Vorläuferzellen wären vorstellbar.

Für diese potentiellen Einsatzmöglichkeiten soll im Rahmen der vorliegenden Arbeit der Grundstein gelegt werden. Hierbei stand zunächst die Gewinnung boviner mononukleärer Zellen (bMC) sowie die anschließende Isolation boviner hämatopoetischer Vorläuferzellen im Vordergrund. Darauf folgte die Transplantation immundefizienter Versuchstiere mit dem Ziel, in diesen langfristig und verlässlich das bovine Immunsystem zu generieren. Das dafür nötige Anwachsen (Engraftment) der bovinen Fremdzellen im Organismus Maus sollte in der vorliegenden Arbeit unter Verwendung unterschiedlicher Methoden überprüft und quantifiziert werden. Basierend auf dem etablierten System der humanisierten Mäuse soll die folgende Arbeit die Grundlage einer innovativen Neuausrichtung von Großtiermodellen bilden.

Literaturübersicht

2.1 Immunsystem

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit spielen das Immunsystem und insbesondere dessen zelluläre Komponenten eine zentrale Rolle. Unter anderem soll mittels Transplantation entsprechender boviner Vorläuferzellen in immundefiziente Mäuse ein Tiermodell einzelner zellulärer Bestandteile des bovinen Immunsystems entwickelt werden.

Das Immunsystem ermöglicht es dem Organismus, auf unspezifische und spezifische Reize in unterschiedlich ausgeprägter Art und Weise zu reagieren und sich somit selbst zu schützen. Hierbei spielen zum einen die angeborene (unspezifische) und zum anderen die erworbene (spezifische) Immunität eine Rolle, wobei beide Formen eng verzahnt auftreten und sich gegenseitig beeinflussen (KAUFMANN 2014). Sowohl humorale als auch zelluläre Bestandteile sind hierfür von großer Bedeutung. Angeborene und erworbene Immunabwehr sowie humorale und zelluläre Abwehrmechanismen wirken auf vielfältige und komplexe Art und Weise zusammen (DAHA 2011; SCHÜTT und BRÖKER 2011; KAUFMANN 2014).

Größtenteils zellunabhängige, in Blut und Lymphflüssigkeit zirkulierende Faktoren, bilden die Basis der humoralen Immunität. Im Rahmen der unspezifischen Immunität spielen das Komplementsystem und Akute-Phase-Proteine sowie Zytokine, Interferone und weitere Faktoren eine große Rolle (SCHÜTT und BRÖKER 2011; KAUFMANN 2014). Für die spezifische Abwehr sind dies die Antikörper (DAHA 2011; SCHÜTT und BRÖKER 2011; KAUFMANN 2014).

Auf zellulärer Ebene sind auf Seiten des angeborenen Immunsystems insbesondere polymorphkernige Granulozyten, wie neutrophile, basophile und eosinophile Granulozyten, Monozyten sowie Makrophagen, Mastzellen, dendritische Zellen und Natürliche Killerzellen (NK-Zellen) von Bedeutung. Für die erworbene Immunität sind dies T- und B-Lymphozyten. Diese nehmen aufgrund ihrer Eigenschaft, Antigene spezifisch zu erken-

nen, eine Vermittlerrolle zwischen zellulärer und humoraler spezifischer Immunantwort ein (KAUFMANN 2014). Zunächst liegen beide in naiver Form vor und differenzieren sich erst nach Antigenkontakt zu Effektor-T-Zellen und Plasmazellen sowie zu T- und B-Gedächtniszellen (SCHÜTT und BRÖKER 2011; KAUFMANN 2014). Plasmazellen sind wiederum in der Lage, spezifische Immunglobuline zu sezernieren (WILKIE 1974). Je nach Tierart sind verschiedene Organe und Gewebe an der Ausbildung eines funktionierenden Immunsystems beteiligt. In den sogenannten primären lymphatischen Organen werden die Zellen des Immunsystems gebildet und erfahren eine gewisse Ausreifung (SCHÜTT und BRÖKER 2011; MEURER und WOLF 2012). Die Hämatopoese, die „Entwicklung der Blutzellen [...] aus einer gemeinsamen hämatopoetischen Stammzelle“ (KAUFMANN 2014), findet hauptsächlich im Knochenmark statt. Die anschließende Zellausreifung ereignet sich im Falle der T-Lymphozyten im Thymus und im Falle der B-Lymphozyten im Knochenmark, sowie tierartspezifisch in weiteren Organen. Für Wiederkäuer wird in diesem Zusammenhang beispielsweise die Bedeutung der Peyer-Plaques im Darm diskutiert (MEURER und WOLF 2012).

Nach Bildung und Ausreifung der einzelnen Zellen des Immunsystems gelangen diese zur Erfüllung ihrer jeweiligen Funktion zu den sogenannten sekundären lymphatischen Organen. Diese sind die über den gesamten Körper verteilten Lymphknoten, die Milz sowie das Mukosa-assoziierte lymphatische Gewebe (MALT) (KAUFMANN 2014; WILKIE 1974). In den sekundären lymphatischen Organen finden die antigenspezifischen Reaktionen statt, welche unter anderem eine erregerspezifische Abwehr ermöglichen. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit kommt den benannten lymphatischen Organen Knochenmark und Milz eine besondere Bedeutung zu. Mit Hilfe der durchflusszytometrischen Analyse dieser Gewebe sowie des peripheren Blutes (pB) der Mäuse soll das Engraftment der bovinen Zellen im Organismus Maus quantifiziert werden.

2.2 Besonderheiten des bovinen Immunsystems

Wie Schwein, Huhn, Ratte, Maus und Kaninchen, aber völlig konträr zu Mensch, Pferd, Hund und Katze, weisen Rinder ein lymphozytäres Blutbild auf (WILKIE 1974; HARPER et al. 1994; ENGELHARDT und BREVES 2005). Hierbei stellen circa 45-65 % der Zellen des peripheren Blutes Lymphozyten dar (ENGELHARDT und BREVES 2005). Bei den Granulozyten bilden die segmentkernigen, neutrophilen Granulozyten mit 20-50 % den Hauptteil (ENGELHARDT und BREVES 2005). Der Anteil an basophilen (0-2 %) und eosinophilen (2-6 %) Granulozyten ist dagegen sehr gering (ENGELHARDT und BREVES 2005). Monozyten treten im bovinen peripheren Blut zu 2-6 % auf (ENGELHARDT und BREVES 2005).

Das lymphozytäre Blutbild adulter Rinder entwickelt sich erst kurz nach der Geburt. In Rinderfeten sowie frischgeborenen Kälbern übersteigt zunächst der Gehalt an neutrophilen Granulozyten den der Lymphozyten. Dies kehrt sich kurz nach der Geburt um (TENNANT et al. 1974; HARPER et al. 1994; BRUN-HANSEN et al. 2006; JONES und ALLISON 2007; SORDILLO 2016). Außerdem verringert sich innerhalb der ersten zwei Lebensjahre von Rindern die Gesamt-Leukozytenzahl im Blut (WITTEWALD und BOHMWALD 1974), was hauptsächlich auf die Verringerung zirkulierender Lymphozyten zurückzuführen ist (PERMAN et al. 1970; HARPER et al. 1994). Kälber weisen im

Blut zudem signifikant weniger reife B-Lymphozyten auf als adulte Rinder (WYATT et al. 1994; KAMPEN et al. 2006).

Für eine der im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Methoden spielen die bovinen T-Lymphozyten sowie deren Markierung eine große Rolle (siehe Kapitel 3.5.2.2). Einer der bedeutendsten Oberflächenmarker der T-Lymphozyten stellt auch bei Rindern das CD3-Antigen dar, welches auf allen reifen T-Lymphozyten zu finden ist (DAVIS et al. 1987; DAVIS et al. 1993; KAUFMANN 2014). Anhand weiterer Oberflächenmarker können weiterhin CD8-positive, zytotoxische, und CD4-positive T-Lymphozyten, die T-Helfer-Zellen, unterschieden werden (KAUFMANN 2014).

Eine weitere Besonderheit des bovinen Immunsystems stellt die Vielzahl an sogenannten $\gamma\delta$ T-Lymphozyten dar. Von den mononukleären Zellen des peripheren Blutes (PBMC) adulter Rinder stellen 8-18 % $\gamma\delta$ T-Lymphozyten dar (MACKAY und HEIN 1989). Diese besondere Form der T-Lymphozyten findet man in großer Zahl im peripheren Blut sowie in ausgewählten Organen von Rindern (MACKAY und HEIN 1989; KIMURA et al. 1999; BALDWIN und TELFER 2015), Schafen (MACKAY 1988; MACKAY et al. 1989; MCCLURE et al. 1989; WALKER et al. 1994), Schweinen (HIRT et al. 1990) und Hühnern (SOWDER et al. 1988). Bei Mensch (BUCY et al. 1989) und Maus (ITOHARA et al. 1989) hingegen kommen diese in geringerer Zahl vor. Bei Kälbern und adulten Rindern wurde eine Subpopulationen von $\gamma\delta$ T-Lymphozyten auch bereits in der Mukosa des Magen-Darm-Traktes (WYATT et al. 1996) sowie in der Haut nachgewiesen (HEIN und DUDLER 1997).

Als einer der bedeutendsten Oberflächenmarker für $\gamma\delta$ T-Lymphozyten konnte auch beim Rind das WC1-Molekül nachgewiesen werden (CLEVERS et al. 1990; MORRISON und DAVIS 1991; WIJNGAARD et al. 1992; DAVIS et al. 1996; ROGERS et al. 2005), welches insbesondere im peripheren Blut von einem Großteil der $\gamma\delta$ T-Lymphozyten exprimiert wird (NAESSENS et al. 1997). Im Rahmen dieser Arbeit wurde unter anderem auf diesen Marker boviner T-Lymphozyten sowie einen hierfür spezifischen bovinen Antikörper zurückgegriffen.

Bei bis zu drei Wochen alten Kälbern beträgt der Prozentsatz an WC1-positiven (WC1+) T-Lymphozyten 26,5 %, bei adulten Rindern im Schnitt 5 % der PBMC (CLEVERS et al. 1990; AYOUB und YANG 1996; WILSON et al. 1996). Die Verringerung der relativen Anzahl von $\gamma\delta$ T-Lymphozyten im Blut mit zunehmendem Alter ist laut KAMPEN et al. (2006) nicht auf die absolute Verringerung dieser, sondern auf die Zunahme von CD4-positiven und CD21-positiven Zellen zurückzuführen. Mithilfe des Markers WC1 ist es in der Vergangenheit gelungen, zwei Subpopulationen boviner $\gamma\delta$ T-Lymphozyten zu unterscheiden (WYATT et al. 1994; DAVIS et al. 1996; MACHUGH et al. 1997). Der größte Anteil der bovinen $\gamma\delta$ T-Lymphozyten ist WC1-negativ (WC1-) und konnte laut Literatur vornehmlich in der roten Pulpa der Milz und im Magen-Darm-Trakt nachgewiesen werden. Der kleinere Teil ist WC1-positiv und konnte im Rahmen mehrerer Studien im peripheren Blut, in den Randzonen der Milz, in der Haut sowie der Lamina propria des Magen-Darm-Traktes nachgewiesen werden. (WYATT et al. 1994; DAVIS et al. 1996; MACHUGH et al. 1997) Dies sei nach MACHUGH et al. (1997) möglicherweise auf funktionale Unterschiede zurückzuführen.

Auch Stress unterschiedlichster Genese könne zu einem Absinken WC1-positiver $\gamma\delta$ T-Lymphozyten im Blut von Rindern führen (BALDWIN et al. 2000). Als Funktion boviner $\gamma\delta$ T-Lymphozyten wurde frühzeitig die selektive Auswanderung dieser zu akuten

Entzündungsherden festgestellt (HEIN und MACKAY 1991). In diesem Zusammenhang wurde bereits mehrfach die Bedeutung von WC1-positiven $\gamma\delta$ T-Lymphozyten bei der Bekämpfung intrazellulärer Infektionen, wie beispielsweise der von *Mycobacterium bovis* verursachten, hervorgehoben (POLLOCK und WELSH 2002; ROGERS et al. 2005; MCGILL et al. 2014; TELFER und BALDWIN 2015).

Die in der Humanmedizin bedeutsame CD-Nomenklatur (CD: cluster of differentiation), mit Hilfe derer einzelne Zellpopulationen sowie deren Differenzierungs- und Aktivierungszustand anhand ihrer exprimierten Oberflächenmoleküle unterschieden werden können, konnte zum Teil auch auf die Zellen des Immunsystems vom Rind übertragen werden (DAVIS et al. 1987; HOWARD et al. 1991; SCHUBERTH et al. 1991; NAESSENS et al. 1997). In der folgenden Tabelle sind die für die vorliegende Arbeit bedeutsamen, vorwiegend bovinen CD-Marker aufgeführt sowie die Zellpopulation benannt, auf deren Zelloberfläche diese vorrangig exprimiert werden.

Tab. 1: Übersicht über die für die vorliegende Arbeit bedeutsamen CD-Antigene und ihre jeweilige Expression

CD-Antigen	Expression	Literatur
bo CD3	Zellen der T-Zell-Linie; Marker boviner T-Lymphozyten	DAVIS et al. 1987; DAVIS et al. 1993
bo CD4	Marker boviner CD4-positiver T-Lymphozyten (T-Helfer-Zellen)	BALDWIN et al. 1986; TEALE et al. 1987; DAVIS et al. 1987; HOWARD et al. 1991; BENSAID und HADAM 1991
bo CD8	Marker boviner CD8-positiver T-Lymphozyten (zytotoxische T-Lymphozyten)	ELLIS et al. 1986; TEALE et al. 1987; DAVIS et al. 1987; HOWARD et al. 1991; MACHUGH und SOPP 1991
bo CD34	Marker primitiver boviner hämatopoetischer Vorläuferzellen, Endothelien von Blutgefäßen	NIKU et al. 2007
bo CD45	Pan-Leukozyten-Marker boviner Leukozyten	HOWARD et al. 1991; NAESSENS et al. 1997
ms CD45	Pan-Leukozyten-Marker muriner Leukozyten	TROWBRIDGE 1978; SPRINGER et al. 1978; BIRKELAND et al. 1988
bo CD117/ c-kit	Marker boviner hämatopoetischer Vorläuferzellen	KUBOTA et al. 1994; HIKONO et al. 1999; HIKONO et al. 2001a; HIKONO et al. 2001b
bo CD335	Marker boviner NK-Zellen	STORSET et al. 2004; BOYSEN und STORSET 2009
bo WC1	Marker boviner $\gamma\delta$ T-Lymphozyten	CLEVERS et al. 1990; MORRISON und DAVIS 1991; HOWARD et al. 1991; WIJNGAARD et al. 1992; MACHUGH et al. 1993; DAVIS et al. 1996; MACHUGH et al. 1997; NAESSENS et al. 1997

2.3 Humanisierte Mausmodelle

In dieser Arbeit sollen etablierte Methoden zur Humanisierung immundefizienter Mäuse aufgegriffen und an die Besonderheiten des Großtieres Rind angepasst werden.

Humanisierte Mausmodelle wurden erstmals in den späten 1980er Jahren entwickelt (MOSIER et al. 1988; MCCUNE et al. 1988; NAMIKAWA et al. 1990) und dienen seitdem als vielversprechendes Werkzeug für die humanmedizinische Grundlagenforschung sowie in Bezug auf spezielle Krankheiten des Menschen, wie z.B. HIV oder das Dengue-Fieber. Darüber hinaus werden humanisierte Mäuse unter anderem für Untersuchungen zu Autoimmunerkrankungen (SHULTZ et al. 2007; SHULTZ et al. 2012), Krebserkrankungen (SHULTZ et al. 2007; BREHM et al. 2010; ITO et al. 2012) sowie allogenen (KING et al. 2008) und xenogenen (MEYERROSE et al. 2003; KING et al. 2009; ITO et al. 2012; NORELLI et al. 2016) Abstoßungsreaktionen eingesetzt.

Je nach beabsichtigtem Vorhaben und Zweck existieren verschiedene Möglichkeiten der Erzeugung humanisierter Mäuse. Die jeweiligen Modelle lassen sich beispielsweise anhand des verwendeten Mausstammes, anhand des Alters der transplantierten Tiere, anhand Art und Menge der zu transplantierten Zellen oder Gewebe oder auch anhand der Transplantationsmethode unterscheiden (MEYERROSE et al. 2003; SHULTZ et al. 2007; SHULTZ et al. 2012; AKKINA 2013; LAI und CHEN 2018).

Um Abstoßungsreaktionen im Zusammenhang mit der Übertragung fremder Zellen in den Organismus Maus zu minimieren, kommen für die Humanisierung insbesondere immundefiziente Mausstämme zum Einsatz (MEYERROSE et al. 2003). Als erster immundefizienter Mausstamm entstand die SCID-Maus (SCID: severe combined immunodeficiency) (BOSMA et al. 1983; CUSTER et al. 1985), bei der mutationsbedingt die Bildung einer Proteinkinase verhindert wird (KIRCHGESSNER et al. 1995; MILLER et al. 1995). Dies führt zu einer ausbleibenden Differenzierung von B- und T-Lymphozyten. Funktionsfähige Natürliche Killerzellen (NK-Zellen) konnten in den Mäusen allerdings trotzdem nachgewiesen werden (SHULTZ et al. 1995; GREINER et al. 1998). Eine noch ausgeprägtere Immundefizienz und somit günstigere Voraussetzungen für die Humanisierung wurden mit der Züchtung von NOD/SCID-Mäusen (NOD: non-obese diabetic) erreicht. Durch eine angeborene diabetische Stoffwechselstörung ist sowohl das Komplementsystem als auch die dendritische Zell- und Makrophagenfunktion gestört (SHULTZ et al. 1995) und es sind nur noch wenige NK-Zellen vorhanden (SHULTZ et al. 1995). Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde auf einen Mausstamm zurückgegriffen, der wiederum eine Weiterentwicklung dieses Mausstammes darstellt. Dieser ist durch eine Mutation des Gens der γ -Kette des Interleukin-2-Rezeptors gekennzeichnet (CAO et al. 1995; DISANTO et al. 1995). Die so entstandene NSG Maus (NSG: NOD-SCID-Gamma) weist eine gestörte B- und T-Lymphozytenfunktion sowie eine völlig ausbleibende Zelldifferenzierung der NK-Zellen auf (CAO et al. 1995; OHBO et al. 1996; SHULTZ et al. 2005) und ist zudem sehr viel langlebiger. Das angeborene Immunsystem ist in NSG Mäusen fast vollständig funktionsunfähig (SHULTZ et al. 2005). Das verbesserte Engraftment transplantiert humaner Stammzellen in NSG Mäusen zeichnet sich insbesondere durch eine lange Beständigkeit (ISHIKAWA et al. 2005; SHULTZ et al. 2005; DRAKE et al. 2011) sowie den Nachweis der fast vollständigen Wiederherstellung einzelner zellulärer und auch humoraler und somit funktionaler Komponenten des humanen Immunsystems aus (ITO et al. 2002; HIRAMATSU et al.

2003; ISHIKAWA et al. 2005; SHULTZ et al. 2005; WATANABE et al. 2007). Durch seine nahezu vollständige Immundefizienz konnten mit diesem Mausstamm bisher die größten Erfolge auf dem Gebiet der humanisierten Mausmodelle erzielt werden. Hieran soll die Etablierung bovinisierter Mäuse in der vorliegenden Arbeit anknüpfen.

2.3.1 Humanes Nabelschnurblut

Humanisierte Mäuse sind beispielsweise mittels Transplantation hämatopoetischer Vorläuferzellen aus humanem Nabelschnurblut zu entwickeln (HIRAMATSU et al. 2003; MCDERMOTT et al. 2010). Bereits frühzeitig konnte festgestellt werden, dass neben Knochenmark auch humanes Nabelschnurblut Stammzellen enthält (NAKAHATA und OGAWA 1982; LEARY et al. 1984; LEARY und OGAWA 1987; BROXMEYER et al. 1989; ABOUD et al. 1992; SOUSA et al. 2014). Trotz ähnlicher Stammzellgehalte in Nabelschnurblut und Knochenmark (BROXMEYER et al. 1989; KINNIBURGH und RUSSELL 1993) stellte sich ersteres aufgrund des Nachweises einer größeren Zahl unreifer Vorläuferzellen vielfach als für Transplantationen besser geeignet heraus (CARDOSO et al. 1993; DE BRUYN et al. 1995; MAYANI und LANSDORP 1998; HOLYOAKE et al. 1999). Zudem ist die Gewinnung von Nabelschnurblut komplikationsloser und weniger invasiv als die Gewinnung von Knochenmark.

Humanes Nabelschnurblut wurde von GLUCKMAN et al. bereits 1989 erstmals erfolgreich transplantiert und findet seitdem vielseitigen klinischen Einsatz (COHEN und NAGLER 2004; ROCHA und GLUCKMAN 2006; BROWN und BOUSSIOTIS 2008; MUNOZ et al. 2014). Dabei steht insbesondere der therapeutische Nutzen der aus dem humanen Nabelschnurblut gewonnenen Stammzelllinien im Mittelpunkt (SOUSA et al. 2014). Die humanen hämatopoetischen Vorläuferzellen werden unter anderem bei malignen Erkrankungen hämatopoetischer Gewebe und Zellen, wie z.B. der akuten Leukämie, erfolgreich eingesetzt (EAPEN et al. 2007; KURTZBERG et al. 2008). Humane mesenchymale Stammzellen hingegen kommen sowohl *in vitro* als auch *in vivo* in der Zelltherapie zur Anwendung (KIM et al. 2010). Hierfür macht man sich unter anderem die immunregulatorischen Eigenschaften und die positiven Auswirkungen auf das Gewebewachstum zunutze (KIM et al. 2010).

2.3.2 Marker humaner hämatopoetischer Vorläuferzellen

Als bedeutender Marker humaner Vorläuferzellen aus der hämatopoetischen Entwicklungslinie wird unter anderem das Transmembranmolekül **CD34** angesehen, welches neben Vorläuferzellen auch auf Endothelzellen nachweisbar ist (CIVIN et al. 1984; ANDREWS et al. 1986). Dieser Marker kann laut Literatur zunächst auf nahezu allen humanen embryonalen und fetalen Stammzellen nachgewiesen werden, bis der Prozentsatz an CD34-positiven (CD34+) Stammzellen im Laufe der Gestation exponentiell abnimmt (THILAGANATHAN et al. 1994; ITO et al. 2000; SZILVASSY 2003). In Mäusen exprimieren 20 % der adulten Stammzellen das CD34-Molekül (ITO et al. 2000). Im Nabelschnurblut des Menschen sind im Durchschnitt 1 % der kernhaltigen

Zellen CD34-positiv (KINNIBURGH und RUSSELL 1993; REISBACH et al. 1993; FRITSCH et al. 1994; SUTHERLAND et al. 1994; MAYANI und LANSDORP 1998). Im Gegensatz dazu enthält das periphere Blut des Menschen mit 0,03 bis 0,09 % in etwa zehnmal weniger CD34-positive Zellen (SUTHERLAND et al. 1994).

Ein weiterer bedeutender Marker humaner hämatopoetischer Vorläuferzellen, welcher bereits bei zahlreichen Spezies nachgewiesen werden konnte, ist der **c-kit**-Rezeptor, auch **CD117** genannt (YARDEN et al. 1987; OGAWA et al. 1991; ASHMAN 1999). Ligand für diesen Tyrosinkinase-Rezeptor ist der sogenannte Stammzellofaktor (MARTIN et al. 1990; ASHMAN 1999), welcher auch beim Rind nachgewiesen werden konnte (MERTENS et al. 1997). Trotz der weiten Verbreitung im menschlichen Organismus (ASHMAN 1999) ist insbesondere das Vorkommen c-kit-positiver (c-kit+) Zellen im humanen Nabelschnurblut sowie im Knochenmark hervorzuheben. Im Durchschnitt sind 5 % der mononukleären Zellen des humanen Nabelschnurblutes c-kit-positiv, im Knochenmark sind es zwischen 2 und 5 % (BROUDY et al. 1992; REISBACH et al. 1993). In derselben Studie stellte sich heraus, dass circa 60 % der CD34-positiven Zellen gleichzeitig c-kit-positiv waren (REISBACH et al. 1993). In anderen Untersuchungen zur Koexpression von CD34 und c-kit ergab sich ein durchschnittlicher Wert von 80,7 % (D'ARENA et al. 1998). REISBACH et al. (1993) kamen aufgrund ihrer Betrachtungen und des fehlenden Nachweises des c-kit-Moleküls auf Lymphozytenvorläufern zu der Schlussfolgerung, dass der c-kit-Rezeptor funktional Erythropoese und Granulopoese beeinflusst.

2.4 Bovine Mausmodelle

2.4.1 Transplantation boviner Leukozyten

Orientierend an ersten gleichartigen und erfolgsversprechenden Versuchen mit humanen Leukozyten des peripheren Blutes (MOSIER et al. 1988) wurden von STIRTZINGER et al. (1990) erstmals auch Leukozyten des bovinen peripheren Blutes erfolgreich in SCID-Mäuse transplantiert. GREENWOOD und CROY (1993) griffen diesen Versuchsaufbau auf und kombinierten ihn mit dem Vergleich des Engraftment-Erfolges in vor der Injektion subletal bestrahlten und unbestrahlten Versuchsgruppen. Sie kamen zu dem Schluss, dass die vorherige subletale Bestrahlung von SCID-Mäusen mit anschließender intraperitonealer Injektion boviner Leukozyten des peripheren Blutes (PBL: peripheral blood leukocytes) insbesondere in Milz und Thymus zu einer Verbesserung des Engraftments boviner Zellen führten (GREENWOOD und CROY 1993). Allerdings konnten im peripheren Blut bestrahlter Mäuse keine sowie im Blut unbestrahlter Mäuse lediglich vereinzelt bovine Zellen nachgewiesen werden (GREENWOOD und CROY 1993). Einige Jahre später wurde dieses sogenannte „PBL-SCID-bo“-Modell (bo: bovin) (GREENWOOD und CROY 1993; GREENWOOD et al. 1997) erneut aufgegriffen und mit Untersuchungen zur Funktionalität von insbesondere T-Lymphozyten gekoppelt, indem den Versuchstieren bovines Gewebe transplantiert wurde. Je nach Versuchsaufbau konnten Abwehrreaktionen festgestellt werden, woraus die Funktionalität von vor allem bovinen T-Lymphozyten geschlossen wurde (GREENWOOD et al. 1997). Da bei

wiederholter Transplantation bovinen Gewebes auch eine zweite Abwehrreaktion nachgewiesen werden konnte, wurde erstmals ein Langzeit-Engraftment injizierter boviner PBL in der SCID-Maus angenommen (GREENWOOD et al. 1997). Dennoch wurde festgestellt, dass die nachgewiesenen Abwehrreaktionen nach wie vor für eine unvollständige Funktionalität boviner Immunzellen im Organismus Maus sprechen und dass insbesondere das erfolgreiche und reproduzierbare Engraftment boviner Zellen in der SCID-Maus Verbesserungspotential besitzt (GREENWOOD et al. 1997).

HÖLSCHER et al. stellten 1999 erstmals einen Zusammenhang zwischen der Menge an transplantierten bovinen Zellen und deren Auswirkungen im Mausmodell her. Ein erfolgreiches Langzeit-Engraftment samt funktionsfähigem bovinen Immunsystem in der SCID-Maus (nachgewiesen anhand Antikörper-Produktion) wurde mit der Transplantation von 2×10^7 bovinen Lymphozyten aus dem peripheren Blut erreicht (HÖLSCHER et al. 1999). Bei Transplantation größerer Zellzahlen wurden bei den Versuchstieren Zeichen von Abstoßungsreaktionen festgestellt (HÖLSCHER et al. 1999). Zudem konnte bestätigt werden, dass in SCID-Mäusen nach Transplantation boviner Lymphozyten hauptsächlich bovine T-Lymphozyten nachweisbar waren und dass sich bovine B-Lymphozyten in geringerer Zahl entwickelten (HÖLSCHER et al. 1999). Für die Einordnung der im Rahmen der vorliegenden Arbeit generierten Ergebnisse waren diese Feststellungen von großer Bedeutung.

2.4.2 Transplantation bovinen Gewebes

Auch die ersten Bemühungen zur Transplantation bovinen Gewebes in immundefiziente Mäuse stützten sich auf die diesbezüglichen Erfolge für humanisierte Mausmodelle (MCCUNE et al. 1988). Erste Transplantationsversuche bovinen fetalen Gewebes in SCID-Mäusen führten zwar zunächst zu einem erfolgreichen Engraftment, dies musste aber rasch zurückgewiesen werden, denn es konnten keine Auswanderung boviner Leukozyten in die Peripherie sowie Anzeichen für eine Funktionalität der Transplantate festgestellt werden (BOERMANS et al. 1992). Bereits BOERMANS et al. (1992) wiesen in der Folge darauf hin, dass für die Entwicklung eines vollumfänglichen bovinen Mausmodells die zusätzliche oder ausschließliche Transplantation von Stammzellen oder stammzellhaltigem Gewebe vonnöten sein könnte. DENNY et al. (1996) knüpften daran an und zeigten den Einfluss zusätzlich transplantierte fetaler Leber mittels verschiedenster Transplantationswege. Insbesondere die Transplantation an der inneren Bauchwand von SCID-Mäusen führte zu einem hohen Engraftment boviner Zellen sowie über den Nachweis boviner Antikörper zu einem Beleg der Rekonstitution und der Funktionalität boviner Zellen (DENNY et al. 1996). Die Transplantation bovinen fetalen Gewebes, insbesondere von Leber, Thymus und Lymphknoten, in SCID-Mäuse wurde in der Folge mehrfach vorgenommen und für diverse in-vivo-Modellversuche mit bovinen Infektionserregern genutzt (SMITH et al. 1999; HAAS et al. 2001; GATTO et al. 2006; ALVAREZ et al. 2009).

Dieser Ansatz soll im Rahmen der vorliegenden Arbeit aufgegriffen werden. Im Gegensatz zur Verwendung boviner fetaler Gewebestrukturen kommen hierbei allerdings erstmals isolierte sowie angereicherte bovine Vorläuferzellen zum Einsatz.

2.4.3 Infektionsversuche mit bovinen Infektionserregern

Infektionsversuche mit bovinen Infektionserregern im Modelltier Maus wurden bereits mehrfach durchgeführt (HAAS et al. 1993; SMITH et al. 1999; HAAS et al. 2001; GATTO et al. 2006; ALVAREZ et al. 2009). Dabei standen bisher das bovine Leukosevirus (HAAS et al. 1993), *Mycobacterium bovis* als Erreger der Rindertuberkulose (SMITH et al. 1999; ALVAREZ et al. 2009), *Trypanosoma congolense* als Auslöser der Nagana-Krankheit (HAAS et al. 2001) sowie *Mannheimia haemolytica* als einer der bakteriellen Erreger der enzootischen Bronchopneumonie (GATTO et al. 2006) im Fokus.

Für die in der Vergangenheit durchgeführten Untersuchungen konnten zwei grundsätzliche Herangehensweisen im Versuchstier Maus unterschieden werden. Zum einen wurden SCID-Mäusen Zellen infizierter Rinder verabreicht (HAAS et al. 1993). Zum anderen wurde SCID-Mäusen bovines fetales Gewebe (Leber, Thymus, Lymphknoten) transplantiert, um diesen sogenannten SCID-bo-Mäusen anschließend die jeweiligen bovinen Erreger zu injizieren (SMITH et al. 1999; HAAS et al. 2001; GATTO et al. 2006; ALVAREZ et al. 2009).

Insbesondere letzteres Modell erwies sich als sehr gute Grundlage für spezifische Untersuchungen zu Pathogenese sowie zu zellulären Mechanismen der Immunantworten des Rindes auf bestimmte bovine Infektionserreger. Lediglich GATTO et al. (2006) kamen zu dem Schluss, dass sich SCID-bo-Mäuse für Untersuchungen zu durch *Mannheimia haemolytica* verursachten bovinen Pneumonien weniger gut eignen.

HAAS et al. führten 1993 erste Versuche mit dem bovinen Leukosevirus und einem immunodefizienten Mausstamm durch. Hierbei wurden Lymphozyten aus dem peripheren Blut von mit dem bovinen Leukosevirus infizierten Rindern in SCID-Mäuse transplantiert. Die Versuchstiere entwickelten sechs Monate nach der Transplantation Lymphosarkome, in denen Zellen bovinen Ursprungs nachgewiesen werden konnten (HAAS et al. 1993).

Die Bedeutung einzelner T-Zell-Populationen, insbesondere der WC1-positiven $\gamma\delta$ T-Lymphozyten, bei der Immunantwort auf eine *Mycobacterium bovis*-Infektion konnte im SCID-bo-Modell durch SMITH et al. (1999) und ALVAREZ et al. (2009) aufgezeigt werden. Diese Untersuchungen lieferten wertvolle Hinweise für das Zusammenspiel zellulärer und humoraler Faktoren in der bovinen Immunabwehr.

HAAS et al. konnten 2001 den positiven Effekt einer anti-CD40-Behandlung in der Immunantwort von SCID-bo-Mäusen auf eine *Trypanosoma congolense*-Infektion nachweisen. In der Folge schätzten sie das vorliegende Mausmodell als ein wertvolles Instrument für weiterführende Untersuchungen zum Erreger der Nagana-Krankheit in Rindern ein (HAAS et al. 2001).

Auch die im Rahmen dieser Arbeit zu etablierenden innovativen bovinen Mausmodelle könnten zukünftig auf ähnliche Art und Weise eingesetzt und an die aufgeführten bisherigen Erfolge spezifischer boviner Krankheitsmodelle anknüpfen.

2.5 Bovines Nabelschnurblut

Im Gegensatz zu den bestehenden bovinen Mausmodellen soll die Herangehensweise im Rahmen der vorliegenden Arbeit verändert und an eine der etablierten Methoden zur Entwicklung humanisierter Mausmodelle angepasst werden. Hierfür sollen erstmals hämatopoetische Vorläuferzellen aus bovinem Nabelschnurblut zum Einsatz kommen. Die Nabelschnur beim Rind ist mit einer Länge von nur circa einem Viertel der Körperlänge des neugeborenen Kalbes relativ kurz und reißt daher bei der Geburt bereits intravaginal (SCHNORR und KRESSIN 2006). Es existieren wenige detaillierte Studien über die zelluläre Zusammensetzung bovinen Nabelschnurblutes. Lediglich die mesenchymalen Stammzellen und deren Isolation wurde bereits im Detail behandelt (RAOUFI et al. 2011; CARDOSO et al. 2012). RODRIGUES et al. (2010) beschäftigten sich mit der ultrastrukturellen Morphologie der im bovinen Nabelschnurblut enthaltenen Zellen und stellten fest, dass Vorläuferzellen der am häufigsten vorkommende Zelltyp im bovinen Nabelschnurblut sind. Hierbei wurden elektronenmikroskopisch insbesondere Vorläuferzellen erythrozytärer, neutrophiler, eosinophiler, basophiler, monozytärer und lymphatischer Zelllinien nachgewiesen (RODRIGUES et al. 2010). Die zelluläre Zusammensetzung des bovinen Nabelschnurblutes verändert sich im Laufe der Gestation. Im Nabelschnurblut neugeborener Kälber sind nur noch wenige Vorläuferzellen nachzuweisen, da diese den ausgereiften Zellstadien wichen (GRANDEL 2005). Die Anzahl der Leukozyten verdoppelt sich im letzten Drittel der Trächtigkeit (RÜSSE und SINOWATZ 1998), wobei gleichzeitig die Zahl kernhaltiger Erythrozyten abnimmt (GRANDEL 2005). Die hohen Leukozytenzahlen im Nabelschnurblut gegen Ende der Trächtigkeit sind laut GRANDEL (2005) hauptsächlich auf die Zunahme von Lymphozyten und Monozyten zurückzuführen.

2.6 Marker boviner hämatopoetischer Vorläuferzellen

Zur Selektion und Anreicherung boviner hämatopoetischer Vorläuferzellen aus dem bovinen Nabelschnurblut kommen in dieser Arbeit verschiedene Marker zum Einsatz, welche bereits aus dem humanmedizinischen Bereich bekannt sind (siehe Kapitel 2.3.2). Auch im bovinen Organismus konnten bereits die für humane hämatopoetische Vorläuferzellen bedeutenden Marker CD34 (ZHOU et al. 2001) und c-kit/-CD117 (KUBOTA et al. 1994) nachgewiesen werden.

Vergleichbar mit Studien in anderen Spezies, stellte sich auch beim Rind das **CD34**-Molekül als ein Marker für primitive hämatopoetische Vorläuferzellen sowie für Endothelien von Blutgefäßen heraus (NIKU et al. 2007). In fetalen Kälbern konnte die RNA des bovinen CD34-Moleküls in Gehirn, Milz, Herz und Lunge nachgewiesen werden (ZHOU et al. 2001). Zudem gilt das bovine Knochenmark als Quelle CD34-positiver hämatopoetischer Vorläuferzellen. Im Gegensatz zum Knochenmark adulter Rinder, dessen Zellen im Durchschnitt zu 14 % CD34-positiv sind, exprimieren 38 % der Zellen des fetalen Knochenmarks das CD34-Molekül (PESSA-MORIKAWA et al. 2012).

Eine Schwierigkeit in der Entwicklung spezifischer Antikörper gegen das bovine CD34-Molekül besteht allerdings in der Heterogenität der Allele des bovinen CD34-Gens

sowie in der Tatsache, dass beim Rind mindestens zwei Splice-Varianten existieren (SAKURAI et al. 2006; NIKU et al. 2007). Somit konnte in der Vergangenheit kein einheitlicher, für alle Varianten an Allelen spezifischer, boviner anti-CD34-Antikörper zur Verfügung gestellt werden. Die Homologie zwischen dem humanen und dem bovinen CD34-Molekül konnte auf 61,1 % beziffert werden (ZHOU et al. 2001), was den alternativen Einsatz humaner Antikörper für die vorliegende Arbeit ausschließt.

Auch der **c-kit**-Rezeptor konnte bereits beim Rind nachgewiesen werden (KUBOTA et al. 1994). Die Aminosäuresequenz des bovinen c-kit-Moleküls zeigte eine 83 %-ige Homologie zum Maus-Protein sowie eine 90 %-ige Homologie zum menschlichen Anagon (KUBOTA et al. 1994). Mit Hilfe spezifischer Antikörper gegen den bovinen c-kit-Rezeptor konnte das Vorkommen dieses Markers sowie die Morphologie dieser Zellfraktion in bovinem peripherem Blut und auch im Knochenmark von Kälbern bereits umfänglich untersucht werden (HIKONO et al. 1999; HIKONO et al. 2001b; HIKONO et al. 2001a). Im Durchschnitt exprimieren in etwa 1,5 % der Zellen des bovinen peripheren Blutes (HIKONO et al. 2001b) sowie 18,3 % der Zellen des bovinen fetalen Knochenmarks (HIKONO et al. 2001a) den c-kit-Rezeptor. Dies steht im Gegensatz zu den Gehalten des menschlichen und des murinen Knochenmarks, bei denen nur circa 2-5 % (BROUDY et al. 1992; REISBACH et al. 1993) beziehungsweise 7,8 % (OGAWA et al. 1991) der Zellen c-kit-positiv sind. Die Fraktion der c-kit-positiven Zellen des bovinen Knochenmarks besteht, ähnlich wie beim Menschen, zum großen Teil aus diversen hämatopoetischen Vorläuferzellen (HIKONO et al. 1999). Dies konnte durch Untersuchungen bestätigt werden, die zeigten, dass die meisten c-kit-positiven Zellen des bovinen Knochenmarks keine Marker spezieller Zelllinien koexprimieren (HIKONO et al. 2001a).

2.7 Ziele der vorliegenden Arbeit

Wie bereits einleitend dargelegt, soll im Rahmen der vorliegenden Arbeit ein innovatives Mausmodell des bovinen Immunsystems generiert werden. Bezug genommen wird hier zum einen auf in der Vergangenheit bereits durchgeführte Versuche zu bovinen Mausmodellen sowie zum anderen auf das etablierte und vielseitig einsetzbare System humanisierter Mäuse (siehe Kapitel 2.3).

Sowohl der hier verwendete Mausstamm als auch die Art der transplantierten Zellen kamen laut Literatur in Bezug auf bovine Mausmodelle bisher noch nicht zum Einsatz, was die Neuartigkeit der eigenen Untersuchungen unterstreicht. Die diesbezüglich bisher vorgenommenen Untersuchungen wurden entweder mit SCID-Mäusen (GREENWOOD und CROY 1993; HAAS et al. 1993; DENNY et al. 1996; GREENWOOD et al. 1997; HÖLSCHER et al. 1999) oder mit sogenannten SCID-BG Mäusen (BG: beige) (BOERMANS et al. 1992; SMITH et al. 1999; HAAS et al. 2001; GATTO et al. 2006; ALVAREZ et al. 2009) durchgeführt. Erkenntnisse zu ähnlichen Studien unter Verwendung anderer Mausstämmen liegen für bovine Mausmodelle bisher nicht vor. Der im Rahmen der vorliegenden Arbeit eingesetzte NSG-Mausstamm bietet aufgrund seiner ausgeprägten Immundefizienz ideale Voraussetzungen für die Transplantation sowie das Engraftment von Zellen mausfremder Spezies (siehe Kapitel 2.3). Dies konnte für die

Entwicklung humanisierter Mäuse bereits vielfach bestätigt werden (ITO et al. 2002; HIRAMATSU et al. 2003; ISHIKAWA et al. 2005; SHULTZ et al. 2005; WATANABE et al. 2007; MCDERMOTT et al. 2010) und soll im Folgenden erstmals auch auf die Entwicklung eines bovinen Mausmodells angewendet werden.

Neben der Verwendung dieses vielversprechenden Mausstammes kamen in der vorliegenden Arbeit für die Transplantation erstmals bovine Vorläuferzellen zum Einsatz. Bisher wurden zur Entwicklung boviner Mausmodelle bovine Leukozyten (GREENWOOD und CROY 1993; GREENWOOD et al. 1997) oder Lymphozyten (HÖLSCHER et al. 1999) des peripheren Blutes sowie bovinen fetales Gewebe (BOERMANS et al. 1992; DENNY et al. 1996; SMITH et al. 1999; HAAS et al. 2001; GATTO et al. 2006; ALVAREZ et al. 2009) transplantiert. Bereits 1992 stellten BOERMANS et al. fest, dass für ein vollständigeres Engraftment boviner Zellen im Organismus Maus bovine Stammzellen zum Einsatz kommen sollten (BOERMANS et al. 1992) (siehe Kapitel 2.4.2). Diesbezüglich wurde in der Folge zwar bereits auf bovinen fetales Gewebe, meist Lebergewebe, zurückgegriffen (DENNY et al. 1996; SMITH et al. 1999; HAAS et al. 2001; GATTO et al. 2006; ALVAREZ et al. 2009), isolierte bovine Vorläuferzellen kamen aber nie zum Einsatz. Indem diese im Rahmen der vorliegenden Arbeit erstmals für die Transplantation immundefizienter Mäuse verwendet werden, soll die vorhandene Lücke geschlossen und gleichzeitig die Grundlage für ein fortschrittliches Werkzeug in der Rindermedizin geschaffen werden.

Tiere, Material und Methoden

3.1 Verbrauchsmaterialien

Combitips Plus[®] (2,5 ml, 5 ml, 10 ml, 25 ml)

Eppendorf Vertrieb Deutschland GmbH, Wesseling-Berzdorf, D

Cryoröhrchen, 1,2 ml

Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, D

Pasteur/ Serum Pipette, steril

Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, D

Pipetten, serologische, steril, 10 ml, 25 ml, 50 ml

Sarstedt AG & Co. Kommanditgesellschaft, Nümbrecht, D

Pipettenspitzen, 0,5 – 20 μ l, Filtertips, universal

Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, D

Pipettenspitzen, 10 – 200 μ l, Filtertips, universal

Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, D

Pipettenspitzen, 10 μ l, 200 μ l, Tip StackPack

Sarstedt AG & Co. Kommanditgesellschaft, Nümbrecht, D

Pipettenspitzen, 100 – 1000 μ l, Easy Load

Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, D

Pipettenspitzen, 100 – 1000 μ l, Filtertips, universal

Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, D

Reagenzpack Scilvet-ABC	Scil animal care company GmbH, Viernheim, D
Reagiergefäß, 1,5 ml	Sarstedt AG & Co. Kommanditgesellschaft, Nümbrecht, D
Schraubverschluss-Röhrchen, 15 ml	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, D
Schraubverschluss-Röhrchen, 50 ml	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, D
Spritze Injekt [®] -F, 1 ml	B. Braun Melsungen AG, Melsungen, D
Spritze, BD Discardit [™] II, 5 ml, 10 ml	Becton Dickinson GmbH, Heidelberg, D
Spritze, BD Plastipak [™] , 50 ml	Becton Dickinson GmbH, Heidelberg, D
Spritzenvorsatzfilter PES-Membran, 0,22 µm, steril	Dr. Ilona Schubert Laborfachhandel, Leipzig, D
Zählkammer Deckgläser, 24 x 24 mm	neoLab Migge GmbH, Heidelberg, D

3.2 Laborgeräte

accu-jet [®] pro	BRAND GMBH + Co. KG, Wertheim, D
Applikator für Einmal-Kapillarpipetten	Hirschmann Laborgeräte GmbH & Co. KG, Eberstadt, D
FACSCanto [™] II	Becton Dickinson GmbH, Heidelberg, D
Kammer für Kohlenstoffdioxid approx. 15 cm x 15 cm x 30 cm	Völker GmbH, Kaltenkirchen, D
MACS, MultiStand	Miltenyi Biotec GmbH, Bergisch Gladbach, D
MACS, OctoMACS [™] Separator	Miltenyi Biotec GmbH, Bergisch Gladbach, D
MACS, QuadroMACS [™] Separator	Miltenyi Biotec GmbH, Bergisch Gladbach, D
Mikroskop, H 600 BS	Helmut Hund GmbH, Wetzlar, D
Mikroskop, Nikon Eclipse TE2000-E	Nikon GmbH, Düsseldorf, D

MR Hei-Mix L Magnetprüher	Heidolph Instruments GmbH & Co. KG, Schwabach, D
Multipette® plus	Eppendorf Vertrieb Deutschland GmbH, Wesseling-Berzdorf, D
Narkosekammer, 200 x 100 x 100 mm	World Precision Instruments Germany GmbH, Berlin, D
Neubauer-Zählkammer	neoLab Migge GmbH, Heidelberg, D
pH-Meter	
Pipetten, 0,2-2 µl, 2-10 µl, 10-100 µl, 50-200 µl, 200-1000 µl	Gilson International B.V., Limburg- Offheim, D
Präparierbesteck (feine Schere, Splitterpinzette, anatomische Pinzette)	Aesculap, Tuttlingen, D
Restraîner, ID = 31,75 mm	BioMedical Instruments, Zöllnitz, D
Röntgengerät SARRP	X-Strahl Ltd., Camberley, UK
Sartorius Waage BP 221 S	Sartorius AG, Göttingen, D
Scil Vet abc	Scil animal care company GmbH, Viernheim, D
TSE Vaporizer für Isoflurannarkose	TSE Systems GmbH, Bad Homburg, D
Vortexer VV3	VWR International GmbH, Darmstadt, D
Wasserbad WB10	P-D Management Industries-Technologies GmbH, Wilsdruff, D
Zentrifuge Mikro 200 R	Andreas Hettich GmbH & Co.KG, Tuttlingen, D
Zentrifuge, Kühl-, 5415 D	Eppendorf Vertrieb Deutschland GmbH, Wesseling-Berzdorf, D
Zentrifuge, Kühl-, 5804 R	Eppendorf Vertrieb Deutschland GmbH, Wesseling-Berzdorf, D

3.3 Software

FACSDiva™ Version 6.1.3	Becton Dickinson GmbH, Heidelberg, D
GraphPad Prism, Version 5	GraphPad Software, Inc., La Jolla, USA

3.4 Gewinnung bovinen Materials

Chemikalien

Heparin-Natrium-25.000-ratiopharm® Injektionslösung, 25.000 I.E./ 5 ml	Ratiopharm GmbH, Ulm, D
--	-------------------------

Kodan® Tinktur Forte	Schülke & Mayr GmbH, Norderstedt, D
----------------------	-------------------------------------

Verbrauchsmaterialien

BD Microlance™ 3 Kanülen, 18 G (Gauge), 1,20 x 40 mm	Becton Dickinson GmbH, Heidelberg, D
--	--------------------------------------

BD Microlance™ 3 Kanülen, 20 G, 0,9 x 40 mm	Becton Dickinson GmbH, Heidelberg, D
---	--------------------------------------

S-Monovette Luer, 7,5 ml EDTA	Sarstedt AG & Co. Kommanditgesellschaft, Nümbrecht, D
-------------------------------	--

S-Monovette Luer, 9 ml EDTA	Sarstedt AG & Co. Kommanditgesellschaft, Nümbrecht, D
-----------------------------	--

3.4.1 Gewinnung von Nabelschnurblut

Da die Nabelschnur des Rindes in der Länge nur etwa einem Viertel der Länge des neugeborenen Kalbes entspricht, reißt die Nabelschnur bei einer natürlichen Geburt sehr leicht ein (SCHNORR und KRESSIN 2006). Die Entnahme von bovinem Nabelschnurblut (NSB) wird dadurch erschwert. Eine Möglichkeit zur Entnahme besteht unmittelbar nach einer natürlichen Geburt. Hierzu wurde die Vene der intravaginal verbleibenden abgerissenen Nabelschnur punktiert und das Blut in 7,5- bis 9-ml-EDTA-Röhrchen aufgefangen. EDTA (Ethylendiamintetraessigsäure) wurde während der Blutgewinnung aufgrund der gerinnungshemmenden Eigenschaften eingesetzt.

Eine weitere Entnahmemöglichkeit bietet eine Sectio caesarea. Nach der Eröffnung des Uterus wurde die Nabelvene intrauterin punktiert und das zu aspirierende Blut in 7,5-ml-EDTA-Röhrchen aufgefangen.

Als dritte Variante wurde das Nabelschnurblut ungeborener und frischtoter Feten in einem Schlachtbetrieb gewonnen. Hierzu wurden mit einer Schere zunächst der Uterus

sowie die Fruchthüllen durchtrennt. Nach stumpfer Freipräparation der Nabelgefäße wurde die Nabelvene sowohl fetusnah als auch fetusfern abgeklemmt. Anschließend wurde das Gefäß zwischen den Klemmen mit einer 20 G-Kanüle punktiert und das Blut mit 7,5-ml-EDTA-Röhrchen aspiriert. Hierbei gestaltete sich die Aspiration unterschiedlich schwierig, da die Vene während der Aspiration oftmals kollabierte. Diese erschwerten Bedingungen hatten Auswirkungen auf die Menge des gewinnbaren Nabelschnurblutes (siehe Kapitel 4.1).

3.4.2 Gewinnung von peripherem Blut

Insbesondere im Hinblick auf eine vergleichende Analyse einzelner Parameter wurde neben dem stammzellreicheren Nabelschnurblut auch peripheres Blut (pB) als Quelle boviner Zellen verwendet. Zum einen kam bovines peripheres Blut zur Austestung einzelner Materialien und Antikörper zur Nutzung. Hierfür wurde peripheres Blut von adulten Rindern gewonnen. Zum anderen wurde Kälbern peripheres Blut entnommen. Dieses wurde anschließend auf dieselbe Art und Weise aufgearbeitet wie das Nabelschnurblut (siehe Kapitel 3.5.1), um in der Folge ebenfalls immundefizienten Mäusen transplantiert zu werden.

Peripheres Blut adulter Rinder wurde von Rindern in der Ambulatorischen und Geburtshilflichen Tierklinik der Veterinärmedizinischen Fakultät in Leipzig entnommen. Hierzu wurde die Schwanzvene von ventral mit einer Kanüle (18 bis 20 G) punktiert und das Blut in 7,5- oder 9-ml-EDTA-Röhrchen aufgefangen.

Die Gewinnung peripheren Blutes von Kälbern fand während der Schlachtung zum Zwecke der Lebensmittelgewinnung statt. Die Schlachtungen wurden explizit für die Blutprobengewinnung durchgeführt, um möglichst große Mengen an Blut auffangen zu können. Die Kälber wurden mittels eines Bolzenschussgerätes betäubt und anschließend über einen präzisen Kehlschnitt und darauffolgendes Entbluten getötet. Während des Entblutens wurde der Kopf des Kalbes überstreckt, um das Blut möglichst ohne Verunreinigungen in einem mit Antikoagulans benetzten Gefäßen aufzufangen. Als Antikoagulans wurde in diesem Fall Heparin eingesetzt (15.000 I.E. Heparin-Natrium pro 500 ml Blut).

3.5 Aufarbeiten des bovinen Materials

3.5.1 Dichtegradientenzentrifugation

Chemikalien

Acid-Citrate-Dextrose-Lösung (ACD)

Sigma-Aldrich Chemie GmbH,
München, D

Aqua B. Braun

B. Braun Melsungen AG, Melsungen, D

Dextran 40 aus <i>Leuconostoc</i> spp.	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, D
Dimethylsulfoxid (DMSO)	AppliChem GmbH, Darmstadt, D
Dulbecco's PBS ohne Mg ²⁺ + Ca ²⁺ , steril (1 x)	PAA Laboratories GmbH, Cölbe, D
Dulbecco's PBS ohne Mg ²⁺ + Ca ²⁺ , steril (10 x)	PAA Laboratories GmbH, Cölbe, D
Ethylendiamintetraessigsäure, ≥ 99 %, p.a., ACS	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, D
fetales Kälberserum, hitzeinaktiviert	Thermo Fisher Scientific GmbH, Dreieich, D
Histopaque [®] -1083, 1,083 g/ml	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, D
Natriumchlorid, ≥ 99,5 %, p.a., ACS, ISO	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, D
Pancoll human, 1,077 g/ml	PAN-Biotech GmbH, Aidenbach, D
Percoll [®] PLUS, 11	GE Healthcare GmbH, Solingen, D
RPMI 1640 mit stabilem Glutamin, mit Phenolrot	PAA Laboratories GmbH, Cölbe, D
Trypanblau 4 g/l in wässriger Lösung	VWR International GmbH, Darmstadt, D
Türks Lösung	VWR International GmbH, Darmstadt, D
Verbrauchsmaterialien	
SepMate [™] -50 Tube	Stemcell [™] Technologies Germany GmbH, Köln, D

Um die Gewinnung boviner hämatopoetischer Vorläuferzellen zu ermöglichen, mussten zunächst mittels Dichtegradientenzentrifugation (DGZ) die mononukleären Zellen des bovinen peripheren Blutes sowie des bovinen Nabelschnurblutes isoliert werden. Die hämatopoetischen Vorläuferzellen finden sich in der Zellfraktion der Lymphozyten wieder, die wiederum über die DGZ als Teil der sogenannten bPBMC (**b**ovine **p**eripheral **b**lood **m**ononuclear **c**ells) sowie im Falle des Nabelschnurblutes als Teil der bCBMC (**b**ovine **c**ord **b**lood **m**ononuclear **c**ells) gewonnen werden konnten (JAGANNATH et al. 1987; PERTOFT 2000). Die Fraktion der bPBMC/ bCBMC beinhaltet zum einen die Lymphozyten sowie zusätzlich dazu die Monozyten, die Makrophagen und die den-

dritischen Zellen. Die übrigen Zelltypen, vornehmlich Erythrozyten und Granulozyten, weisen eine höhere Dichte als die bPBMC/ bCBMC auf (PERTOFT 2000). Diese physikalischen Unterschiede macht man sich bei der DGZ zunutze. Der zusätzliche Einsatz spezifischer Dichtemedien führt zu einer deutlicheren Trennung der einzelnen Zellfraktionen und ermöglicht somit eine erleichterte Gewinnung dieser.

Folgende allgemeine Vorgehensweise galt im Rahmen der vorliegenden Arbeit für die DGZ, variierte aber im Rahmen der notwendigen Etablierungsarbeiten einer geeigneten Methode für das bovine Material bezüglich einzelner Parameter (siehe Kapitel 4.1.1). Das Ausgangsmaterial Blut wurde zunächst mit einem bestimmten Teil angewärmter PBS/-EDTA-Lösung (PBS: phosphate-buffered saline/ phosphatgepufferte Salzlösung) verdünnt. In einem zuvor mit Dichtemedium befüllten Schraubverschluss-Röhrchen (50 ml) wurde ein Teil dieses verdünnten Blutes dann vorsichtig über das Dichtemedium geschichtet. Anschließend folgte ein 20- bis 30-minütiger Zentrifugationsschritt bei 600-800 x g (Zentrifugationsbeschleunigung) und Raumtemperatur (RT). Die sich im Anschluss deutlich abzeichnende Schicht der bPBMC/ bCBMC wurde mit einer Pasteurpipette abgesaugt und mit mindestens derselben Menge PBS/EDTA verdünnt. Es folgte eine erneute Zentrifugation für 10 Minuten (min) bei 500 x g und bei Raumtemperatur. In den sich anschließenden zwei Waschschrritten wurde das Zellpellet jeweils mit 50 ml PBS/EDTA gelöst und bei 300 x g für 5 Minuten und bei einer Temperatur von 4 °C zentrifugiert.

Zu Etablierungszwecken wurde die Methode der Dichtegradientenzentrifugation auch mit sogenannten SepMate™-Tubes (StemCell™) durchgeführt. Diese wurden entsprechend der Herstellerangaben eingesetzt. Durch die mittige Öffnung in der Kunststofflamelle wurden 15 ml des Dichtemediums vorsichtig und möglichst luftblasenfrei eingefüllt. Darauf wurden 20 ml des Blut-PBS-Gemisches gegeben. Gemäß Herstellervorgaben folgte daraufhin ein vergleichsweise kurzer Zentrifugationsschritt (10 min; bei über 24 Stunden alten Proben 20 min) mit höherer Zentrifugationsgeschwindigkeit (1200 x g), normaler Bremse und bei Raumtemperatur. Um die optimale Methode für das verwendete bovine Material zu finden, wurden auch unter Verwendung der SepMate™-Tubes mehrere Einzelparameter des Versuchsaufbaus variiert. Zum einen wurden zwei verschiedene Dichtemedien verwendet, Pancoll mit einer Dichte von 1,077 g/ml und ein selbst hergestelltes Medium mit einer Dichte von 1,083 g/ml (siehe Kapitel 4.1.1). Zum anderen wurden Probenmaterial und PBS in unterschiedlichen Verdünnungsverhältnissen eingesetzt.

Auch unter Verwendung der SepMate™-Tubes wurden nach dem eigentlichen Separierschritt und dem Abgießen der Schicht boviner mononukleärer Zellen ein weiterer Waschschrtritt mit einer Zentrifugation bei 500 x g und Raumtemperatur sowie zwei weitere Waschschrtritte bei 300 x g und bei einer Temperatur von 4 °C durchgeführt. Verwendet wurde als Waschmedium im Allgemeinen eine Mischung aus PBS und EDTA. Hierfür wurden 500 ml sterile PBS-Lösung mit 1,5 ml einer zuvor sterilfiltrierten 100 mM EDTA-Lösung versetzt.

Während der Etablierung wurde unter anderem ein selbst hergestelltes Dichtemedium

verwendet. Da sich in der Literatur zur Dichtegradientenzentrifugation bovinen Blutes und in eigenen Untersuchungen die Verwendung eines Dichtemediums mit einer Dichte von 1,083 g/ml als erfolgreich erwies (URBAN-CHMIEL et al. 2011), wurde das selbst hergestellte Medium ebenfalls auf diese Dichte eingestellt. Hierzu wurde als Ausgangslösung Percoll® PLUS verwendet. Dabei handelt es sich um eine kolloidale Trennlösung aus Kieselsol, welche über eine geringe Viskosität verfügt und aus diesem Grund ideal für die Erzeugung von Dichtegradienten während einer Zentrifugation bestimmter Zellsuspensionen geeignet ist. Außerdem kann Percoll® PLUS zur Herstellung einer Arbeitslösung gewünschter Dichte verwendet werden. Letztere Eigenschaft wurde im Rahmen dieser Arbeit genutzt. Die Vorgehensweise sowie die zu Grunde liegende Formel wurden dem Hersteller-Datenblatt entnommen und werden im Folgenden kurz zusammengefasst.

Zur Herstellung eines Dichtemediums mit einer Dichte von 1,083 g/ml wurde aus Natriumchlorid (NaCl) und VE-Wasser (vollentsalztes Wasser) zunächst eine 1,5 molare Natriumchlorid-Lösung hergestellt und mittels eines Spritzenvorsatzfilters mit einer Porengröße von 0,22 μm sterilfiltriert. Zur Herstellung des Dichtemediums wurde diese Lösung zu einem Zehntel des benötigten Gesamtvolumens an Dichtemedium vorgelegt. Anschließend wurde das vorher mit folgender Formel berechnete Volumen Percoll® PLUS zu der NaCl-Lösung hinzugegeben.

$$V_0 = V \cdot \frac{193}{325}$$

V_0 = benötigte Menge an unverdünntem Percoll® PLUS
 V = gewünschtes Gesamtvolumen des Dichtemediums

Zum Schluss wurde auf das gewünschte Gesamtvolumen an Dichtemedium (= V) mit einer sterilen Spüllösung (Aqua B. Braun, B. Braun Melsungen AG, Melsungen, D) aufgefüllt. Zur Verifizierung der errechneten Dichte von 1,083 g/ml wurde ein Aräometer eingesetzt.

Nach den der DGZ folgenden Waschschriften wurde die Gesamtzellzahl an gewonnenen bPBMC/ bCBMC bestimmt. Hierzu wurde die jeweilige Zellsuspension zu gleichen Teilen mit Türks Lösung versetzt und unter Verwendung einer Neubauer-Zählkammer manuell gezählt. Die Türks Lösung diente der Lyse einzelner noch enthaltener Erythrozyten sowie der Anfärbung zu zählender Leukozyten.

Anschließend wurden die bovinen mononukleären Zellen zur späteren Verwendung eingefroren. Das hierfür verwendete Medium wurde zunächst aus folgenden Reagenzien hergestellt: 40 % RPMI 1640 (RPMI: Roswell Park Memorial Institute Medium), 25 % Dextran-Lösung, 20 % Dimethylsulfoxid (DMSO), 10 % Fetales Kälberserum (FKS), und 5 % ACD-Lösung (Acid-Citrate-Dextrose). Die Dextranlösung wurde hergestellt aus 50 g Dextran 40 und 9 g Natriumchlorid, welche in 500 ml destilliertem Wasser gelöst wurden.

Zum Einfrieren wurden je 5×10^7 der mittels DGZ gewonnenen bPBMC/ bCBMC in einer Lösung aus 500 μl RPMI und 10 % FKS resuspendiert und daraufhin in 500 μl

Einfriermedium aufgenommen. Eingefroren wurden diese Zellsuspensionen in 1,2 ml-Cryoröhrchen bei einer Temperatur von -80 °C.

Wie im Kapitel 4.1.1 ausführlich dargelegt, erwies sich für die DGZ die Verwendung der SepMate™-Tubes gemäß Herstellervorgaben als erfolgreich und wurde deshalb im Weiteren für die Aufarbeitung bovinen Nabelschnurblutes sowie bovinen peripheren Blutes verwendet. Als Dichtemedium wurde hierbei Pancoll (1,077 g/ml) eingesetzt.

3.5.2 Stammzellisolierung

Chemikalien

autoMACS® Rinsing Solution	Miltenyi Biotec GmbH, Bergisch Gladbach, D
Desoxyribonuclease I bovine, ≥ 3.000 units/ mg	AppliChem GmbH, Darmstadt, D
Desoxyribonuclease I bovine, ≥ 5.000 units/ mg	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, D
Dulbecco's PBS ohne Mg ²⁺ + Ca ²⁺ , steril (1 x)	PAA Laboratories GmbH, Cölbe, D
Dulbecco's PBS ohne Mg ²⁺ + Ca ²⁺ , steril (10 x)	PAA Laboratories GmbH, Cölbe, D
fetales Kälberserum, hitzeinaktiviert	Thermo Fisher Scientific GmbH, Dreieich, D
Magnesiumchlorid-Lösung, 25 mM	Promega GmbH, Mannheim, D
RPMI 1640 mit stabilem Glutamin, mit Phenolrot	PAA Laboratories GmbH, Cölbe, D
Trypanblau 4 g/l in wässriger Lösung	VWR International GmbH, Darmstadt, D
Türks Lösung	VWR International GmbH, Darmstadt, D

Verbrauchsmaterialien

MACS® -Separation Filter	Miltenyi Biotec GmbH, Bergisch Gladbach, D
--------------------------	--

MACS [®] -Separation LS Columns	Miltenyi Biotec GmbH, Bergisch Gladbach, D
MACS [®] -Separation MS Columns	Miltenyi Biotec GmbH, Bergisch Gladbach, D

Bevor die mittels Dichtegradientenzentrifugation gewonnenen bPBMC/ bCBMC einer der Methoden zur Stammzellisolierung zugeführt wurden, mussten diese zunächst aufgetaut werden.

Hierfür wurden die Zellen schonend aber zügig mittels körperwarmer RPMI-Lösung sowie DNase-Puffer (DNase + Fetales Kälberserum, hitzeinaktiviert, 0,5 % + MgCl₂ + PBS) aufgetaut, einmal gewaschen (300 x g, 8 min, RT) und für die anschließende Zellzählung 20 µl der Suspension in einer Neubauer-Zählkammer zu gleichen Teilen mit Türks Lösung versetzt.

Anschließend erfolgte, je nach Zielstellung, entweder eine positive oder eine negative Selektion boviner hämatopoetischer Vorläuferzellen.

Zur Positivselektion von Stammzellen sowie zur Anreicherung von Stammzellen mittels T-Zell-Depletion wurde eine magnetische Separationsmethode angewendet. Das Prinzip beruht auf der Markierung der zu selektierenden Zellen mit magnetischen Beads. Werden diese so markierten Zellen über eine ebenfalls magnetische Säule gegeben, bleiben die markierten Zellen aufgrund der elektrostatischen Wechselwirkungen in der Säule hängen und können somit von den unmarkierten Zellen isoliert werden. Letztere durchlaufen in der Trägerlösung die Säule ohne gebunden zu werden und können in einem Auffanggefäß unterhalb der Säule aufgefangen werden. Die benannten magnetischen Säulen werden vom Hersteller in zwei verschiedenen Varianten zur Verfügung gestellt, den sogenannten MS- und LS-Säulen. Diese unterscheiden sich anhand Größe und Kapazität. Welche Säulenvariante zum Einsatz kam, hing von der pro Einzelsäule zu verwendenden Menge an Zellen ab. Die Tabelle 2 gibt darüber einen Überblick und zeigt gleichzeitig, anhand welcher Kriterien im Rahmen dieser Arbeit die Auswahl der pro Versuchsvorhaben verwendeten Säulenvariante vorgenommen wurde.

Tab. 2: Übersicht der für die magnetische Zellseparation pro Säulengröße maximal zu verwendenden Zellzahlen pro Säule

	Maximalzahl magnetisch markierter Zellen	Maximalzahl der insgesamt pro Säule eingesetzter Zellen
MS-Säulen	1 x 10 ⁷	2 x 10 ⁸
LS-Säulen	1 x 10 ⁸	2 x 10 ⁹

Je nachdem, ob die benötigten oder die unerwünschten Zellpopulationen markiert werden, kann die beschriebene Separationsmethode zur Erreichung unterschiedlicher Ziele

genutzt werden.

Eine qualitative Aussage über die Zellen wurde unter anderem anhand der Vitalität getroffen. Die Vitalität der Zellen wurde zu unterschiedlichen Zeitpunkten bestimmt. Zum einen nach dem Auftauen und somit vor der Separation, um eventuelle nachteilige Einflüsse durch den Einfrier- und Auftauprozess quantifizieren zu können. Zum anderen nach der Stammzellseparation und somit unmittelbar vor der Transplantation, um die Qualität der zu transplantierenden Zellen einschätzen zu können.

Zur Bestimmung der Zellvitalität wurden 10 μl der Zellen zu gleichen Teilen mit Trypanblau versetzt und mit Hilfe einer Neubauer-Zählkammer ausgezählt. Trypanblau ist ein Farbstoff, mit dem man vitale, nicht angefärbte Zellen von toten, angefärbten unterscheiden kann. Der saure Farbstoff gelangt nicht durch die Zellmembran vitaler Zellen und die Zellen erscheinen im Lichtmikroskop weiß. Tote Zellen werden durch den Farbstoff dunkelblau angefärbt und können somit deutlich von den vitalen Zellen unterschieden werden.

3.5.2.1 Positive Separation

Zur Etablierung einer geeigneten Vorgehensweise für die positive Separation boviner hämatopoetischer Vorläuferzellen wurde zunächst auf einen bovinen CD34-Antikörper zurückgegriffen, der bereits in Studien der Arbeitsgruppe um Dr. Michiharu Sakurai (National Institute of Agrobiological Sciences, Tsukuba, Ibaraki, Japan) verwendet wurde (SAKURAI et al. 2006; MERKWITZ et al. 2011). Da dieser Antikörper nur in unkonjugierter Form vorlag, der Isotyp aber bekannt war, wurden für die Separation IgG-MicroBeads verwendet.

Zudem wurde die positive Separation mit einem kommerziell erhältlichen, anti-bovinen anti-c-kit-Antikörper durchgeführt, der mit dem Fluorochrom PE (Phycoerythrin) gekoppelt war. Als magnetische Beads wurden hierfür Anti-PE-Beads verwendet. Eine Übersicht der für die positive Separation verwendeten Antikörper sowie der entsprechenden Microbeads kann der Tabelle 3 auf Seite 27 entnommen werden.

Bis auf die verwendete Konzentration der verschiedenen Antikörper war die Vorgehensweise der positiven Separationen nahezu identisch, wird im Nachfolgenden aber nur für die Separation c-kit-positiver Zellen ausgeführt.

Nach dem notwendigen Auftauprozess sowie der anschließenden Zellzählung (siehe Kapitel 3.5.1) wurden die übrigen Zellen gewaschen (300 x g, 8 min, RT) und das Zellpellet mit den entsprechenden Mengen an Puffer (MACS[®]-Puffer = MACS[®] Rinsing Solution + 5 % FKS) (100 μl pro 1×10^7 Zellen) und anti-c-kit-Antikörper (5 μl pro 1×10^6 Zellen) versetzt und für 30 min bei 4 °C inkubiert. Im Anschluss wurden die Zellen zweimal gewaschen (300 x g, 8 min, RT), in Puffer gelöst (80 μl pro 1×10^7 Zellen), das Zellpellet mit der entsprechenden Menge Anti-PE-Beads (20 μl pro 1×10^7 Zellen) versetzt und für 15 min bei 4 °C im Dunkeln inkubiert. In einem weiteren Waschschrift (300 x g, 8 min, RT) wurden die nicht gebundenen Anti-PE-Beads entfernt und das Zellpellet erneut in Puffer gelöst (500 μl pro magnetische Säule).

Im nächsten Schritt erfolgte die magnetische Separation der mit anti-c-kit-PE-Antikörpern und anti-PE-Beads markierten Zellen. Verwendet wurden für diese Positivselektion MS-Säulen, und zwar eine Säule pro 1×10^8 Zellen (siehe Tabelle 2 auf Seite 25).

Tab. 3: Zusammenfassung der für die positive Separation boviner hämatopoetischer Vorläuferzellen verwendeten Antikörper und MicroBeads

Antigen	Klon	Isotyp	Fluorochrom	Konzentration	Hersteller
CD34	N21	IgG	-	1:50	Dr. M. Sakurai, National Institute of Agrobiological Sciences, Tsukuba, Ibaraki, Japan
Anti- Mouse IgG MicroBe- ads					Miltenyi Biotec GmbH, Bergisch Gladbach, D
CD117/ c-kit	104D2	IgG1	PE	1:20	Acris Antibodies GmbH, Herford, D
Anti-PE- Microbeads					Miltenyi Biotec GmbH, Bergisch Gladbach, D

Die im Puffer gelösten Zellen wurden dazu auf eine mit einem Zellsieb bedeckte MS-Säule gegeben und diese mehrfach mit Puffer gewaschen. Das benutzte Zellsieb diente dazu, die magnetische Säule nicht durch möglicherweise verklumpte Zellansammlungen zu verstopfen. Die über magnetische Beads markierten c-kit-positiven Zellen blieben bei diesem Vorgehen in den ebenfalls magnetischen Säulen hängen. Die unmarkierten Zellfraktionen hingegen liefen durch die Säule hindurch. Die c-kit-Fraktion wurde mittels Puffer und Stempeln mechanisch aus den Säulen gespült, auf diese Weise von den Magneten getrennt und anschließend in ein neues Schraubverschluss-Röhrchen (15 ml) überführt. Um die Reinheit der isolierten Zellen noch weiter zu erhöhen, wurden diese Schritte mit den c-kit-positiven Zellen unter Verwendung einer neuen Säule wiederholt. Aus der Säule wurde wieder mit Hilfe eines Stempels die nun aufgereinigte c-kit-positive Zellfraktion vom Magneten gelöst und in ein Eppendorf-Gefäß überführt. Anschließend erfolgte die Zählung der auf diese Weise gewonnenen Zellen mit Trypanblau. Anhand der ermittelten Zahl vitaler Zellen wurde die Anzahl zu transplantierender neugeborener Mäuse festgelegt (siehe Kapitel 3.6.4).

3.5.2.2 T-Zell-Depletion

Ergänzend zur positiven Separation wurde im Rahmen der vorliegenden Arbeit eine T-Zell-Depletion durchgeführt. Da die Antikörper gegen bovine Vorläuferzellen nur in eingeschränktem Maß zur Verfügung standen und das Ziel dieser Arbeit (siehe Kapitel 2.7) mittels Anwendung mehrerer Methoden möglichst verlässlich erreicht werden sollte, kam diese zusätzlich zum Einsatz.

Die Depletion beruht auf einem ähnlichen Prinzip wie die unter Kapitel 3.5.2.1 aufgeführte positive Separation, wurde allerdings genau entgegengesetzt, als Negativselektion, durchgeführt. Negativ selektiert wurden im Rahmen der vorliegenden Arbeit die T-Lymphozyten. Diese sogenannte T-Zell-Depletion wurde vorgenommen, da die T-Lymphozyten bei der Transplantation von Fremdzellen in einen Organismus (hier: Maus) eine Abstoßungsreaktion verursachen können, die sogenannte GvHD (Graft-versus-Host Disease) (HÖLSCHER et al. 1999; GOKER et al. 2001; SHLOMCHIK 2007; NORELLI et al. 2016).

Im Falle beider Separationsmethoden wurden die gewünschten Zellen zunächst über spezifische Antikörper und anschließend über magnetische Beads markiert, mit Hilfe derer die Zellen ebenfalls magnetisch isoliert werden konnten. Im Unterschied zu einer Positivselektion sollten bei der hier als Negativselektion durchgeführten T-Zell-Depletion die nicht magnetisch markierten Zellen für die anschließende Transplantation gewonnen und weiterverwendet werden. Die Methoden unterschieden sich insofern insbesondere am Ende der Aufarbeitung voneinander.

Für die beabsichtigte T-Zell-Depletion wurden die Zellen mit drei verschiedenen T-Zell-Antikörpern markiert, einem anti-WC1-, einem anti-CD4- sowie einem anti-CD8-Antikörper (siehe Kapitel 2.2 sowie Tabelle 1), die jeweils an das Fluorochrom FITC (Fluoresceinisothiocyanat) gekoppelt waren. Eine Zusammenfassung der für die T-Zell-Depletion verwendeten Antikörper sowie der entsprechenden Microbeads ist der folgenden Tabelle 4 zu entnehmen.

Tab. 4: Zusammenfassung der für die T-Zell-Depletion verwendeten Antikörper und MicroBeads

Antigen	Klon	Isotyp	Fluorochrom	Konzentration	Hersteller
CD4	CC8	IgG2a	FITC	1:40	Thermo Fisher Scientific GmbH, Dreieich, D
CD8	38.65	IgG2a	FITC	1:40	Thermo Fisher Scientific GmbH, Dreieich, D
WC1	CC101	IgG2a	FITC	1:20	Bio-Rad Laboratories GmbH (ehemals: AbD Serotec), München, D
Anti-FITC MicroBeads					Miltenyi Biotec GmbH, Bergisch Gladbach, D

Das Auftauen sowie die Zählung der bovinen PBMC/ CBMC wurden zunächst analog zu den bereits beschriebenen Verfahren durchgeführt (siehe Kapitel 3.5.1 und Kapi-

tel 3.5.2). Nach der Zählung wurden die Zellen gewaschen (300 x g, 8 min, RT) und das Zellpellet mit den entsprechenden Mengen an Puffer (MACS[®]-Puffer = MACS[®] Rinsing Solution + 5 % FKS) (100 μ l pro 1×10^7 Zellen) und Antikörpern (5 μ l WC1, 2,5 μ l CD4, 2,5 μ l CD8 pro 1×10^6 Zellen) versetzt und für 20 min bei 4 °C inkubiert. Im Anschluss wurden die Zellen zweimal gewaschen (300 x g, 8 min, RT), in Puffer gelöst (80 μ l pro 1×10^7 Zellen) und das Zellpellet mit der entsprechenden Menge Anti-FITC-Beads (10 μ l pro 1×10^7 Zellen) versetzt. Die Inkubationszeit betrug 15 min bei 4 °C im Dunkeln. Nun wurden in einem weiteren Waschschrift (300 x g, 8 min, RT) die nicht gebundenen Anti-FITC-Beads entfernt und das Zellpellet erneut in Puffer gelöst (500 μ l pro magnetische Säule). Je nach Höhe der vorliegenden Zellzahl wurden für die Separation entweder MS- oder LS-Säulen verwendet (siehe Tabelle 2 auf Seite 25).

Die Zellsuspensionen wurden daraufhin mit anschließenden Spülschritten über die jeweiligen Säulen gegeben. Aus der die Säule direkt durchlaufenden Suspension resultierte pro Probe die Zellfraktion, welche neben anderen Zelltypen auch bovine Vorläuferzellen enthielt (im Folgenden SeF: Stammzell-enhaltende Fraktion genannt). In den magnetischen Säulen wiederum befanden sich, magnetisch gebunden, die zu selektierenden T-Lymphozyten.

Wurden über die magnetischen Säulen mehr als 5 ml Zellsuspension gewonnen, wurde diese anschließend erneut zentrifugiert (300 x g, 7 min, 4 °C), das Zellpellet in Puffer gelöst und nochmals über eine neue Säule gegeben, um die eventuell noch vorhandenen, mit magnetischen Beads markierten T-Lymphozyten zu selektieren.

Zur Quantifizierung und Qualifizierung der isolierten SeF wurden 10 μ l dieser zu gleichen Teilen mit Trypanblau versetzt und in einer Neubauer-Zählkammer die Gesamtzellzahl sowie zeitgleich die Zellvitalität bestimmt.

Die Anzahl der zuvor selektierten T-Lymphozyten konnte auf dieser Basis rechnerisch bestimmt werden. Hierfür wurde die ermittelte Zellzahl der SeF (im Trypanblau vitale und tote Zellen) von der Ursprungszellzahl an bPBMC/ bCBMC der jeweils verwendeten Probe subtrahiert.

Transplantiert wurden im Falle neugeborener Mäuse 2×10^6 Zellen, und im Falle adulter Tiere 1×10^7 Zellen. Das hierfür benötigte Volumen der gewonnenen SeF wurde in 1,5 ml Reaktionsgefäße überführt und zentrifugiert (300 x g, 7 min, 4 °C). Der Überstand wurde anschließend vorsichtig entfernt und das Zellpellet in RPMI + 10 % FKS resuspendiert. Die Zellsuspensionen wurden dann den Mäusen transplantiert (Neugeborene intrahepatisch: 50 μ l pro Tier; Adulte intravenös: 100-150 μ l pro Tier; siehe auch Kapitel 3.6.4).

3.6 Tierexperimentelle Methoden

Die im Rahmen der vorliegenden Arbeit durchgeführten tierexperimentellen Methoden setzten nach § 8 Absatz 1 des Tierschutzgesetzes eine Genehmigung voraus. Die Genehmigung wurde am 19. Mai 2016 unter der Registriernummer TVV 30/15 von der Landesdirektion Sachsen (Braustraße 2, 04107 Leipzig) erteilt.

Alle Arbeiten an den NSG Mäusen wurden aufgrund der ausgeprägten Immundefizienz des Mausstammes ausschließlich unter laufender Laminar Air Flow Werkbank sowie mit Einmalhandschuhen und entsprechender Hygienebekleidung durchgeführt.

3.6.1 Versuchstiere

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden sogenannte NSG Mäuse (NOD.Cg-Prkdc-*scid*^{112rg^{tm1Wjl}) eingesetzt. Diese zeichnen sich durch eine stark ausgeprägte Immundefizienz aus (siehe Kapitel 2.3). Die Haltung erfolgte aus diesem Grund in einzeln belüfteten Käfigsystemen, sogenannten IVCs (individually ventilated cages), und gemäß der FELASA Kriterien (FELASA: Federation of European Laboratory Animal Science Associations). Die Tiere wurden mit autoklaviertem Pelletfutter und Trinkwasser versorgt. Auch Einstreu und Nistbaumaterial wurden vor der Verwendung autoklaviert. Die Tiere stammten aus dem „Jackson Laboratory“ in Bar Harbor, Maine (USA) und wurden über Charles River Laboratories in Sulzfeld, Deutschland bezogen.}

3.6.2 Präkonditionierung durch Bestrahlung

Vor der Transplantation boviner Zellen wurden die neugeborenen und auch die adulten Mäuse einer subletalen Röntgenstrahlung ausgesetzt. Dies wurde mit einem 220 Kilovolt Röntgengerät SARRP der Firma X-Strahl Ltd., Camberley, UK vorgenommen. In der Literatur konnte mehrfach nachvollzogen werden, dass diese sogenannte Präkonditionierung der Mäuse für das Anwachsen der transplantierten Fremdzellen von großer Bedeutung ist (GREENWOOD und CROY 1993; ROBERT-RICHARD et al. 2006). Damit sollte sowohl das Knochenmark auf die zu transplantierenden Zellen vorbereitet, als auch das Anwachsen der bovinen Zellen verbessert werden.

Dazu wurden die neugeborenen Mäuse 24 bis 48 Stunden nach der Geburt mit einer subletalen Dosis von 1 Gy bestrahlt. Die adulten Tiere wurden vor der Transplantation mit einer Dosis von 2 Gy bestrahlt.

3.6.3 Markierung der Tiere

Chemikalien

Tätowierpaste, schwarz, Tube

RAIDEX GmbH, Dettingen, D

Verbrauchsmaterialien

Sterican[®] Einmalkanülen, 26 G, 0,45
x 25 mm

B. Braun Melsungen AG, Melsungen, D

Da die einzelnen neugeborenen Mäuse noch nicht voneinander zu unterscheiden waren, dies aber aufgrund der notwendigen eindeutigen Zuordnung erforderlich war, wurden diesen nach einem speziellen System die Flächen der Pfoten tätowiert. Hierzu wurde die jeweilige Pfoteninnenfläche mit einer Kanüle oberflächlich angestochen und darauf anschließend etwas Tätowierpaste gründlich einmassiert. Das Tätowierschema wird im Anhang aufgeführt (siehe Abbildung 26 auf Seite 115).

3.6.4 Transplantation und Versuchsgruppen

Chemikalien

fetales Kälberserum, hitzeinaktiviert	Thermo Fisher Scientific GmbH, Dreieich, D
RPMI 1640 mit stabilem Glutamin, mit Phenolrot	PAA Laboratories GmbH, Cölbe, D

Verbrauchsmaterialien

Spritze Omnican [®] -F, 0,30 x 12 mm/ G 30, 1 ml	B. Braun Melsungen AG, Melsungen, D
--	-------------------------------------

Um die im Rahmen der Arbeit durchgeführten unterschiedlichen Aufarbeitungsmethoden des bovinen Materials mit den in der Vergangenheit entwickelten bovinen und humanen Mausmodellen zu verknüpfen, wurden für diese Arbeit verschiedene Transplantationswege gewählt. Daraus ergaben sich die in der Tabelle 5 aufgeführten Versuchsgruppen (VG) samt angegebenen Gruppengrößen (n).

Tab. 5: Überblick über die im Rahmen der vorliegenden Arbeit gebildeten Versuchsgruppen

		Beschreibung	Gruppengröße
Versuchsgruppe A - VG A	NSB	Transplantation von CD34-positiven oder c-kit-positiven Zellen	n = 1 (CD34+); n = 4 (c-kit+)
Versuchsgruppe B - VG B		Transplantation der von T-Lymphozyten befreiten Stammzell-enthaltenden Zellfraktion (SeF)	<i>n = 19</i>
<i>Neugeborenen</i> <i>(neugeb.)</i>	NSB		n = 10
	pB		n = 7
<i>Adult</i>	NSB		n = 2

Die über positive oder negative Selektion gewonnenen bovinen Zellfraktionen wurden, je nach selektierter Zellzahl, jeweils mehreren Mäusen oder sogar gesamten Würfen transplantiert. Hieraus resultierten die deutlich voneinander differierenden Tierzahlen der unterschiedlichen Gruppen (siehe Tabelle 5).

Die Transplantation der bovinen Zellen erfolgte drei bis fünf Stunden nach der erfolgten präkonditionierenden Bestrahlung. Bei den im neugeborenen Alter verwendeten Mäusen wurde die Transplantation ein bis zwei Tage nach der Geburt durchgeführt.

Adulten Mäusen wurden die bovinen Zellen im Alter von 10 Wochen injiziert. Im Falle der hinsichtlich der Stammzellmarker CD34 und c-kit positiv selektierten Zellen wurden jedem Tier 2-4 x 10⁵ Zellen injiziert. Von der Zellfraktion, welche nach einer durchgeführten T-Zell-Depletion verblieb (= SeF), wurden adulten Mäusen 1 x 10⁷ und neugeborenen Mäusen 2 x 10⁶ Zellen injiziert. Nähere Informationen zur Aufarbeitung dieser Zellfraktionen finden sich in den Kapiteln 3.5.2.1 und 3.5.2.2.

Den neugeborenen Mäusen wurden maximal 50 µl der entsprechenden Zellsuspension mit dem Trägermedium RPMI/ 10 % FKS pro Tier verabreicht. Hierzu wurde die mittels positiver Separation oder Depletion gewonnene Zellsuspension zentrifugiert (300 x g, 7 min, 4 °C) und der Überstand vorsichtig abgenommen. Das Zellpellet wurde anschließend in der entsprechenden Menge RPMI/ 10 % FKS resuspendiert. Pro Tier wurden von dieser Suspension 50 µl in eine Insulinspritze aufgezogen. Zur Injektion wurden die Tiere zwischen zwei Fingern fixiert. Die Injektion der Zellen erfolgte in die durch die Haut sehr gut sichtbare Leber.

Adulten Mäusen wurden pro Tier maximal 150 µl der Zellsuspension intravenös in die Schwanzvene injiziert.

3.6.5 Scoring

Alle Versuchstiere wurden zur klinischen Beurteilung regelmäßig einer Sichtkontrolle sowie einem intensiven Scoring unterzogen. Die Sichtkontrolle aller Tiere wurde mindestens einmal am Tag durchgeführt. Das Scoring fand je nach Zustand der Tiere mindestens dreimal wöchentlich statt.

Beurteilt wurden die Versuchstiere nach den Kriterien Körpergewicht, Körperhaltung, Mobilität, Haut, Fell, Alopezie und Atmung. Die Bewertung ist in der Tabelle 6 auf Seite 33 dargestellt. Ein Gesamtscore von 7,5 Punkten pro Maus führte zur Beendigung des Experimentes und zur schmerzfreien Tötung des jeweiligen Tieres.

Besonderes Augenmerk wurde während des Scorings und zur Beurteilung des Zustandes der Tiere auf die Gewichtskontrolle gelegt. Wurde bei Einzeltieren innerhalb weniger Tage ein Verlust des Körpergewichtes von über 20 % zum vorher erreichten Maximalwert festgestellt, wurden diese umgehend schmerzfrei getötet (siehe Kapitel 3.6.7).

Zudem galten jeweils das Erreichen des höchsten Scores in den Parametern Mobilität, Haut und Atmung als Endpunkt und somit als weitere Abbruchkriterien.

Tab. 6: Zusammenfassung des angewendeten Score-Systems, nach dem die transplantierten Mäuse mindestens dreimal wöchentlich beurteilt wurden

Parameter	Score				
	0	0,5	1	1,5	2
Körperhaltung	ohne Buckel	leichter Buckel, gedehnte Laufhaltung	Buckel	keine gestreckte Laufhaltung	starker Buckel
Mobilität	mobil und lebhaft	geringgradig verminderte Bewegung	mittelgradig verlangsamte Bewegung	Bewegung nur nach Manipulation	keine Bewegung
Haut	normal	lokale Exantheme	Exantheme und Akanthose	Erythem und erhöhte Schuppung	Ulzerierende Stellen, Verschorfte Stellen
Fell	normal	leicht zerzauster Nacken	geringfügig zerzauster Nacken und Bauch	mittelgradig multifokal zerzaust und verfilzt	hochgradig multifokal/diffus zerzaust und verfilzt
Alopezie	keine Auffälligkeiten	geringgradig (lokal begrenzt)	mittelgradig (nur Kopf, Körper geringgradig)	hochgradig (Kopf, Bauch)	hochgradig generalisiert
Atmung	normal		mittelgradig verändert		hochgradig verändert

3.6.6 Blutentnahme

Chemikalien

Heparin-Natrium-25.000-ratiopharm[®] Injektionslösung, 25.000 I.E./ 5 ml

Isofluran, Forene 250 ml

Ratiopharm GmbH, Ulm, D

AbbVie Deutschland GmbH & Co. KG, Wiesbaden, D

Verbrauchsmaterialien

Kapillare, Micro haematocrit tubes, Natrium-Heparin	VWR International GmbH, Darmstadt, D
--	---

Um das Anwachsen und die Differenzierung der bovinen Vorläuferzellen in den Mäusen zu analysieren, wurde diesen regelmäßig Blut entnommen. Dieses wurde zur durchflusszytometrischen Analyse (Kapitel 3.8.3) sowie zur Erfassung des Blutbildes (Kapitel 3.7) verwendet. Um die Entwicklung dieser Parameter untersuchen zu können, wurden die Blutentnahmen ab der achten Lebenswoche in zweiwöchigem Abstand durchgeführt. Das Blut wurde aus dem retrobulbären Venenplexus am narkotisierten Tier entnommen. Die Tiere wurden dazu mit einem Gemisch aus Sauerstoff und Isofluran in einer Narkosekammer betäubt. Zur Narkoseeinleitung wurden die Tiere maximal 3 Volumenprozent (Vol.-%), zur -erhaltung 2 Vol.-% Isofluran ausgesetzt. Die Durchflussrate des Sauerstoffs betrug 400 ml/ min. Um die eigentliche Blutentnahme durchführen zu können, wurden die Mäuse bei gut erhaltener Narkose aus der Kammer herausgenommen. Um einen Blutstau und somit günstigere Entnahmebedingungen hervorzurufen, wurden die Mäuse fest im Nackenfell fixiert. Eine stumpfe Heparin-Kapillare wurde dann unter drehenden Bewegungen in Richtung entgegengesetztes Ohr in den medialen Augenwinkel eingeführt. Sobald der retrobulbäre Venenplexus erreicht war, wurde die Drehbewegung gestoppt und der Stau etwas gelöst, woraufhin sich die Kapillare mit Blut füllte. Das Blut wurde anschließend in ein mit Heparin benetztes 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt und dieses gut geschwenkt. Die Mäuse wurden unmittelbar nach der Blutentnahme vorsichtig in den Käfig zurückgelegt und während der Aufwachphase weiterhin überwacht.

3.6.7 Finale Präparation

Chemikalien

Dulbecco's PBS ohne Mg^{2+} + Ca^{2+} , steril (1 x)	PAA Laboratories GmbH, Cölbe, D
Dulbecco's PBS ohne Mg^{2+} + Ca^{2+} , steril (10 x)	PAA Laboratories GmbH, Cölbe, D
Heparin-Natrium-25.000- ratiopharm [®] Injektionslösung, 25.000 I.E./ 5 ml	Ratiopharm GmbH, Ulm, D
Kodan [®] Tinktur Forte	Schülke & Mayr GmbH, Norderstedt, D

Verbrauchsmaterialien

BD Microlance™ 3 Kanülen, 25 G, 0,5 x 25 mm	Becton Dickinson GmbH, Heidelberg, D
Petrischale, 90 x 16 mm	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, D
Spritze Omnican® -F, 0,30 x 12 mm/ G 30, 1 ml	B. Braun Melsungen AG, Melsungen, D
Sterican® Einmalkanülen, 26 G, 0,45 x 25 mm	B. Braun Melsungen AG, Melsungen, D
Zellsieb, BD Falcon™ cell strainers, 70 μ m	Becton Dickinson GmbH, Heidelberg, D

Im Rahmen der finalen Präparation wurden die Mäuse zunächst mittels Kohlenstoffdioxid-Begasung betäubt und schmerzfrei getötet. Direkt nach dem Atemstillstand wurde den Tieren über eine Herzpunktion Blut entnommen. Dazu wurde eine mit Heparin benetzte 1 ml-Spritze mit 25G-Kanüle verwendet, um eine schnelle Gerinnung des Blutes zu verhindern. Das gewonnene Herzblut wurde in ein mit Heparin benetztes 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt, welches anschließend gründlich geschwenkt wurde.

Das weitere Vorgehen bestand in einer Präparation des getöteten Tieres mit der Entnahme einzelner Organe. Für die im Anschluss durchgeführten durchflusszytometrischen Analysen wurden neben dem Herzblut die Milz sowie das Knochenmark der Oberschenkel entnommen (siehe Kapitel 3.8.3).

Die Herstellung hierfür notwendiger Einzelzellsuspensionen aus Milz und Knochenmark wurde wie folgt durchgeführt. Die halbe Milz wurde in ein 70 μ m-Zellsieb gegeben, welches auf ein Schraubverschluss-Röhrchen (50 ml) gesetzt wurde. Mithilfe des Kolbens einer 1 ml-Spritze wurde die halbe Milz mechanisch zerkleinert und durch das Zellsieb gedrückt. Anschließend wurde mit PBS nachgespült, um die restlichen Bestandteile der Milz aus dem Sieb zu entfernen, und ein Waschschrift durchgeführt (300 x g, 7 – 10 min, 4 °C). Der Überstand wurde abgekippt, das Zellpellet in 5 ml PBS gelöst und die Zellzahl mittels einer Neubauer-Zählkammer bestimmt.

Zur Gewinnung der Zellen des Knochenmarks wurden nach der Organentnahme ein oder gegebenenfalls zwei Oberschenkel freipräpariert, die Enden abgesetzt und das Knochenmark mit Hilfe einer mit PBS befüllten Spritze samt Kanüle aus dem Knochen gespült. Die entstehende Suspension aus Knochenmark und PBS wurde zur Herstellung einer Einzelzellsuspension erneut in eine Spritze aufgezogen, mit der Öffnung auf den Boden einer Petrischale aufgesetzt und vorsichtig mit geringem Druck aus der Spritze gedrückt. Dies diente der mechanischen Zerkleinerung und wurde nach Bedarf mehrfach wiederholt. Die entstandene Suspension wurde anschließend in PBS gewaschen (300 x g, 7 – 10 min, 4 °C) und die Zellzahl bestimmt.

3.7 Erfassung des Blutbildes

Das Blutbild der Mäuse wurde an einem scil Vet abc-Analysegerät der Firma Scil animal care company GmbH (Viernheim, D) bestimmt. Dies diente hauptsächlich der ergänzenden Überprüfung des Gesundheitszustandes der Tiere. Im Folgenden aufgeführte Blutparameter wurden mit Hilfe des Gerätes analysiert.

Tab. 7: Überblick über die mittels scil Vet abc bestimmten Blutparameter

Parameter		Einheit
WBC	Leukozyten	$10^3/\text{mm}^3$
RBC	Erythrozyten	$10^6/\text{mm}^3$
HGB	Hämoglobin	g/dl
HCT	Hämatokrit	%
PLT	Thrombozyten	$10^3/\text{mm}^3$
MCV	Mean Corpuscular Volume	μm^3
MCH	Mean Corpuscular Haemoglobin	pg
MCHC	Mean Corpuscular Haemoglobin Concentration	g/ dl
RDW	Red Cell Distribution Width	%
MPV	Mean Platelet Volume	μm^3
Lym	Lymphozyten	%
Mo	Monozyten	%
Gra	Granulozyten	%
Lym absol	Lymphozyten, absolut	$10^3/\text{mm}^3$
Mo absol	Monozyten, absolut	$10^3/\text{mm}^3$
Gra absol	Granulozyten, absolut	$10^3/\text{mm}^3$

3.8 Durchflusszytometrische Analysen

Chemikalien

BD™ CompBead Plus Particles,
Anti-mouse Ig (Immunglobulin)

Becton Dickinson GmbH, Heidelberg, D

BD™ CompBead Plus Particles, Anti-rat Ig	Becton Dickinson GmbH, Heidelberg, D
BD FACS™ Lysing Solution	Becton Dickinson GmbH, Heidelberg, D
Dulbecco's PBS ohne Mg ²⁺ + Ca ²⁺ , steril (1 x)	PAA Laboratories GmbH, Cölbe, D
LYNX Rapid RPE-Cy7 Antibody Conjugation Kit®	Bio-Rad Laboratories GmbH (ehemals: AbD Serotec), München, D

Verbrauchsmaterialien

BD Falcon™ Rundboden- Polystyrolröhrchen, 5 ml	Becton Dickinson GmbH, Heidelberg, D
---	--------------------------------------

Die Durchflusszytometrie ist eine Methode zur genaueren Bestimmung von Größe, Morphologie sowie Oberflächenmarkern von Zellen. Für vorliegende Arbeit wurden die durchflusszytometrischen Messungen an einem FACS-Canto™ II Gerät der Firma Becton Dickinson GmbH durchgeführt.

FACS steht für fluorescence activated cell sorting und beschreibt die Methodik der Durchflusszytometrie. Zellen werden vereinzelt und als solche von speziellen Lasern angeregt. Je nach Größe und Granularität der Zellen wird der Laserstrahl unterschiedlich stark abgelenkt und abgeschwächt. Der entsprechende Laserstrahl wird von Detektoren erfasst und ausgewertet, wodurch je nach gewünschter Darstellungsweise eine optische Darstellung der analysierten Zellsuspension ermöglicht wird. Die Zellgröße wird hierbei durch das Vorwärtsstreulicht (FSC, Forward Scatter), die Granularität durch das Seitwärtsstreulicht (SSC, Sideward Scatter) bestimmt.

Werden, wie in der vorliegenden Arbeit, zur Analyse auch Antikörper verwendet, mit denen die Zellsuspensionen vorher inkubiert werden, kann man mit Hilfe der Durchflusszytometrie auch Aussagen über die auf der Zelloberfläche vorhandenen Marker treffen und je nach Marker somit die Zellart näher definieren. Dies gelingt dadurch, dass die jeweiligen Antikörper mit bestimmten Fluoreszenzfarbstoffen gekoppelt werden. Diese werden von den unterschiedlichen Lasern des Zytometers je nach Wellenlänge angeregt und emittieren dadurch wiederum Licht unterschiedlicher Wellenlänge. Dieses wird von den Detektoren wahrgenommen und bei Auswahl des passenden Kanals ebenfalls optisch dargestellt. Die Stärke des Fluoreszenzsignals, die Fluoreszenzintensität, ist dabei direkt proportional zur Anzahl der durch Antikörper markierten Bindungsstellen auf der Zelloberfläche.

Die Durchflusszytometrie wurde im Rahmen der vorliegenden Arbeit zum einen dafür genutzt, den Erfolg der etablierten Methoden, wie der Dichtegradientenzentrifugation, zu verifizieren. Zum anderen wurden mittels durchflusszytometrischer Messungen die auf zellulärer Ebene stattfindenden Veränderungen im Blut und in den Organen der Versuchstiere festgestellt und quantifiziert. Für beide Einsatzvarianten wurde vorab die Funktionalität der zur Verfügung stehenden Antikörper ausgetestet sowie deren optimale Arbeitskonzentration bestimmt (siehe Kapitel 3.8.2).

3.8.1 Erfassung und Auswertung der Daten

Das für die vorliegende Arbeit genutzte Gerät BD FACSCanto™ II ist mit drei verschiedenen Lasern (blau, rot, violett) ausgestattet. Dadurch wird eine zeitgleiche Analyse von acht Fluoreszenzparametern ermöglicht. Für die vorliegende Arbeit wurden hauptsächlich die Fluorochrome Fluoresceinisothiocyanat (FITC), Phycoerythrin (PE), R-Phycoerythrin (RPE), Alexa Fluor® 647, RPE-Cy7 und Pacific Blue™ in unterschiedlichen Kombinationen genutzt.

Der relative Anteil der darzustellenden Zellpopulationen wurde mittels den in den Proben zur Analyse vorliegenden Gesamtzellzahlen bestimmt. Dargestellt wurden im Rahmen der vorliegenden Arbeit diverse Zellpopulationen aus verschiedenen Medien, wie dem bovinen peripheren Blut und dem bovinen Nabelschnurblut.

Auswertung mittels BD FACSDiva™-Software

Zur Darstellung und Auswertung der durchflusszytometrischen Messungen wurde die Software BD FACSDiva™ in der Version 6 verwendet.

Gating-Strategie

Im Vorfeld jeder Datenauswertung wurde zunächst in der Darstellung des Vorwärtsstreulichts (FSC-A gegen FSC-H) eine sogenannte Dublettendiskriminierung vorgenommen. Dies diente dem Zweck, Zelltrümmer oder eventuell fälschlicherweise entstandene Zellverbände von der weiteren Datenauswertung auszuschließen. Im Anschluss daran wurde in einer Darstellung von Vorwärtsstreulicht gegen Seitwärtsstreulicht das sogenannte „Lifegate“ festgelegt. Auch dadurch wurden erneut etwaige Zelltrümmer von der weiteren Auswertung ausgeschlossen. Nur die im „Lifegate“ enthaltenen Zellen wurden anschließend im Hinblick auf ihre Eigenschaften, insbesondere Größe und Granularität, sowie das Vorhandensein möglicher Oberflächenantigene weiter analysiert.

3.8.2 Verwendete Antikörper

Die Austestung und somit Validierung von Antikörpern wurde mittels unterschiedlicher boviner Medien durchgeführt. Peripheres Blut adulter Rinder und Kälber und auch bovines Nabelschnurblut und bCBMC kamen zum Einsatz. Im Rahmen der Arbeit wurden zahlreiche humane, bovine und auch ovine Antikörper getestet.

Die Arbeitsschritte der Probenvorbereitung für die Testmessungen glichen der Vorgehensweise für die durchflusszytometrischen in-vivo-Analysen und werden im Kapitel 3.8.3 ausführlich erläutert. Im Falle von Vollblut wurden für die Messungen jeweils 100 µl davon eingesetzt.

Im Anschluss an die Testmessungen wurden die im bovinen Medium validierten Antikörper zur Bestimmung der optimalen Arbeitskonzentration mittels Durchflusszytometrie austitriert. Für die Titrationsmessungen wurden ebenfalls bovines peripheres Blut sowie bovines Nabelschnurblut verwendet.

Folgende Tabelle 8 listet die erfolgreich getesteten, im Rahmen der Arbeit weiterverwendeten Antikörper samt austitrierter Arbeitskonzentration auf.

Tab. 8: Zusammenfassung der in der vorliegenden Arbeit verwendeten Antikörper für die durchflusszytometrischen Analysen

Antigen	Klon	Fluorochrom	Hersteller	Arbeitskonzentration
hu cyCD3	CD3-12	Pacific Blue™	Bio-Rad Laboratories GmbH (ehemals: AbD Serotec), München, D	1:10
bo CD4	CC8	Alexa Fluor® 647	Bio-Rad Laboratories GmbH	1:10
bo CD8	CC63	RPE	Bio-Rad Laboratories GmbH	1:10
bo CD34, N21		–(Sek.-Ak)	Dr. M. Sakurai, National Institute of Agrobiological Sciences, Tsukuba, Ibaraki, Japan	1:50
bo CD45	CC1	FITC	Bio-Rad Laboratories GmbH	100/15 bzw. 1:6,6
bo CD45		FITC	LifeSpan Biosciences, Inc., Seattle, USA	1:10
hu, bo CD117/ c-kit	104D2	PE	Acris Antibodies GmbH, Herford, D	1:20
bo CD335	AKS1	–(Labeling RPE-Cy7)	Bio-Rad Laboratories GmbH	1:20
bo WC1	CC101	FITC	Bio-Rad Laboratories GmbH	1:20

Einer der verwendeten Antikörper (boCD335) lag in unkonjugierter Form vor, weshalb dieser zunächst mit einem Fluorochrom gefärbt (gelabelt) werden musste. Dazu wurde ein Konjugations Kit verwendet, das zusätzlich zum jeweiligen Fluorochrom in lyophilisierter Form den sogenannten Modifier und den sogenannten Quencher enthielt (LYNX Rapid RPE-Cy7 Antibody Conjugation Kit®, Bio-Rad Laboratories GmbH, D). Das Labeling wurde gemäß den Herstellervorgaben durchgeführt.

Vor Durchführung der durchflusszytometrischen Messungen, bei denen gleichzeitig mehrere Antikörper zum Einsatz kamen, erfolgten am Durchflusszytometer Kompensationsmessungen. Damit wurden falsche Darstellungen aufgrund von Überlappungen der Emissionsspektren der einzelnen Fluorochrome rechnerisch korrigiert und somit mög-

lichst minimiert. Die Messungen wurden mittels Kompensations-Beads (BD™ Comp-Bead Plus Particles, Becton Dickinson GmbH, D) sowie einer im verwendeten Durchflusszytometer (BD FACSCanto™ II) hinterlegten automatisierten Kompensationsmethode durchgeführt.

3.8.3 In vivo-Analysen

Bei den im Rahmen der vorliegenden Arbeit transplantierten Mäusen wurde sowohl im laufenden Versuch als auch am Versuchsende (post mortem) das Engraftment der bovinen Zellen im murinen Organismus mittels Durchflusszytometrie analysiert. Hierzu wurde den Mäusen während des Versuches Blut entnommen (siehe Kapitel 3.6.6) sowie am Versuchsende nach schmerzfreier Tötung Blut, Milzgewebe sowie Knochenmark gewonnen (siehe Kapitel 3.6.7).

Die durchflusszytometrischen Verlaufsanalysen des Blutes wurden ab der 8. Lebenswoche in zweiwöchigem Abstand durchgeführt. Es kamen zunächst nur zwei Antikörper zum Einsatz, ein boviner und ein muriner (siehe Tabelle 9). Hiermit sollte überprüft werden, ob und in welchem Umfang sich nach der Transplantation boviner Vorläuferzellen im murinen Organismus Zellen entwickelt hatten, die den Leukozyten-Marker bo CD45 exprimierten.

Tab. 9: Übersicht der eingesetzten Antikörper für die durchflusszytometrische Erstanalyse des peripheren Blutes der transplantierten Mäuse

Antigen	Klon	Isotyp	Fluorochrom	Hersteller
bo CD45	CC1	IgG1	FITC	Bio-Rad Laboratories GmbH (ehemals: AbD Serotec), München, D
ms CD45			PerCP	Becton Dickinson GmbH, Heidelberg, D

Bei den im Alter von 10 Wochen adult transplantierten Mäusen der Versuchsgruppe B fand diese Erstanalyse zwei Wochen nach der Transplantation, also in der 12. Lebenswoche statt. Die folgenden Verlaufsanalysen wurden ebenfalls in zweiwöchigem Abstand durchgeführt.

Über die Erstanalysen hinaus sollten mit Hilfe zusätzlicher Antikörper einzelne bovine Zellpopulationen im Blut der Mäuse nachgewiesen werden (siehe Tabelle 10 auf Seite 41). Dies waren T-Lymphozyten (cyCD3+), T-Helfer-Zellen (CD3+CD4+), zytotoxische T-Lymphozyten (CD3+CD8+) und Natürliche Killerzellen (CD335+). Unter ergänzender Verwendung einer speziellen Auswertungsmethode konnte auch der Anteil an B-Lymphozyten bestimmt werden. Ein spezifischer boviner Antikörper für die Markierung von bovinen B-Lymphozyten stand nicht zur Verfügung.

Für die Analyse der B-Lymphozyten wurden zunächst im sogenannten „Lifegate“ (siehe Kapitel 3.8.1) die einzelnen Leukozytenpopulationen der bovinen CD45-positiven

Zellen dargestellt (Lymphozyten, Monozyten, Granulozyten). In der Population der Lymphozyten wurden daraufhin die für den bovinen anti-cyCD3-Antikörper (Pacific Blue™) positiven Zellen den für den bovinen anti-CD335-Antikörper (RPE-Cy7) positiven Zellen gegenübergestellt. Die in dieser Darstellung nicht angefärbten Zellen, welche eine ähnliche Größe und Granularität aufwiesen wie die T-Lymphozyten (cyCD3+) wurden der Zellfraktion der B-Lymphozyten zugeordnet.

Tab. 10: Übersicht der eingesetzten Antikörper für die durchflusszytometrische Verlaufsanalyse des peripheren Blutes der transplantierten Mäuse

Antigen	Klon	Isotyp	Fluorochrom	Hersteller
bo CD45	CC1	IgG1	FITC	Bio-Rad Laboratories GmbH (ehemals: AbD Serotec), München, D
ms CD45			PerCP	Becton Dickinson GmbH, Heidelberg, D
bo CD8	CC63	IgG2a	RPE	Bio-Rad Laboratories GmbH
bo CD335	AKS1	IgG1	RPE-Cy7 (gelabelt)	Bio-Rad Laboratories GmbH
bo CD4	CC8	IgG2a	Alexa Fluor® 647	Bio-Rad Laboratories GmbH
cyCD3	CD3-12	IgG1	Pacific Blue™	Bio-Rad Laboratories GmbH

Die aufgeführten Antikörper kamen für die Folgemessungen zum Einsatz, sobald ein Anteil boviner CD45-positiver Zellen von 2 % oder mehr festgestellt wurde. Anderenfalls wurden die Verlaufsanalysen weiterhin mit den beiden anti-CD45-Antikörpern durchgeführt (siehe Tabelle 9 auf Seite 40).

Für die durchflusszytometrischen Analysen der Mäuse wurde das jeweilige Probenmaterial zunächst in ein Rundboden-Röhrchen überführt. Im Falle der Verlaufsanalysen handelte es sich um 80-100 μl des murinen peripheren Blutes, im Falle der finalen Analysen um 100 μl Herzblut und jeweils um 1×10^6 Zellen der Milz- und der Knochenmarkszellsuspensionen (Gewinnung siehe Kapitel 3.6.7).

Bei jeder Messung wurde außerdem etwas Material (z.B. circa 20 μl Blut) für die sogenannte Autofluoreszenzkontrolle verwendet, die der Einschätzung der Autofluoreszenz der analysierten Zellen diene. Diese Kontrollproben wurden denselben Waschsritten und auch der Erythrozyten-Lyse (siehe unten) unterzogen, im Vorfeld aber nicht mit Antikörpern versetzt.

Das Probenmaterial wurde zunächst für 30 Minuten bei 4 °C mit den entsprechenden Antikörpern inkubiert (siehe Tabellen 9 und 10). Da nur die Leukozyten analysiert werden sollten, wurden die Proben zur Lyse der Erythrozyten gemäß Herstellervorgaben mit einer entsprechenden Lösung behandelt (BD FACS™ Lysing Solution, Becton Dickinson GmbH). Es folgten zwei bis drei Waschsritte bei 300 x g, 5 min und Raumtemperatur. Anschließend wurden die durchflusszytometrischen Messungen am

FACSCanto™ II durchgeführt.

Wurde für die erweiterten Verlaufsanalysen der benannte anti-CD3-Antikörper (cyCD3-Pacific Blue™, Bio-Rad Laboratories GmbH, D; siehe Tabelle 10) eingesetzt, unterschied sich die Probenvorbereitung von der oben geschilderten. Dies lag daran, dass dieser Antikörper einer intrazellulären Färbung diene. Hierzu wurde das BD IntraSure™ Kit (Becton Dickinson GmbH, Heidelberg, D) benutzt, welches laut den vom Hersteller angegebenen Gebrauchshinweisen angewendet wurde. Die Markierung mit dem intrazellulären Antikörper musste hierfür zeitlich nach der Färbung mit den restlichen, extrazellulären Antikörpern vorgenommen werden.

Die jeweiligen Proben wurden mit der entsprechenden Menge extrazellulärer Oberflächen-Antikörper versetzt, gut gemischt und bei Raumtemperatur im Dunkeln für 15 Minuten inkubiert (sonst 30 Minuten). Anschließend wurden die Proben mit 100 μ l Reagenz A des IntraSure™ Kit versetzt, vorsichtig gemischt und für fünf Minuten bei Raumtemperatur im Dunkeln inkubiert. Dieser Schritt diene der Fixierung der im Vorfeld bereits gefärbten Zellen. Zur Elimination der Erythrozyten kam im Anschluss ebenfalls die Lyselösung (BD FACS™ Lysing Solution) zum Einsatz. Danach wurden die Proben für fünf Minuten bei 800 x g und Raumtemperatur zentrifugiert, der Überstand abgenommen und das Zellpellet mit 50 μ l Reagenz B des IntraSure™ Kit versetzt. Hiermit wurden die im Vorfeld fixierten, gefärbten Zellen permeabilisiert. Direkt im Anschluss wurde die jeweilige Menge des intrazellulären Antikörpers hinzugegeben und nochmals für 15 Minuten bei Raumtemperatur im Dunkeln inkubiert. Es folgte ein weiterer Waschschrift mit 300 x g für fünf Minuten bei Raumtemperatur. Im Anschluss konnten die durchflusszytometrischen Messungen vorgenommen werden.

Ergebnisse

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden zunächst Methoden zur Gewinnung boviner Vorläuferzellen aus unterschiedlichen bovinen Geweben etabliert. Ziel war es, das Gewebe und die Methode zu identifizieren, mittels welcher die meisten bovinen Vorläuferzellen in möglichst reiner Form gewonnen werden konnten. Im Folgenden wurden diese Zellen immundefizienten Mäusen transplantiert und deren Anwachsen und Entwicklung im Organismus Maus mit verschiedenen Methoden im Zeitverlauf analysiert. Ziele der vorliegenden Arbeit waren somit die Entwicklung optimaler Methoden für die Gewinnung boviner Vorläuferzellen und deren anschließende Transplantation in immundefiziente Mäuse mit der Absicht, bovinisierte Mäuse zu generieren.

4.1 Gewinnung boviner mononukleärer Zellen

Für die Gewinnung boviner mononukleärer Zellen wurde Nabelschnurblut und, zu einem geringeren Anteil, auch peripheres Blut vom Kalb verwendet. Es wurden nur Proben verarbeitet, die bestimmte Kriterien erfüllten. Ausschlusskriterien stellten beispielsweise ein geronnener Zustand nach Probeneingang oder ein Alter der Proben von über 48 Stunden dar.

Insgesamt standen 52 Nabelschnurblutproben und 13 Proben peripheren Blutes von Kälbern zur Verfügung.

Von den Nabelschnurblutproben wurden 13 entweder bereits bei Probeneingang oder nach Aufarbeitung verworfen. Aus 39 Proben konnten bCBMC gewonnen werden. Von diesen wurden 26 Proben nach der Gewinnung der bCBMC weiterverwendet und die restlichen 13 nach Gewinnung und Lagerung der bCBMC nicht weiter aufgearbeitet. Aus allen 13 Kälberblutproben konnten bPBMC gewonnen werden.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden zwischen 5 ml und 385 ml bovines Nabelschnurblut sowie zwischen 10 ml und 2000 ml bovines peripheres Blut gewonnen. Die Probenmengen divergierten somit stark. Im Falle des peripheren Blutes ist diese Tatsache hauptsächlich auf die Entnahmetechnik zurückzuführen. Während des Entblutens konnte bedeutend mehr Blut gewonnen werden als im Rahmen einer herkömmlichen Blutprobenentnahme am lebenden Tier (siehe Kapitel 3.4.2).

Die Nabelschnurblutproben wurden anhand der verschiedenen Gewinnungsarten und -orte unterschieden: das in der Klinik während einiger Sectiones caesareae, das durch einen niedergelassenen Tierarzt gewonnene sowie das in einer Schlachtstätte gewonnene Nabelschnurblut (siehe Kapitel 3.4.1).

Das Probenvolumen der in der Klinik entnommenen Nabelschnurblutproben (n=6) variierte von minimal 6 ml bis maximal 67 ml.

Die Menge des extern durch einen niedergelassenen Tierarzt gewonnenen Nabelschnurblutes (n=37) differierte von 10 ml bis auf maximal 385 ml und wies somit eine sehr große Spannbreite auf.

Die Volumina der in einer Schlachtstätte gewonnenen Blutproben (n=7) wichen nicht derart stark voneinander ab. Die geringste gewonnene Menge betrug hier 5 ml, maximal wurden 28 ml gewonnen. Wie im Kapitel 3.4.1 beschrieben, kann diese Volumendifferenz auf die erschwerten Entnahmebedingungen sowie das kurz vor der Entnahme stattfindende Ableben der Tiere zurückgeführt werden.

Somit kann hinsichtlich der für die vorliegende Arbeit herangezogenen Entnahmearten bovines Nabelschnurblutes anhand der erreichten Ergebnisse geschlussfolgert werden, dass die Gewinnung im Schlachthof mengenmäßig weniger Erfolg zeigte als die Gewinnung während eines Kaiserschnittes oder kurz nach der Geburt.

4.1.1 Dichtegradientenzentrifugation

Aus den bovinen Nabelschnurblutproben und den peripheren Blutproben der Kälber sollten im Folgenden mittels Dichtegradientenzentrifugation zunächst die bovinen mononukleären Zellen (MC) gewonnen werden. Die Methode der Dichtegradientenzentrifugation basiert auf dem Prinzip der unterschiedlichen Dichten der einzelnen Zellpopulationen im Blut. Mittels eines Mediums spezifischer Dichte, welches sich nach durchgeführter Zentrifugation zwischen der Schicht der bovinen MC und den darunterliegenden Zellpopulationen befindet, ist erstere leicht zu isolieren. Die grundsätzliche Vorgehensweise wurde bereits im Kapitel 3.5.1 beschrieben.

Vorerst wurde im Rahmen der vorliegenden Arbeit mittels unterschiedlicher Ansätze geprüft, welche Art der DGZ die verlässlichste für die vorliegenden Proben bovines Nabelschnurblutes und peripheren Blutes ist. Hierzu wurden bereits etablierte Protokolle für die DGZ boviner Medien (SENOGLES et al. 1979; DAVIS et al. 1987; FRITSCH et al. 1991; GRANDEL 2005; RAOUFI et al. 2011; HUSSEN 2012) und humanen Nabelschnurblutes (ALMICI et al. 1995; CAMPOS et al. 1995; CASE et al. 1996) genutzt und jeweils einzelne Parameter verändert. Dies waren der Verdünnungsgrad, die zu überschichtende Menge des verdünnten Blutes, das Dichtemedium, die Menge des

Dichtemediums sowie die Anzahl der Umdrehungen während der Zentrifugation. Der Einfluss dieser Parameter wurde für die vorliegende Arbeit in zahlreichen Kombinationen und Varianten erprobt.

Sowohl die Verwendung verschiedenster kommerziell erhältlicher Dichtemedien (Pancoll human 1,077 g/ml; Pancoll rat 1,091 g/ml; ein 1:2 Gemisch aus beiden genannten; Histopaque[®] 1,083 g/ml) als auch die Veränderung der oben genannten Parameter führten für bovines Nabelschnurblut zunächst nicht zu den gewünschten Ergebnissen. Die normalerweise deutlich zwischen Erythrozytenpellet und mononukleären Zellen zu erkennende Schicht des transparenten Dichtemediums konnte nicht abgegrenzt werden. In der Fraktion der entnommenen bCBMC führte dies zu teilweise deutlich sichtbaren Verunreinigungen mit Erythrozyten. Eine isolierte Entnahme der bCBMC war somit nicht gänzlich möglich.

Für bovines peripheres Blut hingegen wurde, insbesondere unter Verwendung des kommerziell erhältlichen Dichtemediums Histopaque mit einer Dichte von 1,083 g/ml, eine sehr klare Schichtung der einzelnen Kompartimente erreicht.

Daraufhin wurde für die DGZ bovines Nabelschnurblutes testweise ein selbst hergestelltes Dichtemedium verwendet, welches mittels Percoll[®] PLUS ebenfalls auf die Dichte 1,083 g/ml eingestellt wurde (zur Herstellung siehe Kapitel 3.5.1). Der Einsatz dieses Mediums führte zu einer deutlicheren Trennung der einzelnen Schichten (Zentrifugation bei 800 x g, 30 min, RT). Dennoch waren in der Schicht des Dichtemediums weiterhin geringfügige Mengen von Erythrozyten feststellbar, was anhand der blass-rötlichen Farbe erkennbar war.

Aus diesem Grund kamen zusätzlich SepMate[™]-Tubes der Firma StemCell[™] zum Einsatz, mit denen die Dichtegradientenzentrifugation laut Hersteller komplikationslos und schnell durchzuführen sei. Hierbei wurden in Bezug auf die Zentrifugations- und Waschschritte die Herstellervorgaben angewendet (siehe Kapitel 3.5.1). Die SepMate[™]-Tubes wurden mit zwei verschiedenen Dichtemedien getestet, mit Pancoll human mit einer Dichte von 1,077 g/ml sowie mit aus Percoll[®] PLUS selbst hergestelltem Dichtemedium mit einer Dichte von circa 1,083 g/ml. Außerdem wurde der Verdünnungsgrad des Nabelschnurblutes verändert. Hierbei ergab sich, dass eine 1:2 Verdünnung die besten Ergebnisse erzielte. Hingegen konnte keinerlei Einfluss der verschiedenen Dichtemedien festgestellt werden. Zumindest optisch wurden unter Verwendung beider Dichtemedien dieselben Ergebnisse erzielt. Möglicherweise war dies auf die in den SepMate[™]-Tubes eingesetzte Kunststofflamelle zurückzuführen, die zusätzlich zum Dichtemedium eine mechanische Barriere darstellte.

Angesichts dieser positiven Ergebnisse und vor allem aufgrund der deutlich vereinfachten Vorgehensweise wurden die bMC im Folgenden unter Verwendung der SepMate[™]-Tubes gewonnen, wobei das herkömmliche, kommerziell erhältliche Dichtemedium Pancoll human mit einer Dichte von 1,077 g/ml eingesetzt wurde.

Aus den bovinen Blutproben wurden sehr unterschiedliche Mengen an bMC gewonnen. Die Streuung war bei den Nabelschnurblutproben sehr viel größer als bei den peripheren Blutproben, was die folgende Abbildung 1 verdeutlicht.

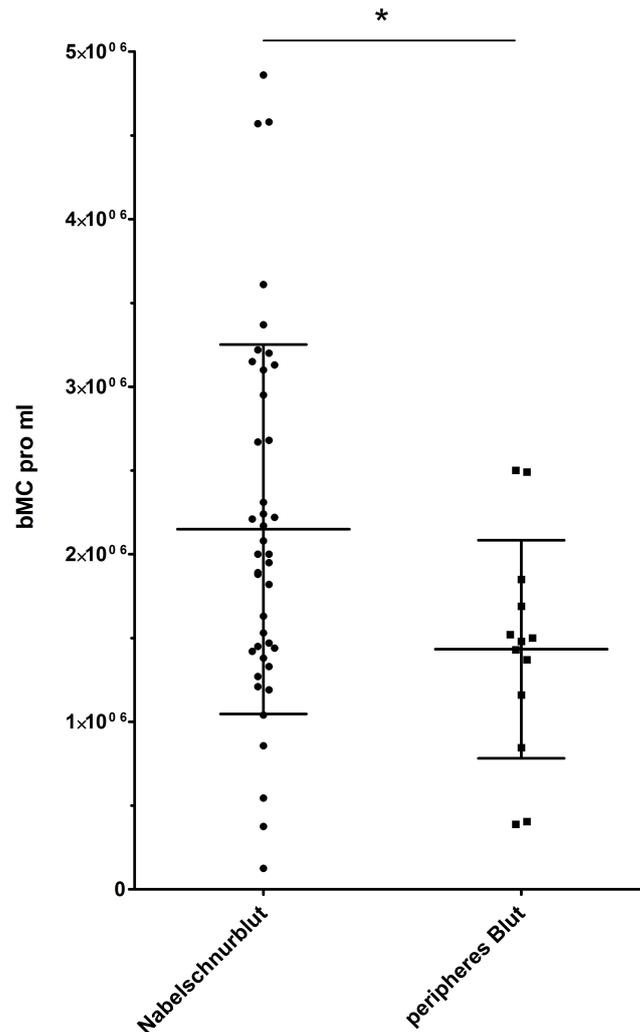


Abb. 1: Anzahl der aus bovinem Nabelschnurblut und aus bovinem peripherem Blut gewonnenen mononukleären Zellen (bMC). Die Gewinnung der bMC erfolgte mittels Dichtegradientenzentrifugation. Die Anzahl der gewonnenen Zellen wurde manuell mittels Neubauer-Zählkammer bestimmt. Die Werte der aus bovinem Nabelschnurblut (bo NSB) gewonnenen bMC streuten deutlich stärker als die aus bovinem peripheren Blut (bo pB) gewonnenen bMC. Im Durchschnitt wurden aus dem bo NSB signifikant mehr bMC gewonnen als aus dem bo pB. Signifikante Unterschiede sind mit einem * dargestellt. Mittelwert \pm SD; Auswertung mittels t-Test für unabhängige Stichproben; * $p \leq 0,05$. $n = 41$ (bo NSB); $n = 13$ (bo pB).

Im Nabelschnurblut wurden mindestens $1,25 \times 10^5$ und maximal $4,86 \times 10^6$ bCBMC pro ml gewonnen. Bei diesen Zahlen handelt es sich um die Menge an bCBMC, die direkt nach durchgeführter Dichtegradientenzentrifugation gezählt werden konnten. Im peripheren Blut konnten $3,88 \times 10^5$ bis $2,5 \times 10^6$ bPBMC pro ml gewonnen werden. Der Mittelwert der im Nabelschnurblut gewonnen bCBMC betrug $2,15 \times 10^6$ pro ml. Der Mittelwert der bPBMC, die aus dem peripheren Blut isoliert werden konnten, betrug $1,43 \times 10^6$ pro ml. Aus den Nabelschnurblutproben konnten insofern im Durchschnitt signifikant mehr bMC pro ml gewonnen werden als aus dem peripheren Blut.

Auch aus den verschiedenen Gewinnungsmethoden des Nabelschnurblutes resultierten unterschiedlich große Mengen an bCBMC. Für die Proben aus dem Schlachthof waren

dies minimal $1,25 \times 10^5$ bis maximal $3,2 \times 10^6$ Zellen pro ml, für die extern gewonnenen minimal $8,6 \times 10^5$ bis maximal $4,58 \times 10^6$ Zellen pro ml sowie für die klinisch bereitgestellten minimal $1,44 \times 10^6$ bis maximal $4,86 \times 10^6$ Zellen pro ml. Im Durchschnitt konnten aus den Proben vom Schlachthof mit $1,54 \times 10^6$ Zellen pro ml am wenigsten und aus den Proben der Klinik mit $2,78 \times 10^6$ Zellen pro ml am meisten bCBMC gewonnen werden. Aus den extern entnommenen Nabelschnurblutproben wurden durchschnittlich $2,17 \times 10^6$ bCBMC pro ml isoliert.

Zusammenfassend konnten somit über die Entnahme während eines Kaiserschnittes ("Klinik") und kurz nach der Geburt („extern“) im Durchschnitt fast doppelt so viele (Faktor 1,6) bCBMC gewonnen werden wie über die Entnahme in einem Schlachthof.

In Bezug auf die Verwendung der SepMate™-Tubes konnte hinsichtlich der Zahl gewonnenener bMC im Vergleich zum herkömmlichen Verfahren kein signifikanter Unterschied festgestellt werden ($p=0,0509$; unverbundener t-Test). Mittels der herkömmlichen Methode wurden bei einer Probenzahl von 27 minimal $1,25 \times 10^5$ und maximal $4,86 \times 10^6$ bMC pro ml bovinen Nabelschnurblut gewonnen. Bei Verwendung der SepMate™-Tubes wurden minimal $3,75 \times 10^5$ und maximal $3,2 \times 10^6$ bMC pro ml gewonnen ($n=14$). Im Durchschnitt wurden auf herkömmliche Art und Weise $2,39 \times 10^6$ und mittels SepMate™-Tubes $1,69 \times 10^6$ bMC pro ml gewonnen.

Die zusätzlich eingesetzten SepMate™-Tubes führten in Bezug auf die Anzahl der gewonnenen bPBMC/ bCBMC somit zu keiner Verbesserung, kamen aufgrund der erleichterten Methodik allerdings für die vorliegende Arbeit zum Einsatz (siehe Seite 45).

Durchflusszytometrie

Um den Erfolg der Dichtegradientenzentrifugation verifizieren zu können, wurde das Probenmaterial vor und nach der Verarbeitung durchflusszytometrisch analysiert. Auf diese Weise konnten die Anteile der einzelnen Zellfraktionen dargestellt werden. Somit konnte nachvollzogen werden, ob das Ziel der DGZ, die mononukleären Zellen zu isolieren, erreicht wurde und ob insbesondere die Fraktion der Granulozyten eliminiert werden konnte.

Anhand des Vergleiches in Abbildung 2 auf Seite 48 ist erkennbar, dass die Proben nach durchgeführter DGZ eine andere zelluläre Zusammensetzung aufwiesen. Mittels der DGZ wurde insbesondere die Zellfraktion der Granulozyten fast komplett eliminiert. Der prozentuale Anteil an Lymphozyten und Monozyten erhöhte sich dementsprechend stark.

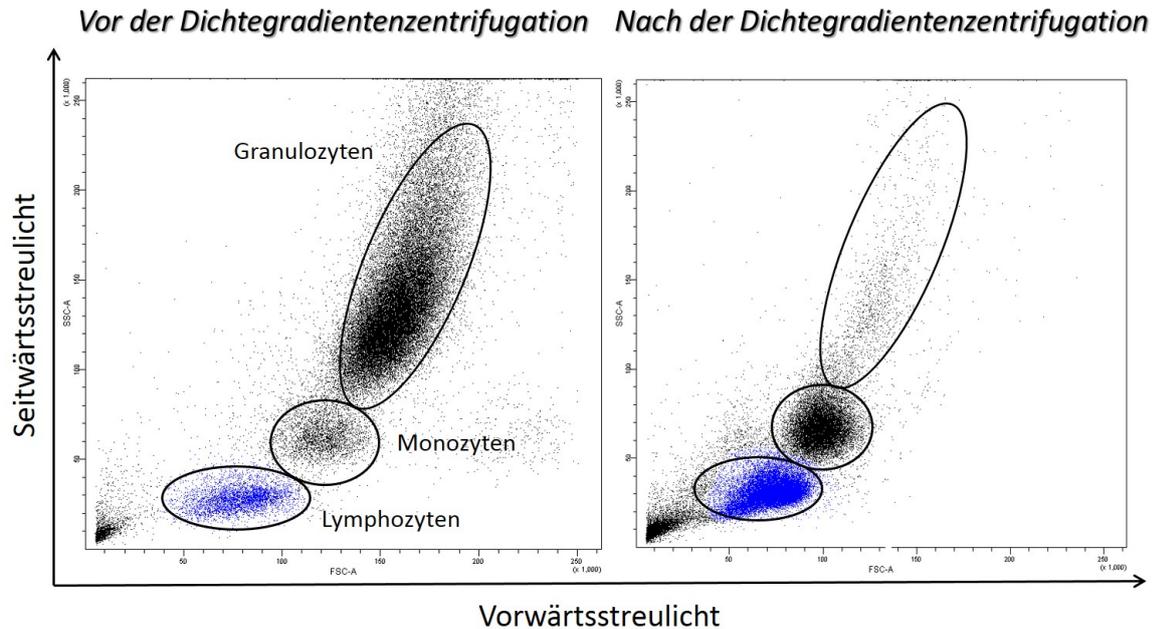


Abb. 2: Exemplarische Darstellung des Effektes der Dichtegradientenzentrifugation (DGZ) auf zellulärer Ebene. x-Achse: Vorwärtsstreulicht (FSC-A), y-Achse: Seitwärtsstreulicht (SSC-A). Dargestellt sind die Ergebnisse der durchflusszytometrischen Analyse bovines Nabelschnurblutes jeweils vor (links im Bild) und nach (rechts im Bild) der DGZ. Die Darstellung ermöglicht die Unterscheidung einzelner boviner Zellpopulationen, hier boviner Lymphozyten, Monozyten und Granulozyten. Die Granulozytenpopulation war nach erfolgter DGZ fast nicht mehr vorhanden. Die Lymphozyten- und Monozytenpopulationen traten nach erfolgter DGZ deutlicher hervor. Die Granulozyten wurden mittels DGZ somit fast gänzlich eliminiert.

4.2 Stammzellisolierung

Die Stammzellisolierung wurde mit zwei unterschiedlichen Methoden durchgeführt. Zum einen wurde eine positive Separation, zum anderen eine negative Separation, eine sogenannte T-Zell-Depletion, vorgenommen. Ziel der Etablierung einer Isolationsmethode für bovine hämatopoetische Vorläuferzellen war die Gewinnung einer möglichst hohen Zahl dieser mit einer gleichzeitig sehr hohen Reinheit. Der Gehalt anderer Zelltypen als den hämatopoetischen Vorläuferzellen (hier: T-Lymphozyten) sollte so gering wie möglich sein. Insbesondere im Hinblick auf die darauffolgende Transplantation in immundefiziente Mäuse waren beide Punkte von großer Bedeutung.

Im Folgenden muss beachtet werden, dass auch im Rahmen der durchgeführten Etablierungsarbeiten und Testmessungen die Verwendung der mittels DGZ gewonnenen bMC notwendig war. Es wurden insgesamt 28 Proben weiter aufgearbeitet (NSB: n = 26; pB, Kalb: n = 2). Jeweils die Hälfte dieser Proben wurde schließlich für die Stammzellisolierung und die anschließende Transplantation verwendet (siehe Kapitel 3.5.2.1 und 3.5.2.2). Diese geringe Zahl hing sowohl von der Verfügbarkeit der verwendeten Antikörper als auch von der Zahl neugeborener Mäuse pro Wurf ab.

Da die mittels DGZ gewonnenen mononukleären Zellen aus bovinem Nabelschnurblut und bovinem peripheren Blut unmittelbar nach der Gewinnung eingefroren wurden (siehe Kapitel 3.5.1), mussten sie vor der jeweiligen Weiterverwendung zunächst aufgetaut werden. Im Mittel waren nach dem Auftauen sowohl in den Nabelschnurblutproben als auch in den Proben peripheren Blutes noch in etwa die Hälfte der isolierten bMC nachzuweisen (bo NSB: 54,9 %; n = 26; bo pB: 65,9 %; n = 2).

Eine qualitative Aussage über die Zellen nach dem Auftauen wurde anhand ihrer Vitalität getroffen, welche mittels einer Färbung mit Trypanblau bestimmt wurde (siehe Kapitel 3.5.2).

Die Vitalität der Nabelschnurblutproben betrug nach dem Auftauen, und somit vor der Separation, zwischen 66,7 % und 100,0 %, die der Proben peripheren Blutes zwischen 83,5 % und 92,9 %. Im Durchschnitt konnte der überwiegende Anteil an bCBMC/bPBMC nach dem Auftauen als vital bezeichnet werden. Hierbei unterschieden sich die bMC aus dem Nabelschnurblut (88,5 %; n = 14) und jene aus dem peripheren Blut (88,2 %; n = 2) nur geringfügig.

Anschließend wurden aus diesen Proben mittels positiver Separation (Kapitel 4.2.1) die bovinen Vorläuferzellen isoliert oder mittels T-Zell-Depletion (Kapitel 4.2.2) angereichert. Im Anschluss daran wurde unmittelbar vor der Transplantation der Zellen in immundefiziente NSG Mäuse erneut die Zellvitalität bestimmt (siehe Kapitel 4.2.2).

4.2.1 Positive Separation

Eine positive Separation und anschließende Transplantation wurde mit insgesamt vier Nabelschnurblutproben durchgeführt. Verwendet wurden zwei verschiedene Marker für bovine Vorläuferzellen, das CD34- und das c-kit-Molekül (siehe Kapitel 3.5.2.1).

Aus bovinem peripheren Blut gewonnene Zellen wurden nicht für die positive Separation, sondern nur für die T-Zell-Depletion eingesetzt. Da peripheres Blut weniger Vorläuferzellen aufweist als Nabelschnurblut (SUTHERLAND et al. 1994; GRANDEL 2005), pro Probe aber dennoch eine für die Transplantation ausreichende Menge dieser hätte isoliert werden müssen (siehe Kapitel 3.6.4), wurde dies als unzweckmäßig eingeschätzt.

CD34

Da für die vorliegende Arbeit die in der Arbeitsgruppe bewährten Methoden des Humanisierens von NSG Mäusen aufgegriffen wurden, wurde zunächst eine Isolation CD34-positiver Zellen durchgeführt. Eine Schwierigkeit hierbei bestand in der eingeschränkten Verfügbarkeit anti-boviner CD34-Antikörper. Kommerziell verfügbare anti-bovine CD34 Antikörper existierten nicht. Von der in Japan ansässigen Arbeitsgruppe um Dr. Michiharu Sakurai (National Institute of Agrobiological Sciences, Tsukuba, Ibaraki, Japan) war der Bezug einer geringen Menge eines anti-CD34-Antikörpers möglich (SAKURAI et al. 2006; MERKWITZ et al. 2011).

Mit Hilfe dieses Antikörpers konnte lediglich eine aufbereitete Nabelschnurblutprobe hinsichtlich der bovinen, CD34-exprimierenden Stammzellpopulation separiert werden. Hierbei wurden 2×10^5 CD34-positive Zellen gewonnen, was 0,28 % der Gesamtzellzahl

an zuvor aufgetauten bCBMC entsprach.

c-kit

Zusätzlich zur Separation mittels CD34-Molekül wurden positive Separationen mit Hilfe eines anti-c-kit-Antikörpers durchgeführt. Aus insgesamt drei Nabelschnurblutproben wurden im Durchschnitt $2,13 \times 10^5$ als vital gezählte, c-kit-positive Zellen gewonnen. Minimal wurden 4×10^4 und maximal $4,8 \times 10^5$ c-kit-positive Zellen isoliert (siehe Tabelle 11). Durchschnittlich wurden somit 0,63 % der vor der Separation zur Verfügung stehenden bCBMC positiv auf den Oberflächenmarker c-kit isoliert (minimal 0,19 %; maximal 1,14 %).

Eine Zusammenfassung der Ergebnisse der vier für die positive Separation verwendeten Nabelschnurblutproben ist der folgenden Tabelle zu entnehmen.

Tab. 11: Übersicht der Nabelschnurblutproben, welche einer positiven Separation auf das bovine CD34- beziehungsweise c-kit-Molekül unterzogen wurden

Probe	Anzahl bCBMC nach DGZ (pro ml)	Anzahl bCBMC nach dem Auftauen (pro ml)	Anzahl vitaler CD34- bzw. c-kit-positiver Zellen	Anteil CD34- bzw. c-kit-positiver Zellen an der Gesamtzahl aufgetauter bCBMC
1 (CD34)	$4,86 \times 10^6$	$5,14 \times 10^6$	$2,0 \times 10^5$	0,28 %
2 (c-kit)	$2,67 \times 10^6$	$1,56 \times 10^6$	$4,8 \times 10^5$	1,14 %
3 (c-kit)	$3,1 \times 10^6$	$1,1 \times 10^6$	$1,2 \times 10^5$	0,55 %
4 (c-kit)	$3,2 \times 10^6$	$1,05 \times 10^6$	$4,0 \times 10^4$	0,19 %

Die Ursache der sich widersprechenden Daten hinsichtlich der Probe Nummer 1 (Anzahl bCBMC nach DGZ < Anzahl bCBMC nach dem Auftauen) könnte in Ungenauigkeiten der Zellzählung liegen, da diese manuell durchgeführt wurde (siehe Kapitel 3.5.1).

Basierend auf den langjährigen Erfahrungen bei der Humanisierung von Mäusen, wurden jedem Tier 2 - 4×10^5 positiv selektierte Zellen injiziert. Somit wurde die oben aufgeführte Probe Nummer 1 für die Transplantation einer Maus genutzt. Die Probennummern 2, 3 und 4 aus Tabelle 11 wurden nach erfolgter Separation insgesamt vier neugeborenen Mäusen transplantiert. Die Probennummern 3 und 4 wurden hierbei jeweils einer Maus injiziert, Probe Nummer 2 wurde für die Transplantation zweier Mäuse verwendet. Somit konnten insgesamt fünf Mäuse mit bovinen Vorläuferzellen, gewonnen durch positive Separation, transplantiert werden.

4.2.2 T-Zell-Depletion

Im Gegensatz zur positiven Separation wurde im Rahmen der T-Zell-Depletion nicht die gewünschte, sondern, als negative Separation, die störende Zellpopulation magnetisch gebunden (siehe Kapitel 3.5.2.2). Dies waren in vorliegendem Fall die T-Lymphozyten. Für die anschließende Transplantation wurde die nicht magnetisch markierte Zellpopulation benötigt. Diese sollte möglichst keine T-Lymphozyten mehr enthalten und bestand unter anderem aus bovinen Vorläuferzellen. Da neben den Vorläuferzellen weitere Zellpopulationen nicht selektiert wurden (bovine B-Lymphozyten und Monozyten), wird diese gewünschte Zellfraktion im Folgenden als Stammzell-enhaltende Fraktion, SeF, bezeichnet.

Zur Durchführung der T-Zell-Depletion und der anschließenden Transplantation wurden im Rahmen der vorliegenden Arbeit acht bovine Nabelschnurblutproben und eine Probe bovines peripheres Blut vom Kalb verwendet.

Die Höhe der Zellzahlen der jeweiligen Zellfraktionen wurde wie folgt bestimmt: Die Zellen der betreffenden SeF wurden nach Gewinnung manuell ausgezählt (siehe Kapitel 3.5.1). Die Anzahl an depletierten T-Lymphozyten konnte hingegen nur rechnerisch bestimmt werden. Hierzu wurde von der Ursprungszellzahl vor der Depletion die ausgezählte Gesamtzellzahl der jeweiligen SeF subtrahiert.

Aus den Nabelschnurblutproben wurde im Durchschnitt eine SeF in Höhe von $8,06 \times 10^6$ (minimal $3,74 \times 10^6$; maximal $1,48 \times 10^7$), aus der Probe peripheren Blutes von $3,71 \times 10^7$ Zellen isoliert. Hieraus resultierte rechnerisch eine T-Zell-Population in Höhe von durchschnittlich $1,66 \times 10^7$ in den Nabelschnurblutproben (minimal $9,5 \times 10^6$; maximal $3,21 \times 10^7$) und von $9,99 \times 10^7$ in der Probe peripheren Blutes (siehe Anhang: Tabelle 12 auf Seite 116).

Prozentual betrug der Anteil der gewünschten SeF an der Ursprungszellzahl aufgetauter bCBMC zwischen 15,63 % und 57,33 %. Der prozentuale Anteil der T-Lymphozyten an der jeweiligen Ursprungszellzahl nach dem Auftauen betrug somit minimal 42,67 % und maximal 84,37 %. Im Durchschnitt machte die SeF 35,83 % und die T-Zell-Fraktion 64,17 % der aufgetauten bovinen CBMC aus. Für die Probe peripheren Blutes betrug der Anteil der SeF 27,08 % und der Anteil der T-Lymphozyten folglich 72,92 % an der Gesamtzahl der aufgetauten PBMC. Dies verdeutlicht die Abbildung 3 auf Seite 52 nochmals grafisch für alle Einzelproben.

Die Probennummern 1 bis 6 sowie die Probe peripheren Blutes (siehe Nummer 9 in Abbildung 3) wurden im Anschluss an die Depletion insgesamt 17 neugeborenen Mäusen transplantiert, die Probennummern 7 und 8 wurden zwei adulten Mäusen injiziert. Den neugeborenen Mäusen wurden mit 2×10^6 Zellen jeweils nur ein Fünftel der Zellen transplantiert, welche den Adulten injiziert wurden (1×10^7). Zur Berechnung der pro Tier zu injizierenden Menge wurde ausschließlich die Anzahl der vitalen Zellen der SeF herangezogen. Die Bestimmung erfolgte mittels Trypanblau (siehe Kapitel 3.5.2).

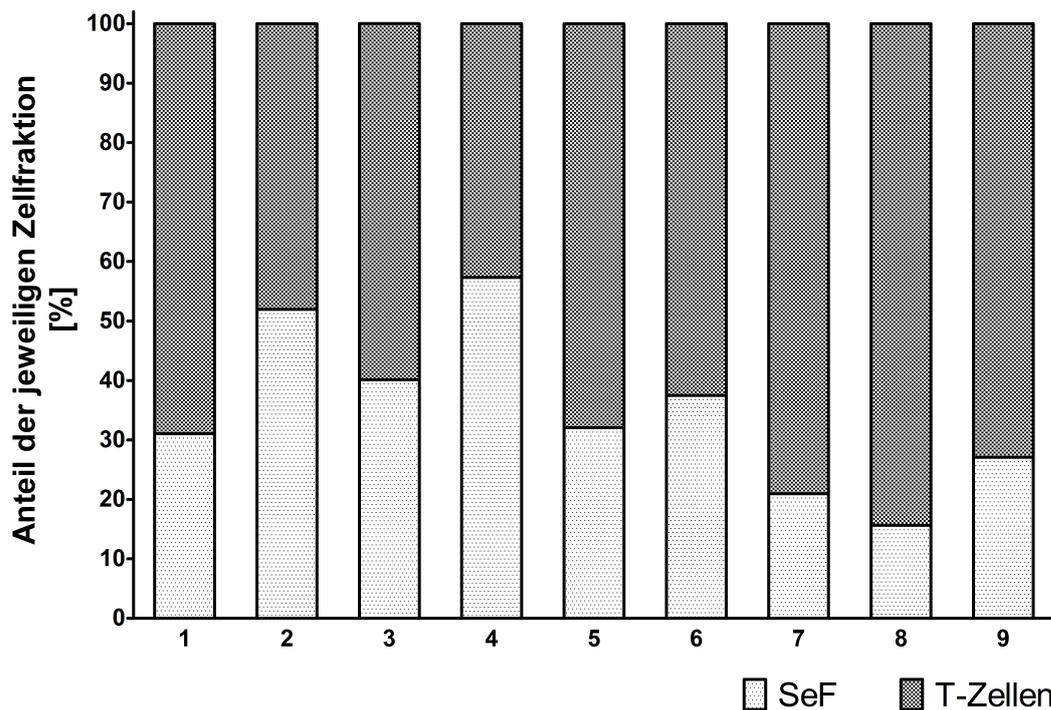


Abb. 3: Prozentuale Anteile der Stammzell-enthaltenden Fraktion (SeF) sowie der T-Lymphozyten nach T-Zell-Depletion boviner mononukleärer Zellen (bMC). Die bovinen T-Lymphozyten wurden mittels negativer T-Zell-Depletion aus den bMC selektiert. Die übrige Zellfraktion (SeF) wurde für die Transplantation in immundefiziente Mäuse weiterverwendet. Die Zellzahl in der SeF wurde durch manuelle Zellzählung mittels Neubauer-Zählkammer bestimmt, die der T-Lymphozyten rechnerisch (Ursprungszellzahl vor T-Zell-Depletion minus Gesamtzellzahl der SeF). Die Zahl der T-Lymphozyten war bei fast allen Stichproben höher als die der SeF (für 8 von 10 Stichproben > 50 %). Der Anteil der SeFs sowie der T-Lymphozyten-Fractionen variierte zwischen den Einzelproben deutlich. n = 9; Probennummern 1-8: bo NSB; Probe Nummer 9: bo pB.

Wie zu Beginn des Kapitels bereits angeführt, wurde auch nach den erfolgten Separationen die Vitalität der jeweils gewonnenen Zellfraktionen bestimmt.

Danach, und somit unmittelbar vor der Transplantation, unterschied sich die Zellvitalität zwischen den Proben deutlich. Dies verdeutlicht die Abbildung 4 auf Seite 53. Die Vitalität der Zellen nach der T-Zell-Depletion (n = 9) war signifikant höher als nach der positiven Separation (n = 3; p = 0,0091; Mann-Whitney Test). Hierbei muss allerdings der deutliche Unterschied der Stichprobengrößen berücksichtigt werden.

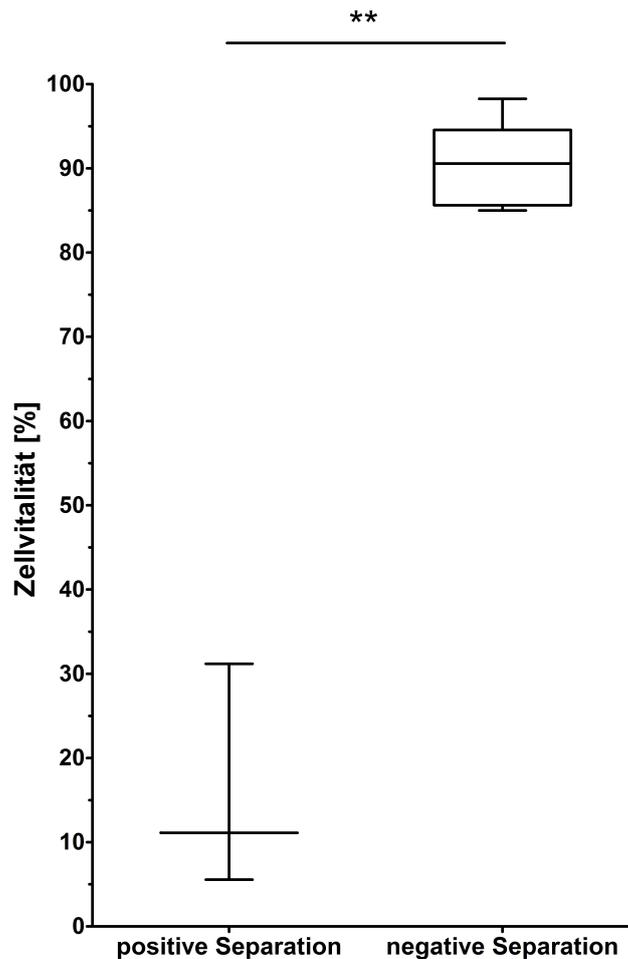


Abb. 4: Vergleich der Zellvitalität unmittelbar nach positiver und nach negativer Zellseparation. Dargestellt ist die Zellvitalität nach erfolgter Separation (positiv und negativ). Die Zellzählung erfolgte manuell unter Verwendung von Trypanblau. Alle dargestellten Proben wurden für die Transplantation immundefizienter Mäuse verwendet. Die Zellvitalität nach den positiven Zellseparationen ist signifikant geringer als die Zellvitalität nach den als T-Zell-Depletionen durchgeführten negativen Zellseparationen. Darstellung als Boxplot mit Median, Minimum und Maximum. Auswertung mittels Mann-Whitney Test. ** $p \leq 0,01$. positive Separation: $n = 3$ (boNSB); negative Separation: $n = 9$ (8 x boNSB, 1 x boPB).

4.3 Transplantationsverlauf

Mit Hilfe der Abbildung 5 auf Seite 54 soll die beschriebene Vorgehensweise schematisch zusammengefasst und verdeutlicht werden. Generell erhielten die Mäuse der Versuchsgruppe A im neugeborenen Alter positiv selektierte Zellen aus bovinem Nabelschnurblut (CD34+ und c-kit+). Den Mäusen der Versuchsgruppe B wurden hingegen Zellen der mittels T-Zell-Depletion durchgeführten negativen Separationen transplantiert (SeF). Diese wiederum stammten ursprünglich sowohl aus bovinem Nabelschnurblut als auch aus bovinem peripherem Blut von Kälbern und wurden den Mäusen darüber hinaus sowohl im neugeborenen Alter als auch adult injiziert.

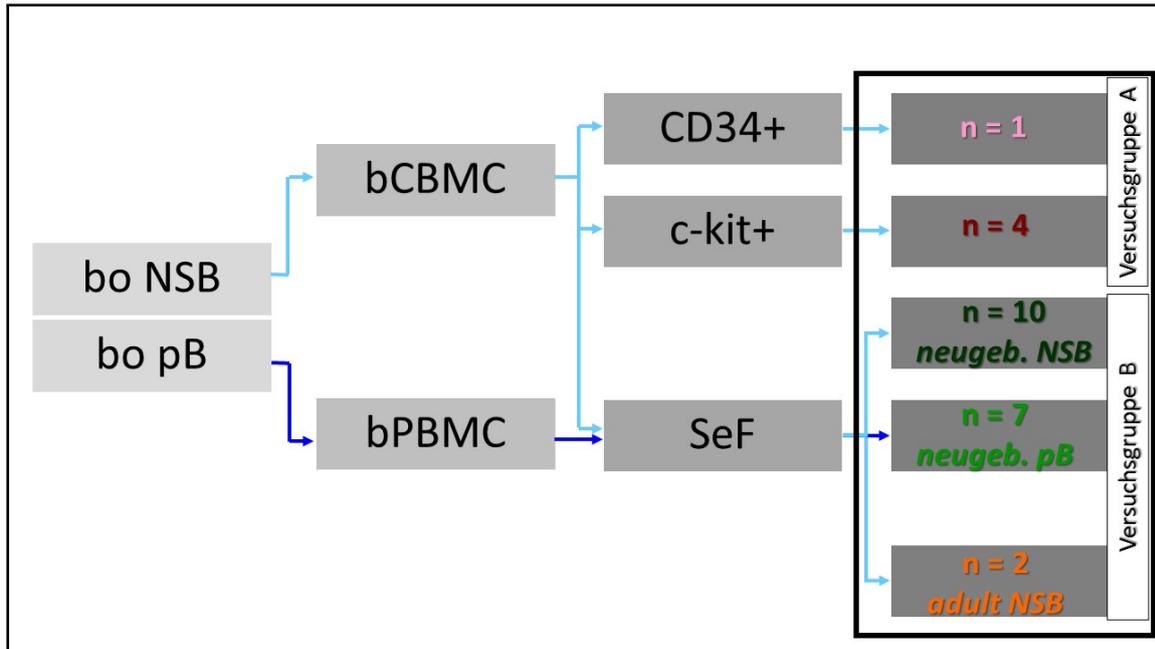


Abb. 5: Schematische Darstellung der Vorgehensweise für die vorliegende Arbeit. Aus bovinem Ursprungsmaterial (bovines Nabelschnurblut, bo NSB (hellblau) und bovines peripheres Blut, bo pB (dunkelblau)) wurden mittels Dichtegradientenzentrifugation die jeweiligen bovinen mononukleären Zellen (bMC) gewonnen (bCBMC aus NSB, bPBMC aus pB). Mittels positiver Separation wurden aus den Zellen der Nabelschnurblutproben bovine CD34-positive (CD34+) und bovine c-kit-positive (c-kit+) Zellen isoliert, welche wiederum neugeborenen NSG Mäusen transplantiert wurden (Versuchsgruppe A). Mittels negativer Separation, hier als T-Zell-Depletion durchgeführt, wurden aus beiden Arten boviner mononukleärer Zellen (bCBMC und bPBMC) die T-Lymphozyten selektiert und somit die Stammzell-enthaltenden Fraktionen (SeF) gewonnen. In der Versuchsgruppe B wurden diese Zellen ebenfalls NSG Mäusen transplantiert, jedoch, im Unterschied zur Versuchsgruppe A, neugeboren und adult.

Als Parameter zur Beschreibung des Transplantationsverlaufes und -erfolges wurden das klinische Scoring der Mäuse einschließlich Gewichtsbestimmung, die Erfassung des Blutbildes je Blutentnahme pro Tier sowie durchflusszytometrische Analysen des Blutes im laufenden Versuch und Analysen von Blut und ausgewählten Organen zum Zeitpunkt des Versuchsendes (post mortem) herangezogen.

Insbesondere die Gewichtsbestimmung stellte einen sehr guten Parameter zur Abschätzung des Gesundheitszustandes der Einzeltiere dar. Aufgrund der engmaschigen Durchführung des Gesamtscoreings (mindestens dreimal pro Woche) konnten Veränderungen bereits frühzeitig erkannt und, falls notwendig, ein vorzeitiges Versuchsende eingeleitet werden.

Auch die systematische Erfassung des Blutbildes, hier insbesondere die Entwicklung der Gesamtleukozytenzahl, ermöglichte eine gute Einschätzung der Konstitution der Mäuse.

Mittels detaillierter und wiederholter durchflusszytometrischer Messungen der Blutproben der Einzeltiere konnte ein genaues Bild des Transplantationsverlaufes jeder einzelnen mit bovinen Zellen transplantierten Maus gezeichnet werden. Zusätzlich dazu ermöglichten die durchflusszytometrischen Messungen der Einzelproben aus den zum jeweiligen Versuchsende gewonnenen Proben, hier Blut, Milz und Knochenmark, eine

genauere Aussage über das Anwachsen und die Reifung der bovinen Zellen im Organismus Maus.

4.3.1 Versuchsgruppe A - CD34+/ c-kit+

Die Versuchsgruppe A stellte mit insgesamt fünf Tieren eine sehr kleine Gruppe dar. Die geringe Anzahl an transplantierten Mäusen war auf die vergleichsweise schwierige Verfügbarkeit diesbezüglicher boviner Antikörper und die niedrigen Zellzahlen selektierter boviner Vorläuferzellen (CD34+ und c-kit+) zurückzuführen. Da nur sehr wenige bovine Vorläuferzellen isoliert werden konnten (siehe Tabelle 11 auf Seite 50), lag der Fokus in der Versuchsgruppe A vor allem auf der Transplantation neugeborener Mäuse. Es wurde keine adulte Maus mit bovinen CD34-positiven beziehungsweise c-kit-positiven Zellen transplantiert (vgl. Kapitel 4.2.1).

Eine der Mäuse der Versuchsgruppe A wurde neugeboren mit CD34-positiven Zellen transplantiert. Vier neugeborenen Mäusen wurden c-kit-positive Zellen injiziert.

4.3.1.1 Scoring

Der klinische Score aller Mäuse der Versuchsgruppe A wich während des gesamten Versuchszeitraumes nicht von dem physiologischen Normalzustand ab. Zudem wurde im Laufe des Versuches bei allen Mäusen eine stetige Gewichtszunahme festgestellt. Es traten bei allen Tieren vereinzelt Schwankungen des Körpergewichts auf (siehe Abbildung 6 auf Seite 56), diese wichen aber nie zu mehr als 20 % von dem vorher erreichten Maximalgewicht ab. Das Abbruchkriterium bezüglich des Körpergewichtes wurde somit von keiner Maus zu keinem Zeitpunkt erreicht.

Zusammenfassend musste in der Versuchsgruppe A keine der fünf Mäuse aufgrund einer Verschlechterung ihres Gesundheitszustandes oder des Erreichens von Abbruchkriterien (siehe Kapitel 3.6.5 sowie Tabelle 6 auf Seite 33) getötet werden.

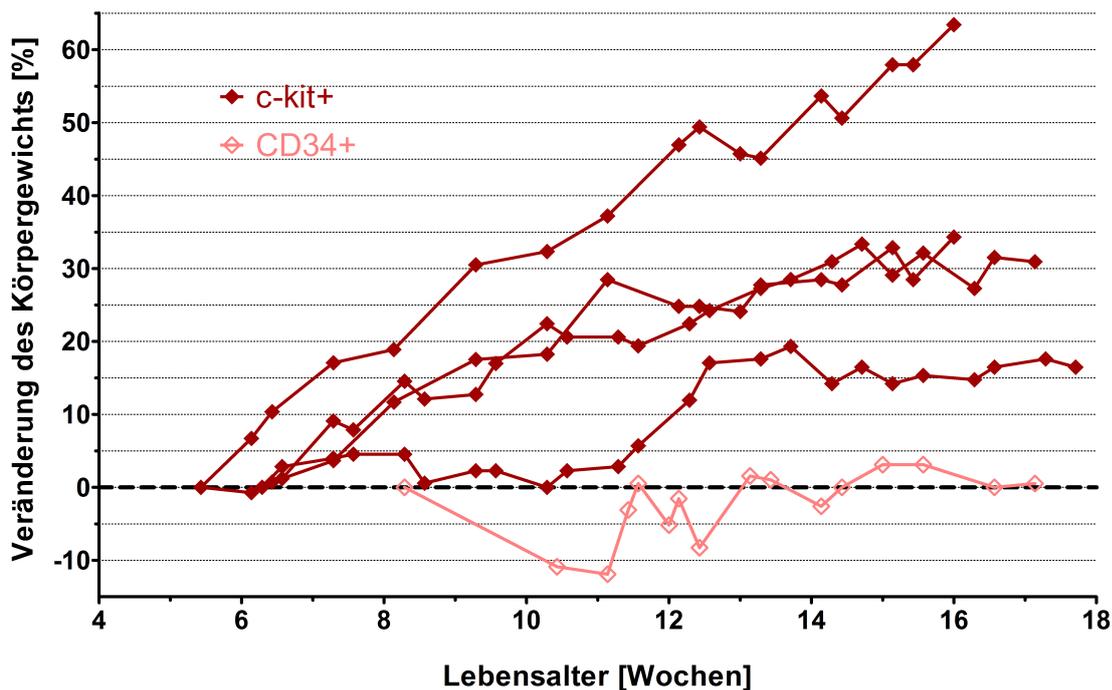


Abb. 6: Prozentuale Veränderung des Körpergewichts der Mäuse der Versuchsgruppe A im Versuchszeitraum. Dargestellt ist die prozentuale Veränderung des Körpergewichts der Mäuse während des Versuchszeitraumes beginnend frühestens ab der fünften Lebenswoche. Vier Mäusen wurden neugeboren bovine c-kit-positive Zellen transplantiert (c-kit+), einer Maus wurden neugeboren bovine CD34-positive Zellen transplantiert (CD34+). Im Versuchszeitraum nahm das Körpergewicht der mit bovinen c-kit-positiven Zellen transplantierten Mäuse stetig zu. Das Körpergewicht der mit bovinen CD34-positiven Zellen transplantierten Maus schwankte von der 10. bis zur 13. Lebenswoche stark (minimal -11,92 % bis maximal +1,55 % Veränderung in Bezug auf das Ursprungsgewicht). Nach der 14. Lebenswoche entwickelte sich das Körpergewicht dieses Tieres nahezu konstant. Transplantation boviner CD34-positiver Vorläuferzellen: n = 1 (CD34+); Transplantation boviner c-kit-positiver Vorläuferzellen: n = 4 (c-kit+).

4.3.1.2 Blutbild

Die mit Hilfe des verwendeten Analysegerätes scil Vet abc (Scil animal care company GmbH, Viernheim, D) erfassten Parameter im Blut der Mäuse (siehe Tabelle 7 auf Seite 36) dienen vornehmlich der Überprüfung des Gesundheitszustandes der Mäuse. Insbesondere ein plötzlicher Anstieg der absoluten Leukozytenzahl hatte sich bei Untersuchungen der Arbeitsgruppe zu humanisierten Mäusen als sensibler Indikator für ein sich verschlechterndes Allgemeinbefinden, teilweise auch in Verbindung mit einem Gewichtsverlust, erwiesen.

Dies konnte für die Tiere der Versuchsgruppe A in der vorliegenden Arbeit nicht bestätigt werden. Für zwei der vier Mäuse wurde zum Versuchsende zwar eine starke Zunahme der relativen Gesamtleukozytenzahl festgestellt (siehe Abbildung 7 auf Seite 57). Wie im Vorkapitel ausgeführt, wurden im Versuchszeitraum allerdings keinerlei klinische Auffälligkeiten festgestellt. Auch die Entwicklung des Körpergewichts beider Tiere war weiterhin zunehmend (siehe Abbildung 6).

Insgesamt entwickelte sich die Gesamtleukozytenzahl im peripheren Blut der Mäuse der

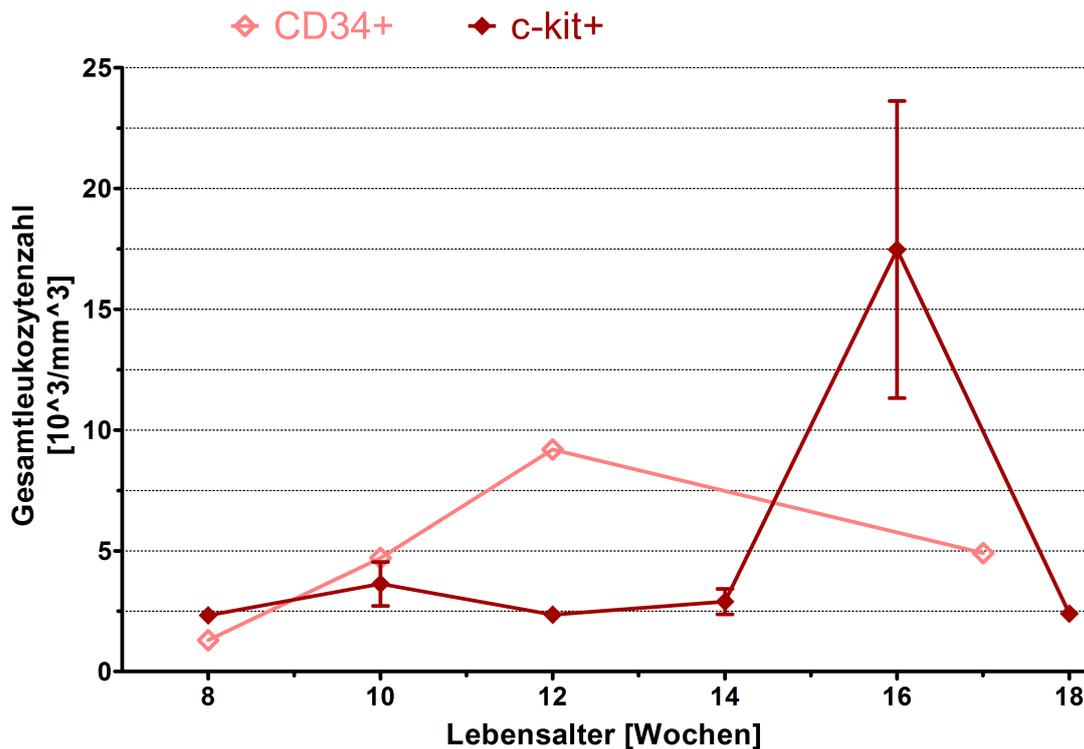


Abb. 7: Entwicklung der Gesamtleukozytenzahl im peripheren Blut der Mäuse der Versuchsgruppe A während des Versuchszeitraumes. Eine Maus wurde neugeboren mit bovinen CD34-positiven Zellen transplantiert (CD34+). Vier Mäuse wurden neugeboren bovine c-kit-positive Zellen transplantiert (c-kit+). Die Blutentnahme erfolgte in zweiwöchigem Abstand. Die Gesamtleukozytenzahl wurde mittels Analysegerät (scil Vet abc) bestimmt. Die Gesamtleukozytenzahl der mit c-kit-positiven Zellen transplantierten Mäuse entwickelte sich vor allem zu Beginn des Versuches konstant. In Richtung Versuchsende wurde eine starke Zunahme der Werte festgestellt. Bei der mit bovinen CD34-positiven Zellen transplantierten Maus stieg die Zahl der Gesamtleukozyten zu Beginn des Versuches an und nahm am Versuchsende geringfügig ab. Mittelwert \pm SEM. Statistisch nicht auswertbar. n = 1 (CD34+); n = 4 (c-kit+).

Versuchsgruppe A während des gesamten Versuches relativ konstant. Mit Ausnahme der Werte zweier Mäuse zum Versuchsende traten im Versuchszeitraum nur minimale Schwankungen auf. Hervorzuheben ist die Entwicklung der Gesamtleukozytenzahl für die Maus, der CD34-positive Zellen transplantiert wurden. Für diese konnte ein linearer Anstieg dieses Parameters von der 8. bis zur 12. Lebenswoche auf ein Maximum von $9,2 \cdot 10^3/\text{mm}^3$ festgestellt werden. Zum Versuchsende sank dieser Wert wieder ab. Die mit c-kit-positiven Zellen transplantierten Mäuse wiesen in der 12. Lebenswoche hingegen sehr ähnliche Werte der Gesamtleukozytenzahl im Blut auf (minimal $2,2 - \text{maximal } 2,6 \cdot 10^3/\text{mm}^3$; n=4). Diese Werte waren um das Vierfache geringer als der benannte Maximalwert der mit CD34-positiven Zellen transplantierten Maus.

Neben der Gesamtleukozytenzahl wurde während des Versuchszeitraumes die Zahl der Lymphozyten, Granulozyten und Monozyten im peripheren Blut der Mäuse bestimmt. Die Entwicklung der Lymphozytenzahl verlief annähernd wie die in Abbildung 7 dargestellte Entwicklung der Gesamtleukozytenzahl (siehe Anhang: Abbildung 27 auf Seite

117). Dies war darauf zurückzuführen, dass der Anteil der Lymphozyten an der Gesamtleukozytenzahl am größten war (siehe Abbildung 8). Ein ähnlicher Verlauf wurde für die Gesamtzahl an Monozyten (siehe Anhang: Abbildung 28 auf Seite 118) sowie für die Gesamtzahl an Granulozyten (siehe Anhang: Abbildung 29 auf Seite 119) festgestellt.

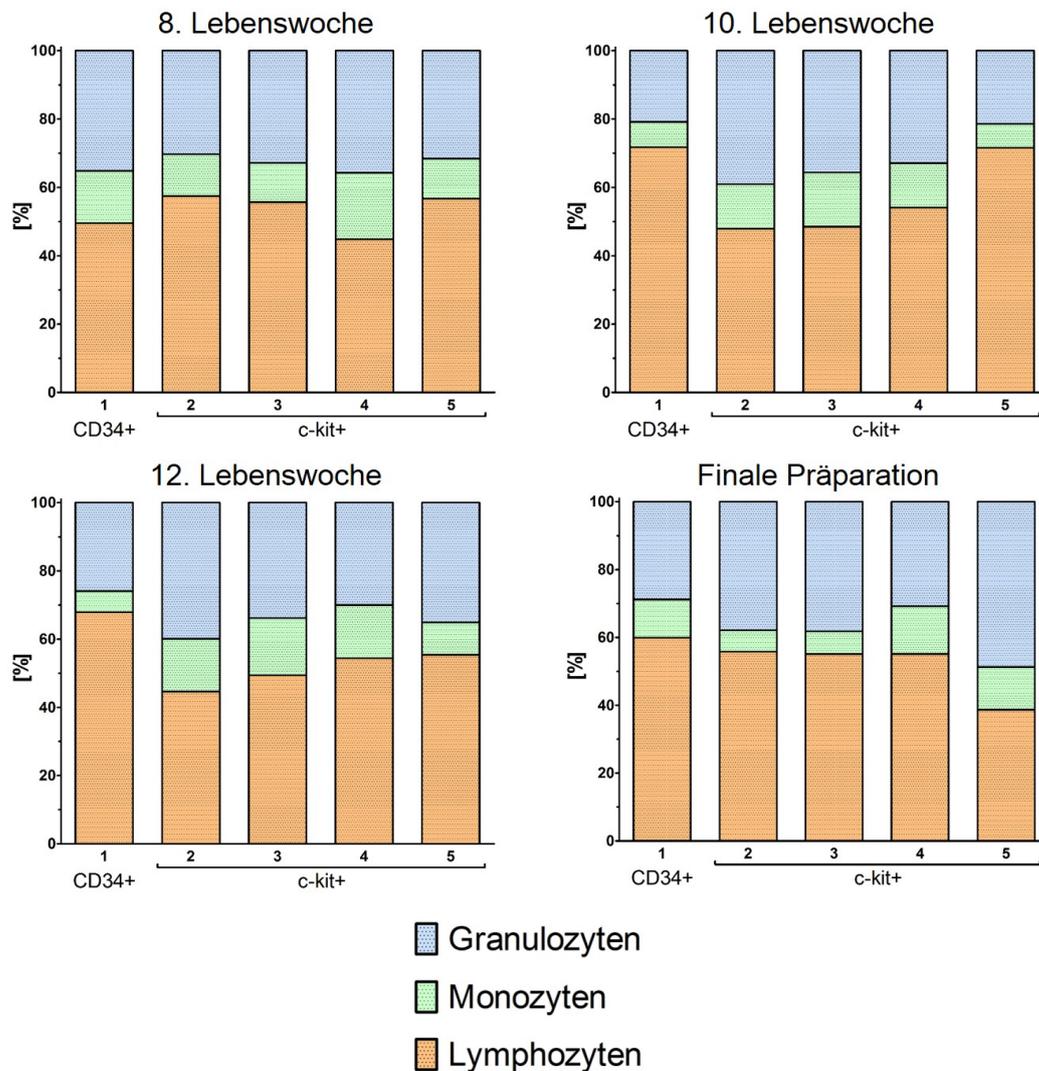


Abb. 8: Entwicklung der prozentualen Anteile an Granulozyten, Monozyten und Lymphozyten im peripheren Blut der Mäuse der Versuchsgruppe A. Eine Maus wurde neugeboren mit bovinen CD34-positiven Zellen transplantiert (CD34+). Vier Mäusen wurden neugeboren bovine c-kit-positiv Zellen transplantiert (c-kit+). Die Blutentnahme erfolgte in zweiwöchigem Abstand. Dargestellt sind die Ergebnisse der Messungen in der 8., 10. und 12. Lebenswoche sowie die Ergebnisse im Rahmen der finalen Präparation. Die prozentualen Anteile von Granulozyten, Monozyten und Lymphozyten wurden mittels Analysegerät (scil Vet abc) bestimmt. Bei allen Mäusen der Versuchsgruppe A stellten die Lymphozyten die größte und die Monozyten die geringste Fraktion dar. Die Werte schwankten im Laufe des Versuches geringfügig. Bei der mit bovinen CD34-positiven Zellen transplantierten Maus nahm der Anteil an Lymphozyten in der 10. und 12. Lebenswoche deutlich zu. Generell ähnelt die Zusammensetzung des murinen Blutes der Mäuse der Versuchsgruppe A dem lymphozytären Blutbild von Rindern. n = 1 (CD34+); n = 4 (c-kit+).

Die prozentualen Anteile der Lymphozyten, Monozyten und Granulozyten im Blut der Versuchstiere schwankten über den gesamten Versuchszeitraum unterschiedlich stark. Der Anteil der Lymphozyten war nahezu während des gesamten Versuches am höchsten (circa 40 – 70 %). Die nächst größere Zellfraktion stellten die Granulozyten dar (circa 20 – 40 %). Erwartungsgemäß wurden am wenigsten Monozyten nachgewiesen (circa 6 – 17 %). Diese Verteilung ähnelte stark dem physiologischen, lymphozytären Blutbild von Rindern. Die Entwicklung der prozentualen Anteile von Lymphozyten, Monozyten und Granulozyten im Blut der Mäuse der Versuchsgruppe A verdeutlicht die Abbildung 8 auf Seite 58. Insbesondere die Mäuse, denen c-kit-positive Zellen transplantiert wurden, zeigten bezüglich dieser Werte im gesamten Versuchszeitraum einen sehr einheitlichen Verlauf. Die Maus, der CD34-positive Zellen transplantiert wurden, wies dagegen kurzfristig, insbesondere in der 10. und in der 12. Lebenswoche, deutlich höhere Anteile an Lymphozyten auf (71,8 %; 67,9 %).

Hinsichtlich der erythrozytären Blutwerte wurden während des Versuchszeitraumes im Vergleich der jeweiligen Einzelwerte der Mäuse der Versuchsgruppe A keine in Zusammenhang stehenden Auffälligkeiten festgestellt (siehe Anhang: Tabelle 13 auf Seite 120).

4.3.1.3 Durchflusszytometrische Analysen

Die ab der achten Lebenswoche im zweiwöchigen Abstand entnommenen Blutproben wurden über die Blutbildanalyse hinaus für durchflusszytometrische Analysen genutzt. Durch die Verwendung spezifischer Antikörper konnten die Zellpopulationen im Blut der Mäuse noch genauer bestimmt werden. Insbesondere konnte auf diese Weise eine Differenzierung von bovinen und murinen Leukozyten vorgenommen werden. Dafür wurde das Blut aller Versuchstiere zunächst mit Hilfe des „globalen“ CD45-Markers analysiert (siehe Kapitel 3.8.3). Das CD45-Molekül wird auch bei Rind und Maus auf der Oberfläche aller Leukozyten exprimiert (HOWARD et al. 1991; NAESSENS et al. 1997; TROWBRIDGE 1978). Mit Hilfe spezifischer boviner und muriner anti-CD45-Antikörper konnte der Anteil beider Zellpopulationen an der Gesamtleukozytenzahl durchflusszytometrisch quantifiziert werden. Dies wiederum erlaubte Aussagen über den Grad des Anwachsens der transplantierten bovinen Vorläuferzellen im Blut der Mäuse.

Für die Mäuse der Versuchsgruppe A erwies sich der Anteil boviner CD45-positiver Leukozyten an der Gesamtleukozytenzahl im peripheren Blut als sehr unterschiedlich. Bei vier von fünf Mäusen war dieser mit minimal 0,2 % bis maximal 1,6 % eher niedrig. Bei einem Tier (c-kit+) aus dieser Versuchsgruppe konnte jedoch fast über den gesamten Versuchszeitraum ein Vielfaches dieser Werte nachgewiesen werden. Die Abbildung 9 auf Seite 60 verdeutlicht die Entwicklung des prozentualen Anteils boviner CD45-positiver Zellen im peripheren Blut aller Mäuse der Versuchsgruppe A während des gesamten Versuchszeitraumes.

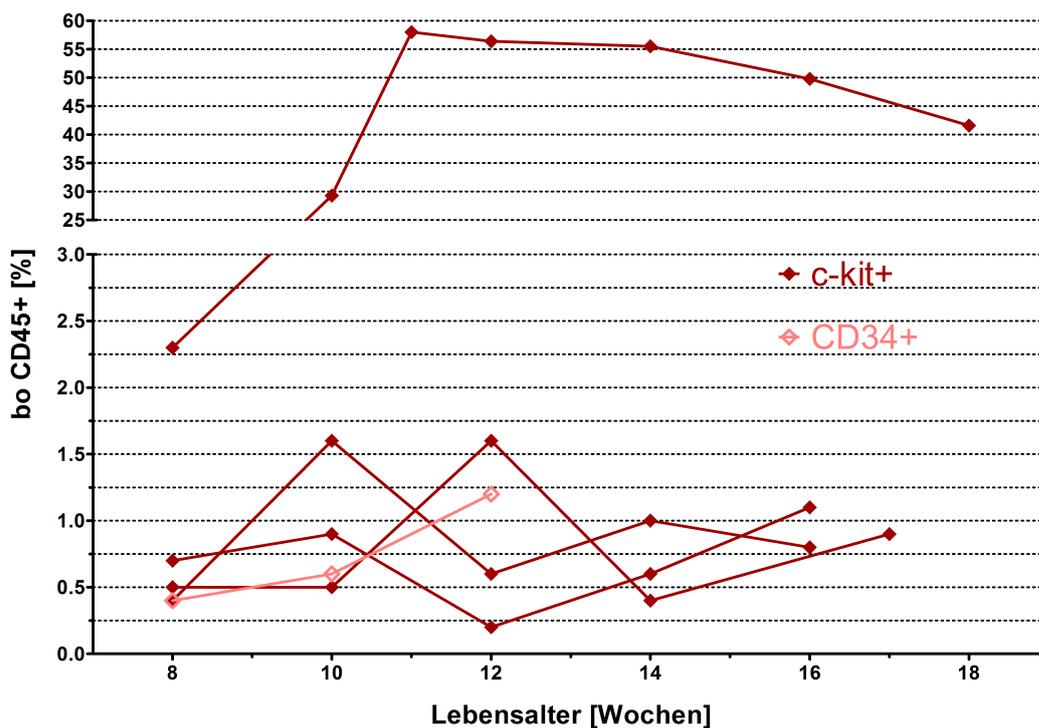


Abb. 9: Entwicklung des Prozentsatzes boviner CD45-positiver Zellen im Blut der mit bovinen CD34-positiven oder c-kit-positiven Zellen transplantierten Mäuse der Versuchsgruppe A. Durchflusszytometrische Analyse murinen peripheren Blutes unter Verwendung eines anti-bovinen CD45-Antikörpers sowie eines anti-murinen CD45-Antikörpers. Eine Maus wurde neugeboren mit bovinen CD34-positiven Zellen transplantiert (CD34+). Vier Mäusen wurden neugeboren bovine c-kit-positiv Zellen transplantiert (c-kit+). Die durchflusszytometrischen Messungen des peripheren Blutes der neugeboren transplantierten Mäuse erfolgten ab der 8. Lebenswoche in zweiwöchigem Abstand. Vier der fünf Mäuse wiesen während des gesamten Versuches zwischen 0,2 % und 1,6 % bovine CD45-positiv Zellen (bo CD45+) im peripheren Blut auf. Die Maximalwerte wurden in der 10. und 12. Lebenswoche erreicht. Bei einer Maus (c-kit+) wurde vom Versuchsbeginn an ein höherer Anteil boviner CD45-positiv Zellen festgestellt. Dieser stieg bis auf ein Maximum von 58,0 % in der 11. Lebenswoche kontinuierlich an und entwickelte sich bis zum Versuchsende relativ konstant. n = 1 (CD34+); n = 4 (c-kit+).

Bei allen Mäusen der Versuchsgruppe A war der Anteil an bovinen CD45-positiven Zellen zum Zeitpunkt der ersten Messung in der 8. Lebenswoche gering (0,4 % bis 2,3 %). Zur zweiten Messung in der 10. Lebenswoche stieg dieser Anteil dagegen bei fast allen Mäusen mehr oder weniger stark an (0,5 % bis 2,9 %). Der stärkste Anstieg wurde bis zur 12. Lebenswoche bei einer der Mäuse festgestellt, denen c-kit-positiv Zellen transplantiert wurden (von 2,3 % boCD45-positiv Zellen in der 8. Lebenswoche auf 58,0 % in der 11. und auf 56,4 % in der 12. Lebenswoche). Die Ergebnisse der durchflusszytometrischen Messungen für dieses Tier werden in der Abbildung 10 auf Seite 61 zusammenfassend veranschaulicht. Ab der 12. Lebenswoche wurde bei dieser Maus kein erneuter Anstieg, aber eine gewisse Konstanz des hohen Anteils boviner CD45-positiv Zellen im peripheren Blut festgestellt (siehe Abbildung 9). Bis zur 18. Lebenswoche betrug dieser minimal 41,6 % (18. Lebenswoche) und maximal 58,0 % (11. Lebenswoche).

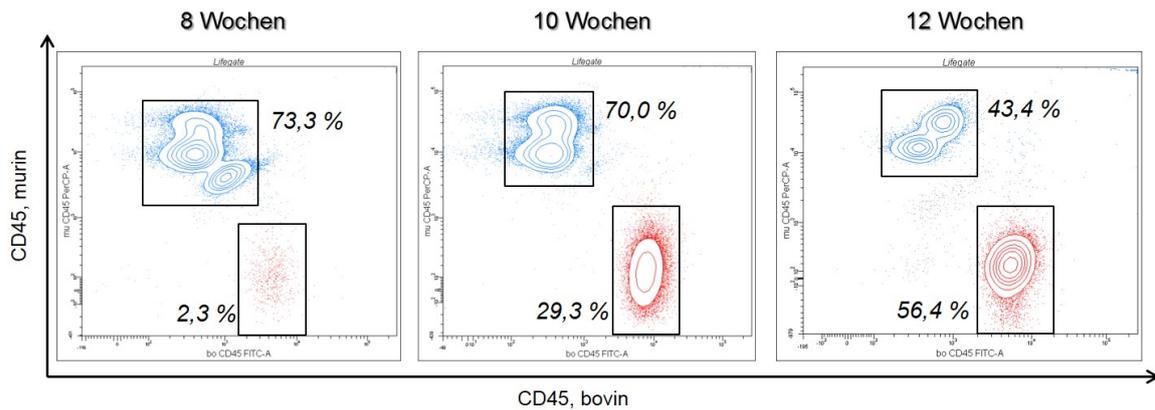


Abb. 10: Darstellung der Entwicklung des Prozentsatzes boviner und muriner CD45-positiver Zellen im Blut einer Maus der Versuchsgruppe A anhand durchflusszytometrischer Messungen. Durchflusszytometrische Analyse murinen peripheren Blutes unter Verwendung eines anti-bovinen CD45-Antikörpers sowie eines anti-murinen CD45-Antikörpers in der 8., 10. und 12. Lebenswoche. Dargestellt sind die Daten einer NSG Maus, welcher neugeborenen bovine c-kit-positive Zellen transplantiert wurden. Bovine Zellen (CD45, bovin) in rot dargestellt, murine Zellen (CD45, murin) in blau. Der Anteil boviner CD45-positiver Zellen stieg im Laufe der ersten Lebenswochen deutlich an. n = 1 (c-kit+).

Der Prozentsatz boviner CD45-positiver Zellen im Blut dieser Maus stellte ein Vielfaches der Werte der anderen vier Tiere der Versuchsgruppe A dar. Für zwei der anderen Mäuse wurden im Gegensatz dazu Maximalwerte boviner CD45-positiver Zellen im peripheren Blut in Höhe von jeweils lediglich 1,6 % in der 10. und in der 12. Lebenswoche festgestellt (siehe Abbildung 9 auf Seite 60).

Bei den Mäusen, für die der Anteil boviner CD45-positiver Zellen im peripheren Blut über 2 % lag, kamen neben den globalen CD45-Markern zusätzliche Antikörper zum Einsatz. Diese ermöglichten eine differenziertere Analyse einzelner boviner Zellpopulationen (siehe Kapitel 3.8.3). Dies galt in der Versuchsgruppe A für ein Tier. Es handelte sich um die Maus, in deren Blut der größte Anteil boviner CD45-positiver Zellen nachgewiesen wurde (siehe Abbildung 9 und Abbildung 10).

Der prozentuale Anteil boviner B-Lymphozyten an der Gesamtzahl boCD45-positiver Leukozyten lag bei dieser Maus für die Dauer des gesamten Versuches in einem sehr niedrigen Bereich (zwischen 0,5 % und 2,2 %). Die Anzahl boviner natürlicher Killerzellen (boCD335+) war mit minimal 0,1 % sowie maximal 1,7 % erwartungsgemäß niedrig. Bei dem benannten Maximalwert handelte es sich hinsichtlich des Gesamtverlaufes dieses Parameters um einen Einzelfall (siehe Abbildung 11 auf Seite 62).

Vor allem fiel jedoch die Höhe des Anteils der bovinen T-Lymphozyten während des gesamten Versuches auf (zwischen 97,0 % und 99,5 %). Trotz der Dominanz der T-Lymphozyten im murinen peripheren Blut zeigte das betreffende Tier im Laufe des Versuches klinisch keinerlei Auffälligkeiten.

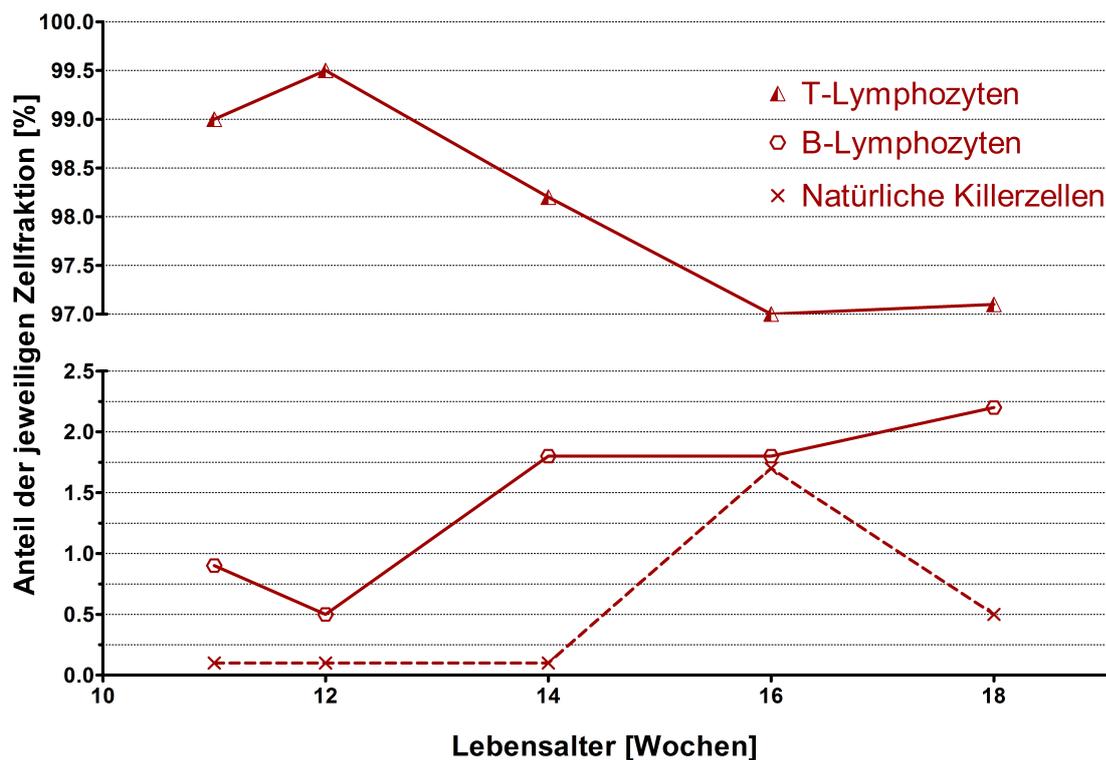


Abb. 11: Entwicklung der prozentualen Anteile einzelner boviner Zellpopulationen im Blut einer mit c-kit-positiven Zellen transplantierten Maus der Versuchsgruppe A. Durchflusszytometrische Analyse murinen peripheren Blutes unter Verwendung anti-boviner CD3- und CD335-Antikörper in zweiwöchigem Abstand. Dargestellt werden die Anteile an bovinen T-Lymphozyten (cyCD3+), B-Lymphozyten (mittels Gatingstrategie, siehe Kapitel 3.8.3) und Natürlichen Killerzellen (boCD335+) an der Gesamtzahl der boCD45-positiven Zellen. Der prozentuale Anteil boviner T-Lymphozyten betrug im Laufe des Versuchszeitraumes zwischen 97,0 % und 99,5 %. Der Anteil von B-Lymphozyten und Natürlichen Killerzellen war hingegen sehr niedrig (B-Lymphozyten: 0,5 % bis 2,2 %; NK-Zellen: 0,1 % bis 1,7 %). Die Zahl an B-Lymphozyten nahm im Laufe des Versuches stetig zu. n = 1 (c-kit+).

Weitere Aussagen zur Zusammensetzung der Population boviner CD3-positiver T-Lymphozyten konnten mit Hilfe zusätzlicher differenzierender Antikörper, anti-boCD8 und anti-boCD4, getroffen werden (siehe Abbildung 12 auf Seite 63).

Die Anteile boviner zytotoxischer T-Zellen (CD3+CD8+) und boviner T-Helfer-Zellen (CD3+CD4+) an der Gesamtzahl CD3-positiver boviner Leukozyten waren im Laufe des gesamten Versuches relativ konstant und ähnlich hoch. Die Zahl boviner T-Helfer-Zellen lag im Versuchszeitraum zwischen 25,6 % und 31,9 %, die Zahl boviner zytotoxischer T-Lymphozyten zwischen 24,7 % und 30,5 %.

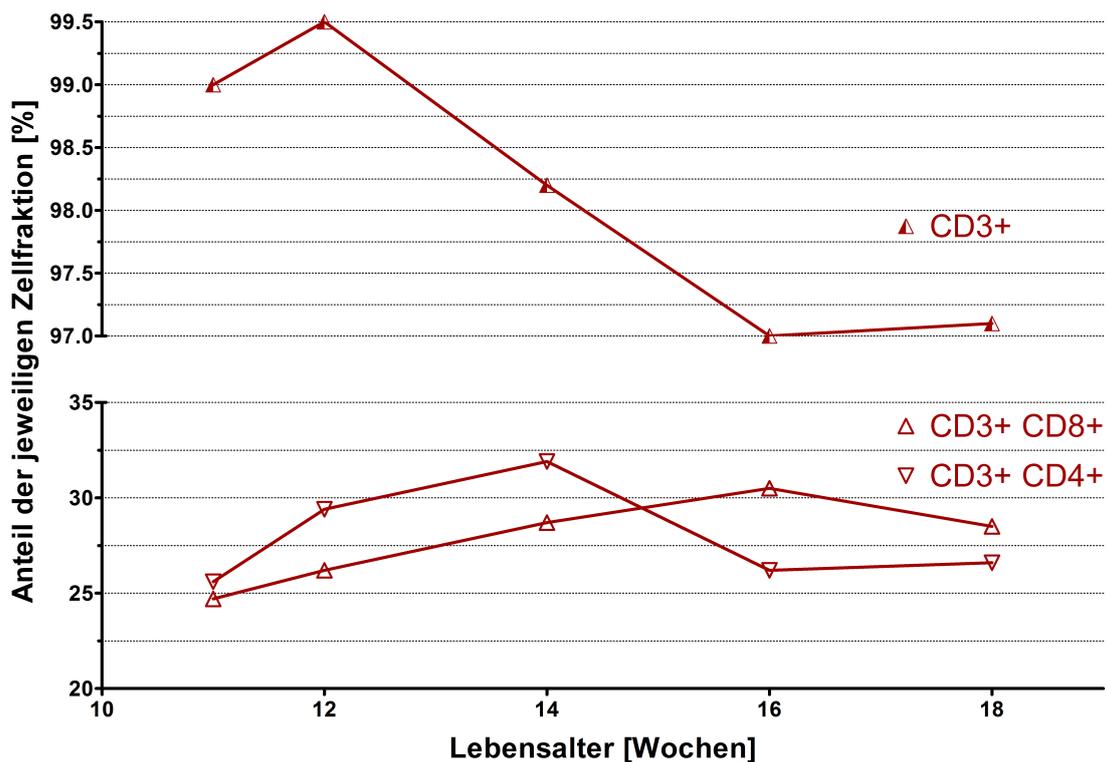


Abb. 12: Differenzierung der Population boviner CD3-positiver T-Lymphozyten im Blut einer mit c-kit-positiven Zellen transplantierten Maus der Versuchsgruppe A im gesamten Versuchszeitraum. Durchflusszytometrische Analyse murinen peripheren Blutes unter Verwendung anti-boviner CD3-, CD4- und CD8-Antikörper in zweiwöchigem Abstand. Dargestellt werden die Anteile an bovinen T-Lymphozyten (cyCD3+) gesamt (obere Kurve) sowie an zytotoxischen T-Lymphozyten (CD3+CD8+) und T-Helfer-Zellen (CD3+CD4+) (untere zwei Kurven) an der Gesamtzahl der boCD3-positiven Zellen. Der Anteil boviner zytotoxischer T-Lymphozyten und boviner T-Helfer-Zellen war im gesamten Versuchszeitraum annähernd gleich. Bis zur 14. Lebenswoche überstieg die Zahl an T-Helfer-Zellen die Zahl zytotoxischer T-Zellen geringfügig. Dies kehrte sich im Laufe der 15. Lebenswoche um. n = 1 (c-kit+).

Im Rahmen der finalen Präparation wurden das Blut der Mäuse sowie die Zellsuspensionen aus Milz und Knochenmark durchflusszytometrisch analysiert (siehe Kapitel 3.6.7 und Kapitel 3.8.3). Dem Milz- und Knochenmarksgewebe kam als lymphatischen Organen in diesem Zusammenhang besondere Bedeutung zu. Wie im Kapitel 2.1 einführend erläutert, gehört das Knochenmark zu den primären und die Milz zu den sekundären lymphatischen Organen. Mit Hilfe der Analyse dieser Gewebe zum jeweiligen Ende des Versuches sollten noch genauere Aussagen zum Engraftment sowie zur Reifung und Auswanderung der bovinen Zellen im Organismus Maus ermöglicht werden.

Insbesondere in Blut und im Knochenmark wurden bei allen Mäusen der Versuchsgruppe A am Versuchsende Anteile boviner CD45-positiver Zellen nachgewiesen, welche den im Laufe des Versuches erhobenen Daten im peripheren Blut ähnelten. Bei vier von fünf Mäusen wurden in Blut und Knochenmark weniger als 2 % boCD45-positiv Zellen nachgewiesen (Blut: 0,8 bis 1,6 %; Knochenmark: 0,8 % bis 1,3 %; siehe Abbildung 13 auf Seite 64). Bei einer Maus (c-kit+) wurden im Vergleich dazu sehr viel höhere Werte festgestellt (Blut: 33,9 %; Knochenmark: 10,2 %).

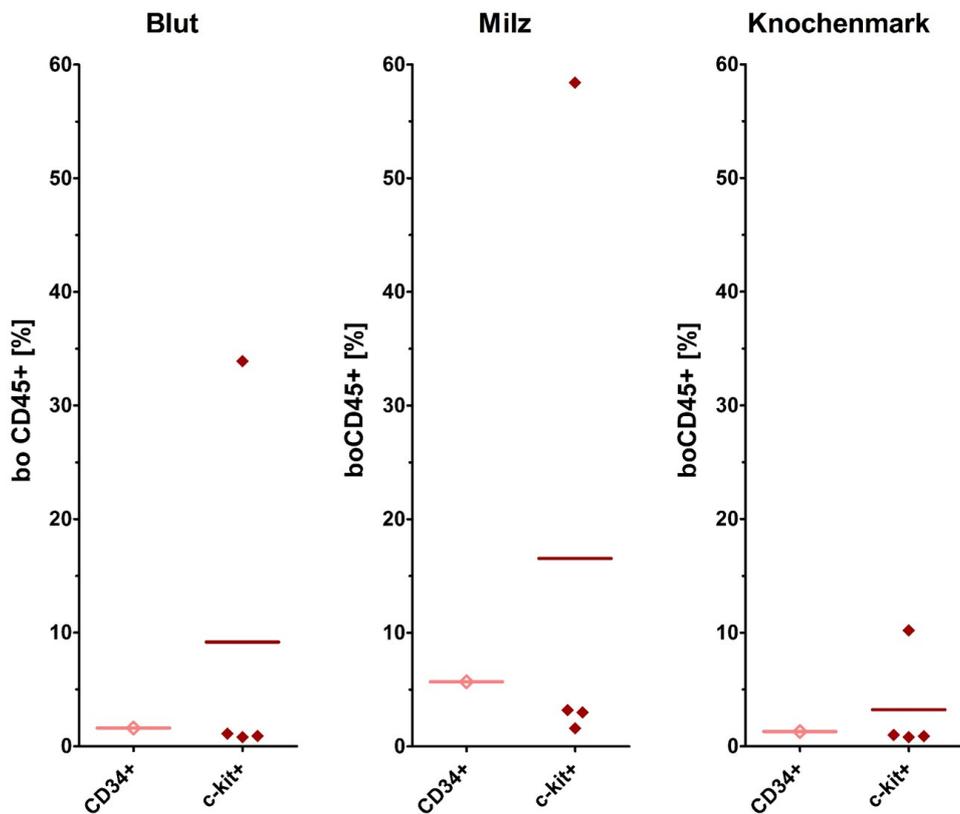


Abb. 13: Prozentualer Anteil boviner CD45-positiver Zellen in Blut, Milz und Knochenmark der Mäuse aus der Versuchsgruppe A bei Versuchsende. Durchflusszytometrische Analyse von murinem kardialen Blut sowie von Zellsuspensionen aus murinem Milz- und Knochenmarksgewebe (Gewinnung siehe Kapitel 3.6.7) von den Mäusen der Versuchsgruppe A. Eine Maus wurde neugeboren mit bovinen CD34-positiven Zellen transplantiert (CD34+). Vier Mäusen wurden neugeboren bovine c-kit-positiv Zellen transplantiert (c-kit+). Zur durchflusszytometrischen Analyse wurden anti-bovine CD45-Antikörper sowie anti-murine CD45-Antikörper verwendet. Die Gewinnung der Gewebe erfolgte zum Zeitpunkt des Versuchsendes. In Blut und Milzgewebe wurden bei der c-kit+-Gruppe bis zu 33,9 % (Blut) und 58,4 % (Milz) boCD45-positiv Zellen festgestellt. Im Knochenmark wurden deutlich weniger boCD45-positiv Zellen nachgewiesen. Darstellung als Streudiagramm mit Mittelwert. n = 1 (CD34+); n = 4 (c-kit+).

Am Versuchsende wurden bei fast allen Mäusen im Blut und im Knochenmark ähnliche Werte boviner CD45-positiver Zellen gemessen. Im Knochenmark des Tieres mit dem höchsten Anteil boviner Leukozyten im Blut wurden mit 10,2 % allerdings in etwa dreimal weniger CD45-positiv Zellen nachgewiesen als im Blut (33,9 %). Im Milzgewebe wurde bei fast allen Mäusen teilweise ein mehr als doppelt so hoher Gehalt boCD45-positiver Zellen wie im Blut festgestellt (zwischen 1,6 % und 58,4 %). Vergangene Untersuchungen humanisierter Mäuse zeigten diesbezüglich sogar einen möglichen Zusammenhang zwischen dem zunehmenden Gehalt humaner CD45-positiver Zellen in der Milz sowie auftretenden klinischen Auffälligkeiten (WATANABE et al. 2007). Dies konnte für die Tiere der Versuchsgruppe A nicht bestätigt werden. Keine der Mäuse zeigte im Versuchszeitraum Abweichungen von den physiologischen Normalbefunden. Allerdings erreichten die Einzelgehälter in den eigenen Untersuchungen mit maximal

58,4 % in keinem Fall die von WATANABE et al. (2007) geschilderten (80-90 % mononukleärer Zellen der Milz positiv für humanes CD45).

4.3.2 Versuchsgruppe B - T-Zell-Depletion

In der Versuchsgruppe B wurden insgesamt neunzehn Mäusen die Stammzell-enthaltenden Zellfraktionen aus der T-Zell-Depletion transplantiert. Siebzehn Tieren wurde diese im neugeborenen und zwei Tieren im adulten Alter injiziert. Sieben der siebzehn Tiere, welche neugeboren transplantiert wurden, erhielten Zellen, welche aus bovinem peripherem Blut isoliert wurden (neugeb. pB). Den anderen zehn neugeboren behandelten Mäusen wurden Zellen aus bovinem Nabelschnurblut transplantiert (neugeb. NSB). Auch die zwei adult transplantierten Mäuse der Versuchsgruppe B erhielten aus bovinem Nabelschnurblut gewonnene Zellfraktionen (adult NSB).

Zwischen den beiden Versuchsgruppen A und B bestand somit ein deutlicher Unterschied in Bezug auf die Gruppengröße (siehe Abbildung 5 auf Seite 54). Dieser beruhte hauptsächlich auf der erheblich voneinander abweichenden Verfügbarkeit der notwendigen Antikörper (siehe Kapitel 4.2.1).

4.3.2.1 Scoring

Das Körpergewicht fast aller Mäuse der Versuchsgruppe B nahm im gesamten Versuchszeitraum stetig zu. Dies galt vor allem für die neugeborenen transplantierten Mäuse (neugeb. NSB und neugeb. pB). Bei diesen siebzehn Mäusen wurden nur vereinzelte Schwankungen des Körpergewichts festgestellt (siehe Abbildung 14 auf Seite 66). Das Abbruchkriterium (20 % Gewichtsverlust zum vorher erreichten Maximalwert) wurde bei keiner dieser Mäuse erreicht.

Im Gegensatz zu den neugeborenen transplantierten Mäusen zeigte eine Maus aus der Gruppe der adult transplantierten Tiere (adult NSB) ab der Transplantation boviner Zellen in der 10. Lebenswoche einen deutlichen Gewichtsverlust. Dies verdeutlicht die Abbildung 15 auf Seite 66. Bereits etwa eine Woche nach erfolgter Transplantation betrug der Gewichtsverlust dieser Maus über 20 %, weshalb der Versuch für dieses Tier vorzeitig beendet wurde. Neben dem Gewichtsverlust wurden bei dieser Maus klinisch weitere Auffälligkeiten festgestellt. Bis auf den Zustand der Haut wichen alle Parameter des klinischen Scores von den Normalwerten ab. Insbesondere fielen bei dieser Maus eine stark buckelige Körperhaltung und eine eingeschränkte Mobilität auf (Gesamt-Score zum Zeitpunkt des vorzeitigen Versuchsendes: 6,0; vgl. Abbildung 16 auf Seite 67).

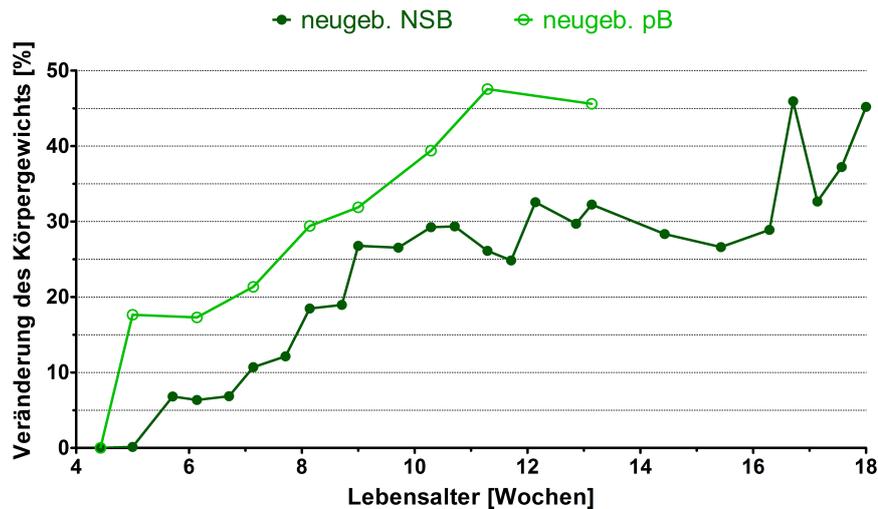


Abb. 14: Prozentuale Veränderung des Körpergewichts der Mäuse der Versuchsgruppe B, denen neugeborene bovine Zellen transplantiert wurden. Den Mäusen wurde neugeborene die mittels negativer Selektion von T-Lymphozyten befreite Stammzell-enhaltende Zellfraktion aus bovinem Nabelschnurblut (neugeb. NSB) oder bovinem peripherem Blut (neugeb. pB) transplantiert. Dargestellt ist die prozentuale Veränderung des Körpergewichts während des Versuchszeitraumes beginnend frühestens ab der vierten Lebenswoche. Zwei der zehn Mäuse aus der Untergruppe neugeb. NSB mussten aufgrund des Erreichens von Abbruchkriterien bereits in der vierten Lebenswoche vorzeitig getötet werden (siehe Abbildung 16). Diese Daten wurden nicht dargestellt. Das Körpergewicht aller dargestellten Mäuse beider Untergruppen der Versuchsgruppe B schwankte zwischen einzelnen Messungen, nahm im Versuchszeitraum aber tendenziell stetig zu. Mittelwert \pm SEM; $n = 8$ (neugeb. NSB); $n = 7$ (neugeb. pB).

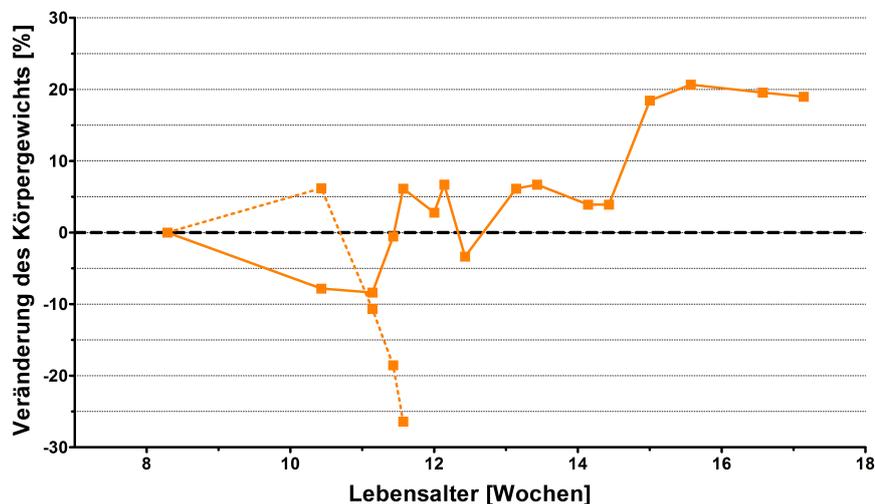


Abb. 15: Prozentuale Veränderung des Körpergewichts der Mäuse der Versuchsgruppe B, denen adult Zellen aus bovinem Nabelschnurblut transplantiert wurden. Dargestellt ist die prozentuale Veränderung des Körpergewichts während des Versuchszeitraumes beginnend frühestens ab der achten Lebenswoche. Die Transplantation der mittels T-Zell-Depletion aus bovinem Nabelschnurblut gewonnenen Stammzell-enhaltenden Zellfraktionen erfolgte in der 10. Lebenswoche. Bei einer der Mäuse wurde etwa eine Woche nach der Transplantation ein Gewichtsverlust von über 20 % festgestellt ($\cdots\blacksquare\cdots$). Deshalb wurde diese Maus in der 12. Lebenswoche vorzeitig getötet. $n = 2$ (adult NSB).

Trotz der konstanten Gewichtsentwicklung (siehe Abbildung 14 auf Seite 66) traten auch bei den Mäusen der Untergruppe neugeb. NSB klinische Auffälligkeiten auf. Hierbei wurden bei drei Mäusen Abbruchkriterien (vgl. Kapitel 3.6.5 und Tabelle 6 auf Seite 33) erreicht, weshalb der Versuch für diese Tiere der Untergruppe der Versuchsgruppe B vorzeitig beendet wurde. Die folgende Abbildung 16 zeigt die Entwicklung des klinischen Scores aller Mäuse der Versuchsgruppe B.

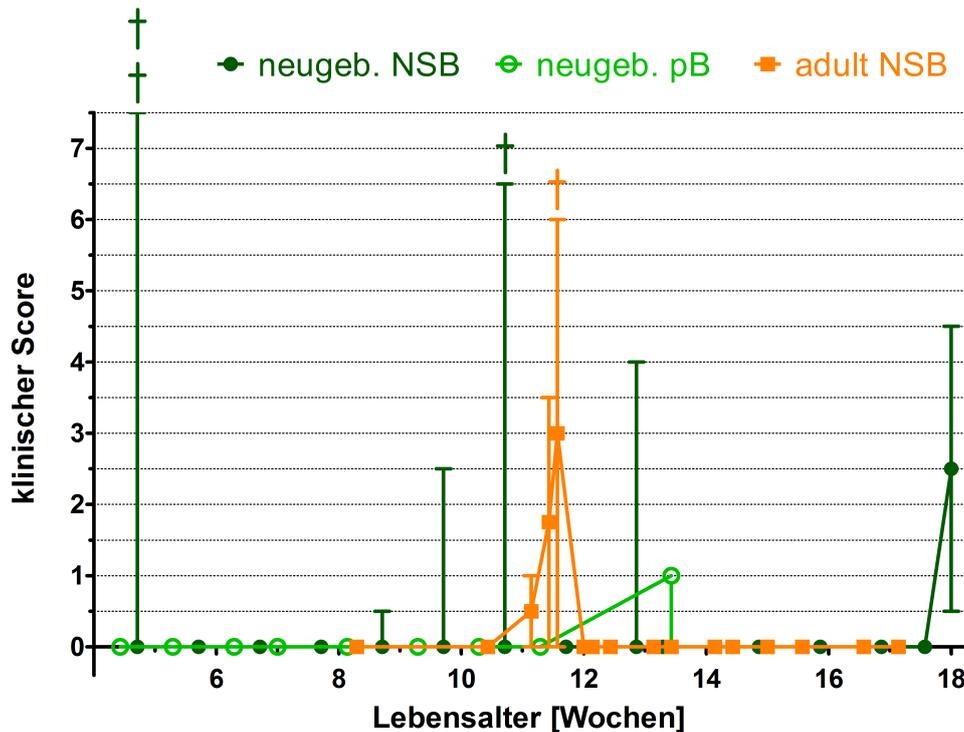


Abb. 16: Entwicklung des klinischen Scores der Mäuse der Versuchsgruppe B im Versuchszeitraum. Den Mäusen wurden neugeboren oder adult die mittels negativer Selektion von T-Lymphozyten befreiten Stammzell-enhaltenden Zellfraktionen aus bovinem Nabelschnurblut (neugeb. NSB; adult NSB) oder bovinem peripherem Blut (neugeb. pB) transplantiert. Es wurde eine tägliche Sichtkontrolle der Mäuse sowie mindestens dreimal wöchentlich ein intensives Scoring des klinischen Zustandes durchgeführt. Als Abbruchkriterien wurden das Erreichen eines Gesamtscores von 7,5 oder jeweils das Erreichen des höchsten Scores (2,0) in den Einzelparametern Mobilität, Atmung und Haut festgelegt. Bereits frühzeitig im Versuch (4. Lebenswoche) wurden bei zwei neugeborenen transplantierten Mäusen (neugeb. NSB) Abbruchkriterien festgestellt. Dies führte zur schmerzfreien Tötung der Tiere (†). In der 11. Lebenswoche wurde bei einer weiteren Maus dieser Untergruppe ein Abbruchkriterium erreicht. Eine adult transplantierte Maus wurde in der 12. Lebenswoche aufgrund eines starken Gewichtsverlustes getötet. Die Mäuse der Untergruppe neugeb. pB wurden überwiegend als klinisch unauffällig eingeschätzt. Median \pm Minimum/ Maximum. n = 7-10 (neugeb. NSB); n = 7 (neugeb. pB); n = 1-2 (adult NSB).

In der Untergruppe neugeb. NSB wurden im Einzelnen folgende Abbruchkriterien erreicht: einmal Bestimmung eines Gesamtscorewertes von 7,5 in der 4. Lebenswoche, einmal Erreichen des Maximalscorewertes 2,0 für den Parameter Mobilität in der 4. Lebenswoche (Daten nicht gezeigt) sowie einmal Erreichen des Maximalscorewertes 2,0

für den Parameter Haut in der 11. Lebenswoche (Daten nicht gezeigt).

Bei den Mäusen der Untergruppe neugeb. pB wurden während des gesamten Versuches keine klinischen Auffälligkeiten festgestellt.

Zusammenfassend musste in der Versuchsgruppe B somit bei vier Mäusen ein vorzeitiger Versuchsabbruch vorgenommen werden (einmal adult NSB, dreimal neugeb. NSB). Im Vergleich dazu war dies bei keiner der Mäuse aus der Versuchsgruppe A der Fall, denen ebenfalls Zellen aus bovinem Nabelschnurblut transplantiert wurden (siehe Kapitel 4.3.1.1).

4.3.2.2 Blutbild

Mit Hilfe der maschinell angefertigten Blutbilder (Analysegerät: scil Vet abc) konnten weitere Aussagen über den Gesundheitszustand der Mäuse getroffen werden. Bedeutende Parameter stellten auch für die Versuchsgruppe B vor allem die Gesamtleukozytenzahl sowie die Gesamtzahlen und prozentualen Anteile von Lymphozyten, Granulozyten und Monozyten dar.

Folgende Abbildung 17 zeigt die Entwicklung der Gesamtleukozytenzahl im peripheren Blut der Mäuse der einzelnen Untergruppen der Versuchsgruppe B.

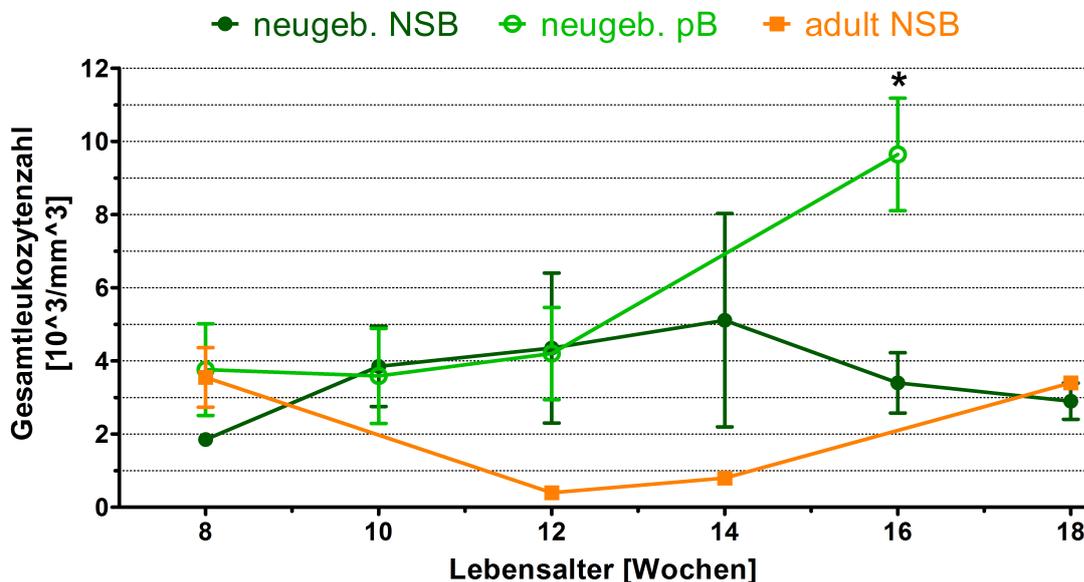


Abb. 17: Entwicklung der Gesamtleukozytenzahl im Blut der Mäuse der Versuchsgruppe B.

Den Mäusen wurden neugeboren oder adult die mittels negativer Selektion von T-Lymphozyten befreiten Stammzell-enthaltenden Zellfraktionen aus bovinem Nabelschnurblut (neugeb. NSB; adult NSB) oder bovinem peripherem Blut (neugeb. pB) transplantiert. Die Blutentnahme erfolgte in zweiwöchigem Abstand. Die Gesamtleukozytenzahl wurde mittels Analysegerät (scil Vet abc) bestimmt. Mittelwert \pm SEM; Auswertung mittels Mann-Whitney-Test, * $p \leq 0,05$; neugeb. NSB gegen neugeb. pB; adult NSB nicht statistisch auswertbar. $n = 8-10$ (neugeb. NSB); $n = 7$ (neugeb. pB); $n = 1-2$ (adult NSB).

Bei allen Mäusen der Versuchsgruppe B wurden zu Beginn der Messungen annähernd gleiche Gesamtleukozytenwerte festgestellt (siehe Abbildung 17 auf Seite 68). Ähnliche Werte zeigten sich auch für die Versuchsgruppe A (siehe Kapitel 4.3.1.2). Im Blut der neugeborenen transplantierten Mäuse wurde bis zur 12. Lebenswoche auch weiterhin eine nahezu gleichlautende Zahl von Gesamtleukozyten nachgewiesen. Erst in der 16. Lebenswoche wurden im Blut der Mäuse der Untergruppe neugeb. pB signifikant höhere Gesamtleukozytenwerte festgestellt als im Blut der Untergruppe neugeb. NSB.

Bei den adult transplantierten Mäusen (adult NSB) der Versuchsgruppe B fiel insbesondere die Reduktion der Zahl der Gesamtleukozyten direkt nach der Transplantation der bovinen Zellen in der 10. Woche auf. Für eine der zwei adult transplantierten Mäuse musste der Versuch aufgrund der zusätzlich aufgetretenen klinischen Auffälligkeiten zu diesem Zeitpunkt vorzeitig beendet werden (siehe Abbildungen 15 und 16).

Zur genaueren Differenzierung wurden neben der Gesamtleukozytenzahl auch die Gesamtwerte an Lymphozyten, Granulozyten und Monozyten im peripheren Blut der Mäuse bestimmt. Auch diese wurden maschinell analysiert (scil Vet abc).

Gleichlautend zur Versuchsgruppe A, konnte auch für die Tiere der Versuchsgruppe B festgestellt werden, dass vor allem die Entwicklung der Gesamtlmphozytenwerte über den Versuchszeitraum fast ausnahmslos mit dem Verlauf der Gesamtleukozytenwerte übereinstimmte (siehe Anhang: Abbildung 30 auf Seite 121). Auch bezüglich der Zahl der Gesamtlmphozyten wurden die Maximalwerte vornehmlich am Versuchsende erreicht. Dies wurde in ähnlicher Ausprägung auch für die Entwicklung der Gesamtwerte an Monozyten (siehe Anhang: Abbildung 31 auf Seite 122) und Granulozyten (siehe Anhang: Abbildung 32 auf Seite 123) festgestellt.

Prozentual ergaben sich hinsichtlich der Anteile der Zellpopulationen von Lymphozyten, Granulozyten und Monozyten in der Versuchsgruppe B ähnliche Tendenzen (siehe Abbildung 18 auf Seite 70).

Der prozentuale Anteil der Lymphozyten im peripheren Blut betrug für die meisten Mäuse der Versuchsgruppe B zwischen 40,0 und 55,0 %. Vor allem für die Untergruppe neugeb. NSB wurden im Versuchszeitraum unterschiedlich hohe Schwankungen der Werte festgestellt. Im Vergleich zur Versuchsgruppe A wurden bei den Tieren der Versuchsgruppe B im peripheren Blut prozentual etwas mehr Granulozyten nachgewiesen. Der Großteil der Werte lag im Bereich zwischen 35,0 und 45,0 % (zum Vergleich: circa 20 – 40 % für die Versuchsgruppe A; siehe Abbildung 8). Hierbei traten im Versuchszeitraum ebenfalls große Schwankungen in den für die Untergruppe neugeb. NSB festgestellten Werten auf. Mit einem Anteil von circa 10 – 17 % wurden in der Versuchsgruppe B geringfügig mehr Monozyten nachgewiesen als in der Versuchsgruppe A (hier circa 6 – 17 %).

Der für die Versuchsgruppe A erkennbare Trend zur Orientierung am lymphozytären Blutbild adulter Rinder konnte für die Untergruppen der Versuchsgruppe B insofern nicht bestätigt werden.

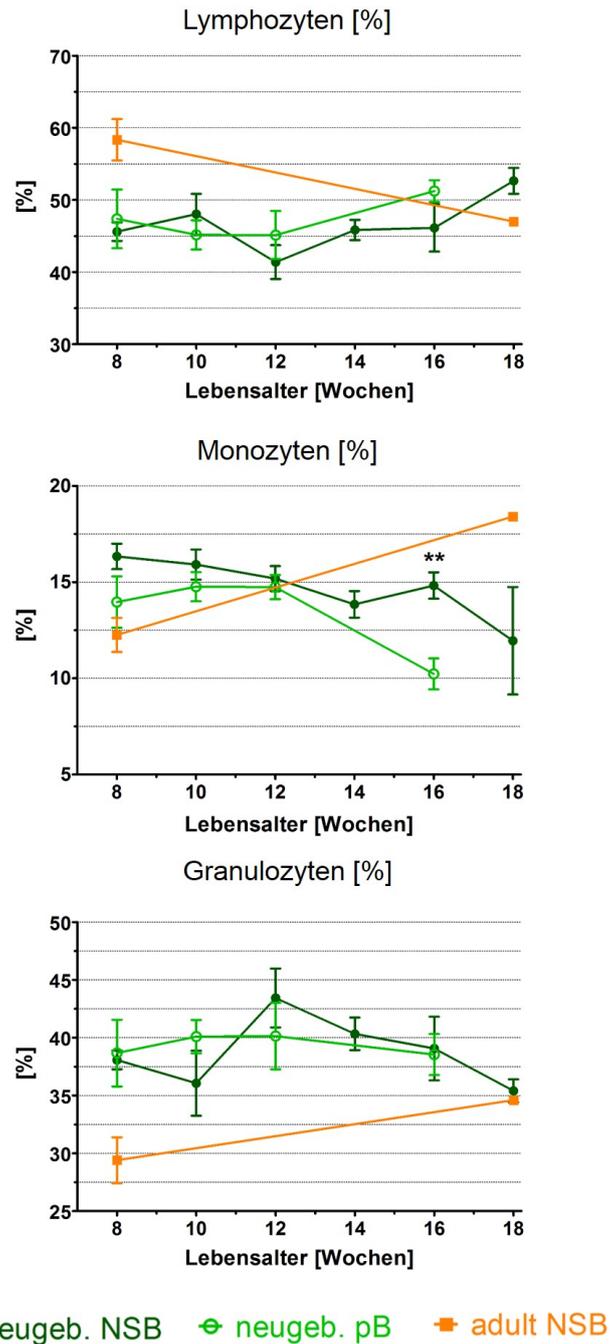


Abb. 18: Entwicklung der prozentualen Anteile an Lymphozyten, Monozyten und Granulozyten im peripheren Blut der Mäuse der Versuchsgruppe B. Den Mäusen wurden neugeboren oder adult die mittels negativer Selektion von T-Lymphozyten befreiten Stammzell-enhaltenden Zellfraktionen aus bovinem Nabelschnurblut (neugeb. NSB; adult NSB) oder bovinem peripherem Blut (neugeb. pB) transplantiert. Die Blutentnahme erfolgte in zweiwöchigem Abstand. Die prozentualen Anteile an Lymphozyten (oben), Monozyten (Mitte) und Granulozyten (unten) wurden mittels Analysegerät (scil Vet abc) bestimmt. Unterschiede zwischen den Versuchsgruppen sind mit ** gekennzeichnet. Mittelwert \pm SEM; Auswertung mittels t-Test für unabhängige Stichproben, ** $p \leq 0,01$; neugeb. NSB gegen neugeb. pB; adult NSB nicht statistisch auswertbar. $n = 8-10$ (neugeb. NSB); $n = 7$ (neugeb. pB); $n = 1-2$ (adult NSB).

Hinsichtlich der erythrozytären Blutwerte wurden während des Versuchszeitraumes im Vergleich der jeweiligen Einzelwerte der Mäuse der Versuchsgruppe B keine in Zusammenhang stehenden Auffälligkeiten festgestellt (siehe Anhang: Tabelle 14 (neugeb.NSB), Tabelle 15 (neugeb.pB) und Tabelle 16 (adult NSB)).

4.3.2.3 Durchflusszytometrische Analysen

Mit dem Ziel einer noch differenzierteren Analyse des Engraftments der transplantierten bovinen Zellen (hier der Stammzell-enthaltenden Fraktion aus der T-Zell-Depletion) wurde das periphere Blut der Mäuse regelmäßig mittels Durchflusszytometrie untersucht. Hierbei kam erneut das Oberflächenmolekül CD45 als globaler Leukozytenmarker zum Einsatz. Mit Hilfe spezifischer boviner und muriner Antikörper für diesen Marker wurde jeweils der Anteil an Zellen bestimmt, die diesen Marker exprimierten. Neben dem peripheren Blut wurden auf dieselbe Art und Weise das kardiale Blut, das Milz- sowie das Knochenmarksgewebe aller Mäuse post mortem untersucht. Während des Versuchszeitraumes wurden für die Analysen des murinen peripheren Blutes weitere Antikörper verwendet (siehe Tabelle 10 auf Seite 41). Damit konnten auch die Anteile an bovinen B- und T-Lymphozyten, an bovinen natürlichen Killerzellen sowie an zytotoxischen und T-Helfer-Zellen bestimmt werden.

Im Blut beider Gruppen neugeborenen transplantierte Mäuse wurden im Durchschnitt höhere Werte boviner CD45-positiver Zellen nachgewiesen als im Blut der adult transplantierten Mäuse. Dies verdeutlicht die Abbildung 19 auf Seite 72.

Bereits während der ersten Messungen des Anteils boviner CD45-positiver Zellen an der Gesamtleukozytenzahl im peripheren Blut der Mäuse wurden bei den neugeborenen transplantierten Tieren (neugeb. NSB und neugeb. pB) im Durchschnitt Werte zwischen 10,0 % und 20,0 % festgestellt. Hierbei wurden für die Gruppe neugeb. NSB im Durchschnitt höhere Werte gemessen, die Unterschiede zwischen beiden neugeborenen transplantierten Gruppen waren jedoch nicht signifikant. Im peripheren Blut der adult transplantierten Mäuse wurde durchschnittlich ein geringerer Anteil boviner CD45-positiver Zellen gemessen (nicht statistisch auswertbar).

Bis zur zwölften Lebenswoche entwickelte sich der Anteil boviner CD45-positiver Zellen im peripheren Blut aller Mäuse der Versuchsgruppe B nahezu gleichlautend. Die Werte stiegen mit unterschiedlich großen Schwankungen im Durchschnitt leicht an. Ab der 12. Lebenswoche bis zum Versuchsende wurden insbesondere für die Mäuse der beiden Untergruppen neugeb. NSB und adult NSB tendenziell sinkende Werte bestimmt. Im Durchschnitt wurden bei beiden Untergruppen am Versuchsende sogar niedrigere Anteile boviner CD45-positiver Zellen nachgewiesen als zum Versuchsbeginn. Bei den Tieren der Untergruppe neugeb. pB hingegen wurde während des gesamten Versuchszeitraumes eine tendenzielle Zunahme des durchschnittlichen Anteils boviner CD45-positiver Zellen an der Gesamtleukozytenzahl festgestellt. Durchschnittlich war der Anteil bei dieser Untergruppe zum Zeitpunkt des Versuchsendes (hier 16. Lebenswoche) dreimal so hoch wie am Versuchsbeginn (erste Messung in der 8. Lebenswoche).

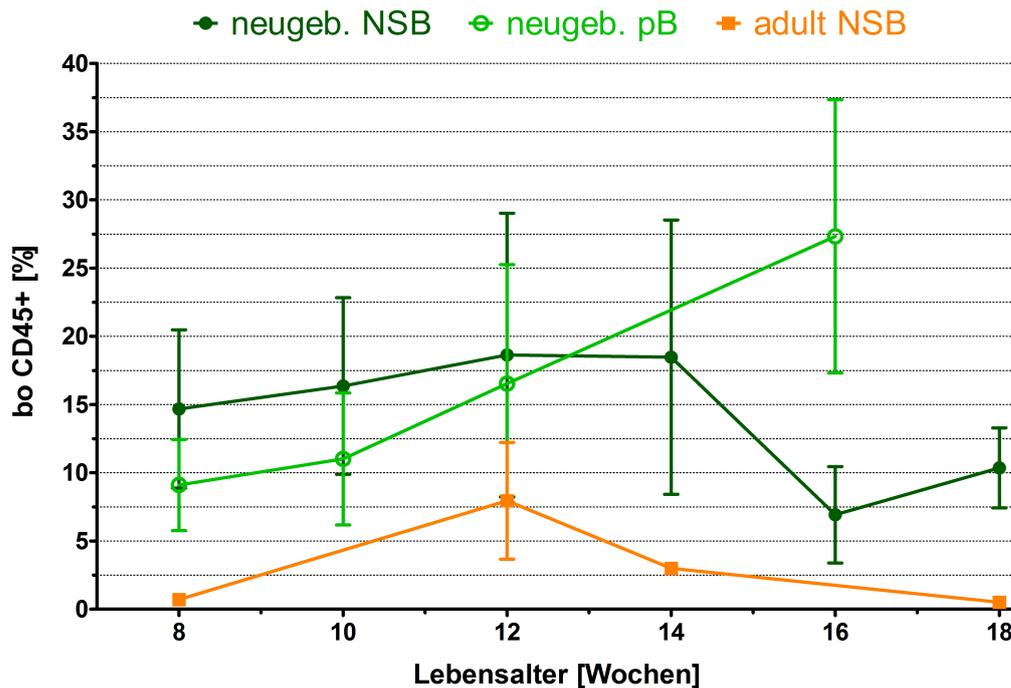


Abb. 19: Entwicklung des Prozentsatzes boviner CD45-positiver Zellen im Blut der Mäuse der Versuchsgruppe B. Durchflusszytometrische Analyse murinen peripheren Blutes unter Verwendung anti-boviner CD45-Antikörper sowie anti-muriner CD45-Antikörper. Den Mäusen wurden neugeboren oder adult die mittels negativer Selektion von T-Lymphozyten befreiten Stammzellenthaltenden Zellfraktionen aus bovinem Nabelschnurblut (neugeb. NSB; adult NSB) oder bovinem peripherem Blut (neugeb. pB) transplantiert. Die Blutentnahme erfolgte in zweiwöchigem Abstand. Die Werte aller neugeborenen transplantierten Mäuse (neugeb. NSB und neugeb. pB) wiesen während des gesamten Versuches keine signifikanten Unterschiede auf. Mittelwert \pm SEM; Auswertung mittels Mann-Whitney-Test; neugeb. NSB gegen neugeb. pB; adult NSB nicht statistisch auswertbar. $n = 8-10$ (neugeb. NSB); $n = 7$ (neugeb. pB); $n = 1-2$ (adult NSB).

Bezogen auf die jeweiligen Einzeltiere der Untergruppen ähnelten sich vor allem die Ergebnisse der neugeborenen transplantierten Mäuse (neugeb. NSB und neugeb. pB). Bei sieben von zehn Mäusen der Untergruppe neugeb. NSB konnten 1,3 % bis 9,8 % bovine CD45-positive Zellen nachgewiesen werden. Bei drei der zehn Mäuse wurden hingegen sehr viel höhere Werte gemessen (20,4 %; 25,6 % bis 44,4 %; 40,7 bis 76,3 %; Daten nicht gezeigt). Bei den Tieren der Untergruppe neugeb. pB konnten bei vier von sieben Mäusen zwischen 0,2 % und 9,7 % bovine CD45-positive Zellen im peripheren Blut nachgewiesen werden. Drei Mäuse erreichten Maximalwerte von jeweils 51,3 %, 57,9 % und 63,8 % (Daten nicht gezeigt).

Exemplarisch zeigt die folgende Abbildung 20 die Entwicklung des Prozentsatzes boviner CD45-positiver Zellen im peripheren Blut einer neugeborenen transplantierten Maus (neugeb. NSB) anhand der durchflusszytometrischen Messungen von der 8. bis zur 12. Lebenswoche.

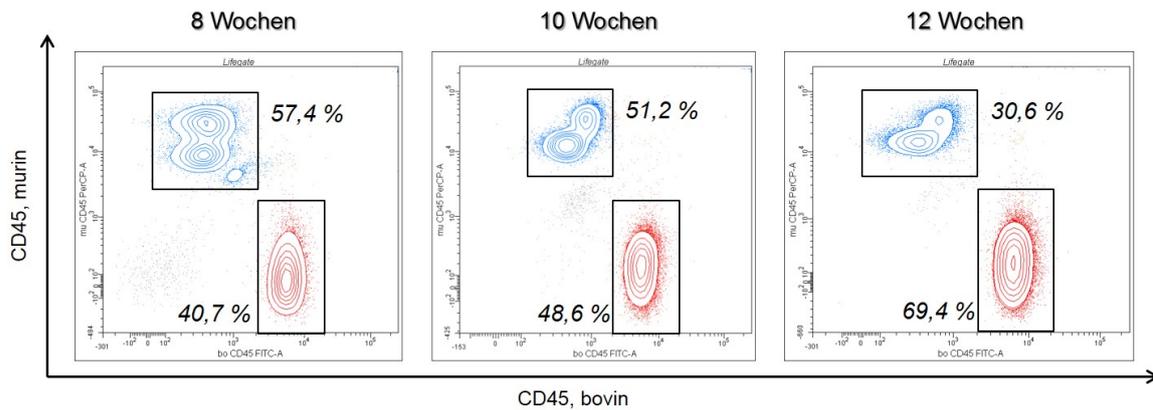


Abb. 20: Darstellung der Entwicklung des Prozentsatzes boviner und muriner CD45-positiver Zellen im Blut einer Maus der Versuchsgruppe B anhand durchflusszytometrischer Messungen. Durchflusszytometrische Analyse murinen peripheren Blutes unter Verwendung anti-boviner CD45-Antikörper sowie anti-muriner CD45-Antikörper in der 8., 10. und 12. Lebenswoche. Dargestellte Werte einer NSG Maus, welcher neugeboren eine mittels T-Zell-Depletion gewonnene Stammzell-enhaltende Zellfraktion aus bovinem Nabelschnurblut injiziert wurde. Bovine Zellen (CD45, bovin) in rot dargestellt, murine Zellen (CD45, murin) in blau. Der Anteil boviner CD45-positiver Zellen war bereits während der ersten Messung in der 8. Lebenswoche sehr hoch (40,7 %) und stieg im Laufe der Folgewochen weiter stark an, auf 69,4 % in der 12. Lebenswoche. n = 1 (neugeb. NSB).

Die weiterführende durchflusszytometrische Analyse ausgewählter boviner Zellpopulationen im murinen Blut der dafür vorgesehenen Mäuse der Versuchsgruppe B (≥ 2 % bovine CD45-positive Zellen im peripheren Blut) ergab für die betreffenden Untergruppen im Durchschnitt sehr ähnliche Ergebnisse. Die differenziertere Analyse wurde für die Gruppen durchgeführt, welche neugeboren transplantiert wurden (neugeb. NSB und neugeb. pB).

Im Blut beider Untergruppen stellten die bovinen T-Lymphozyten mit durchschnittlich 90,0 % bis 97,0 % die größte Zellpopulation dar (siehe Abbildung 21 auf Seite 74). Die Unterschiede zwischen den neugeboren transplantierten Tieren (neugeb. NSB und neugeb. pB) waren nicht signifikant. Auch die Anteile an bovinen B-Lymphozyten und bovinen Natürlichen Killerzellen im Blut beider Untergruppen unterschieden sich nicht signifikant voneinander. Bei den Mäusen der Untergruppe neugeb. NSB wurden durchschnittlich 1,35 % (18. LW) bis 11,45 % (14. LW) bovine B-Lymphozyten, bei denen aus der Gruppe neugeb. pB 1,67 % (12. LW) bis 2,21 % (10. LW) nachgewiesen. Die durchschnittlichen Anteile boviner natürlicher Killerzellen lagen deutlich darunter (neugeb. NSB: 0,1 % bis 1,63 %; neugeb. pB: 0,29 % bis 0,89 %). Die Höhe der Anteile der jeweiligen Zellpopulationen schwankte im Versuchszeitraum bei beiden Untergruppen nur geringfügig. Lediglich in der 14. Lebenswoche wurde bei einer der Untergruppen (neugeb. NSB) ein kurzzeitiger Anstieg des Anteils boviner B-Lymphozyten auf 11,45 % festgestellt.

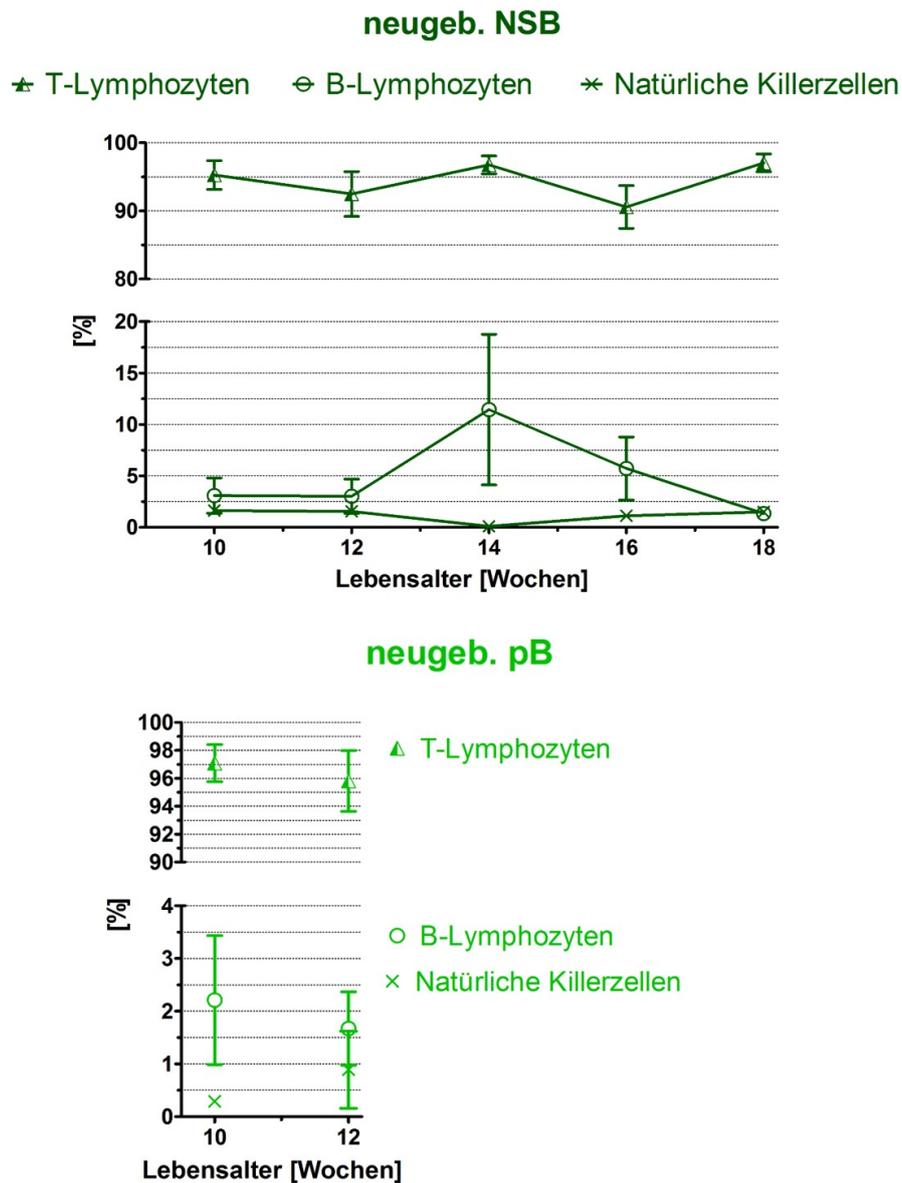


Abb. 21: Entwicklung der prozentualen Anteile einzelner boviner Zellpopulationen im Blut der neugeborenen transplantierten Mäuse der Versuchsgruppe B. Durchflusszytometrische Analyse murinen peripheren Blutes unter Verwendung anti-boviner CD3- und CD335-Antikörper. Den Mäusen wurden neugeborenen die mittels negativer Selektion von T-Lymphozyten befreiten Stammzell-enhaltenden Zellfraktionen aus bovinem Nabelschnurblut (neugeb. NSB) oder bovinem peripherem Blut (neugeb. pB) transplantiert. Die Blutentnahme erfolgte in zweiwöchigem Abstand. Dargestellt werden die Anteile an bovinen T-Lymphozyten (cyCD3+), B-Lymphozyten (mittels Gatingstrategie, siehe Kapitel 3.8.1) und Natürlichen Killerzellen (boCD335+) an der Gesamtzahl der bovinen CD45-positiven Zellen. Für beide Untergruppen wurden im Blut ähnliche Anteile an T-Lymphozyten, B-Lymphozyten und Natürlichen Killerzellen nachgewiesen. Der Anteil an T-Lymphozyten lag mit über 90,0 % aller bovinen CD45-positiven Zellen am höchsten. Der Anteil an Natürlichen Killerzellen lag am niedrigsten. Die Unterschiede zwischen beiden Gruppen waren zu keinem Zeitpunkt signifikant. Mittelwert \pm SEM; Auswertung mittels Mann-Whitney-Test, neugeb. NSB gegen neugeb. pB. n = 2-6 (neugeb. NSB); n = 7 (neugeb. pB).

Im Blut der beiden neugeborenen transplantierten Untergruppen der Versuchsgruppe B wurden auch die Subpopulationen der bovinen CD3-positiven T-Lymphozyten analysiert. Dies verdeutlicht die Abbildung 22 auf Seite 76.

Der Anteil an bovinen T-Helfer-Zellen (CD3+CD4+) war im Durchschnitt für beide Untergruppen ähnlich hoch und unterschied sich für die jeweiligen Messzeitpunkte nicht signifikant voneinander. Der durchschnittliche Anteil boviner T-Helfer-Zellen schwankte bei den Tieren der Untergruppe neugeb. NSB allerdings sehr viel stärker. Dies war vor allem durch eine starke Reduktion der prozentualen Anteile der T-Helfer-Zellen in der 14. und in der 18. Lebenswoche gekennzeichnet.

Der Anteil boviner zytotoxischer T-Zellen (CD3+CD8+) im Blut lag bei den Mäusen der Untergruppe neugeb. NSB im Durchschnitt höher als bei den Mäusen der Untergruppe neugeb. pB. In der 10. Lebenswoche war dieser Unterschied signifikant. Auch für die Werte der zytotoxischen T-Lymphozyten fiel in der Untergruppe neugeb. NSB die deutliche Reduktion der Werte in der 14. sowie in der 18. Lebenswoche auf.

Im Vergleich dazu wurden für die Versuchsgruppe A während des gesamten Versuchszeitraumes deutlich höhere Anteile zytotoxischer T-Zellen bestimmt (zwischen 24,7 % und 30,5 %; n = 1; nicht statistisch auswertbar; siehe Abbildung 12 auf Seite 63). Ähnlich hohe Anteile wurden für die Versuchsgruppe B im Durchschnitt nur in der 16. Lebenswoche der Tiere der Untergruppe neugeb. NSB erreicht (25,3 %).

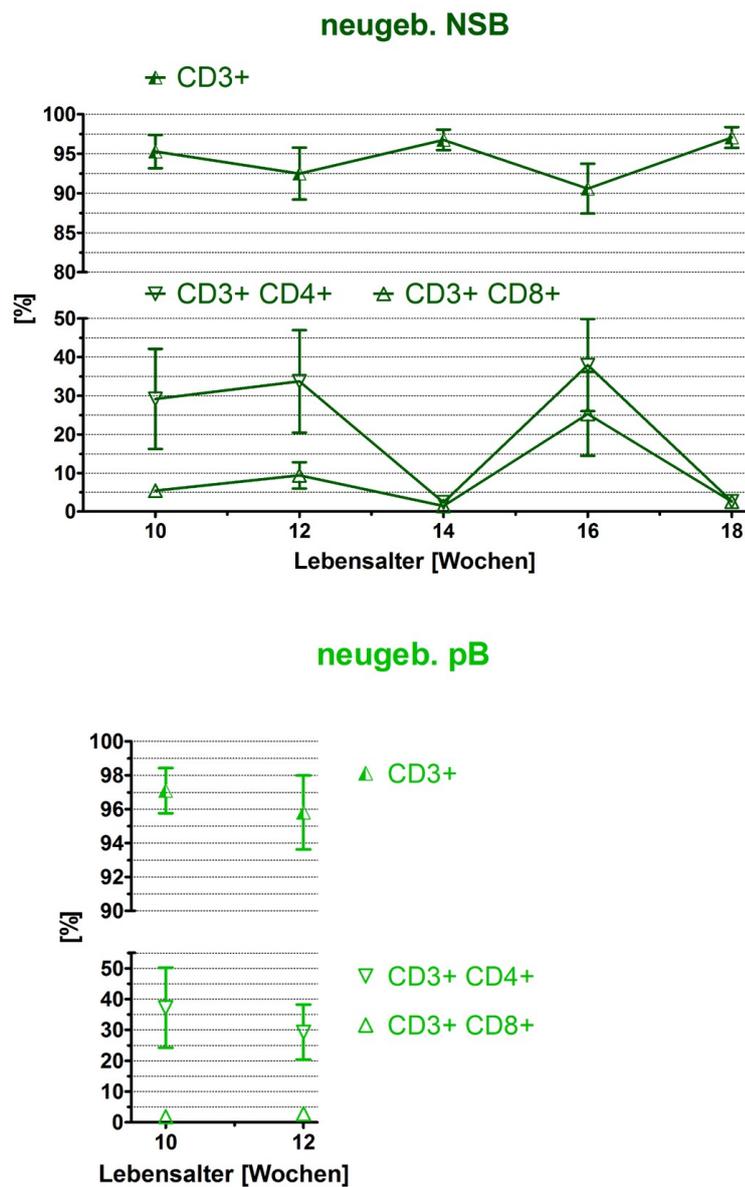


Abb. 22: Differenzierung der Population boviner CD3-positiver T-Lymphozyten im Blut der neugeboren transplantierten Mäuse der Versuchsgruppe B. Durchflusszytometrische Analyse murinen peripheren Blutes unter Verwendung anti-boviner CD3-, CD4- und CD8-Antikörper. Den Mäusen wurden neugeboren die mittels negativer Selektion von T-Lymphozyten befreiten Stammzell-enhaltenden Zellfraktionen aus bovinem Nabelschnurblut (neugeb. NSB) oder bovinem peripheren Blut (neugeb. pB) transplantiert. Die Blutentnahme erfolgte in zweiwöchigem Abstand. Dargestellt werden die Anteile an bovinen T-Lymphozyten (cyCD3+) gesamt (jeweils obere Kurve) sowie an zytotoxischen T-Lymphozyten (CD3+CD8+) und T-Helfer-Zellen (CD3+CD4+) (jeweils untere zwei Kurven) an der Gesamtzahl der bovinen CD3-positiven Zellen. In beiden Untergruppen der Versuchsgruppe B wurden im Blut ähnliche Anteile an T-Helfer-Zellen und an zytotoxischen T-Lymphozyten nachgewiesen. Erstere Population überwog hierbei deutlich. Im Blut der Mäuse der Untergruppe neugeb. pB war der Anteil an zytotoxischen T-Lymphozyten geringer. In der 10. Lebenswoche war dieser Unterschied signifikant. Mittelwert \pm SEM; Auswertung mittels Mann-Whitney-Test beziehungsweise t-Test für unabhängige Stichproben, * $p \leq 0,05$, neugeb. NSB gegen neugeb. pB. $n = 2-6$ (neugeb. NSB); $n = 7$ (neugeb. pB).

Im Rahmen der finalen Präparation wurden das Blut sowie die Zellsuspensionen aus Milz und Knochenmark durchflusszytometrisch analysiert. Dies ermöglichte weiterführende Aussagen über Engraftment, Auswanderung und Reifung der bovinen Zellen im Organismus Maus. Die Ergebnisse der Mäuse der unterschiedlichen Untergruppen der Versuchsgruppe B sind in der folgenden Abbildung 23 dargestellt.

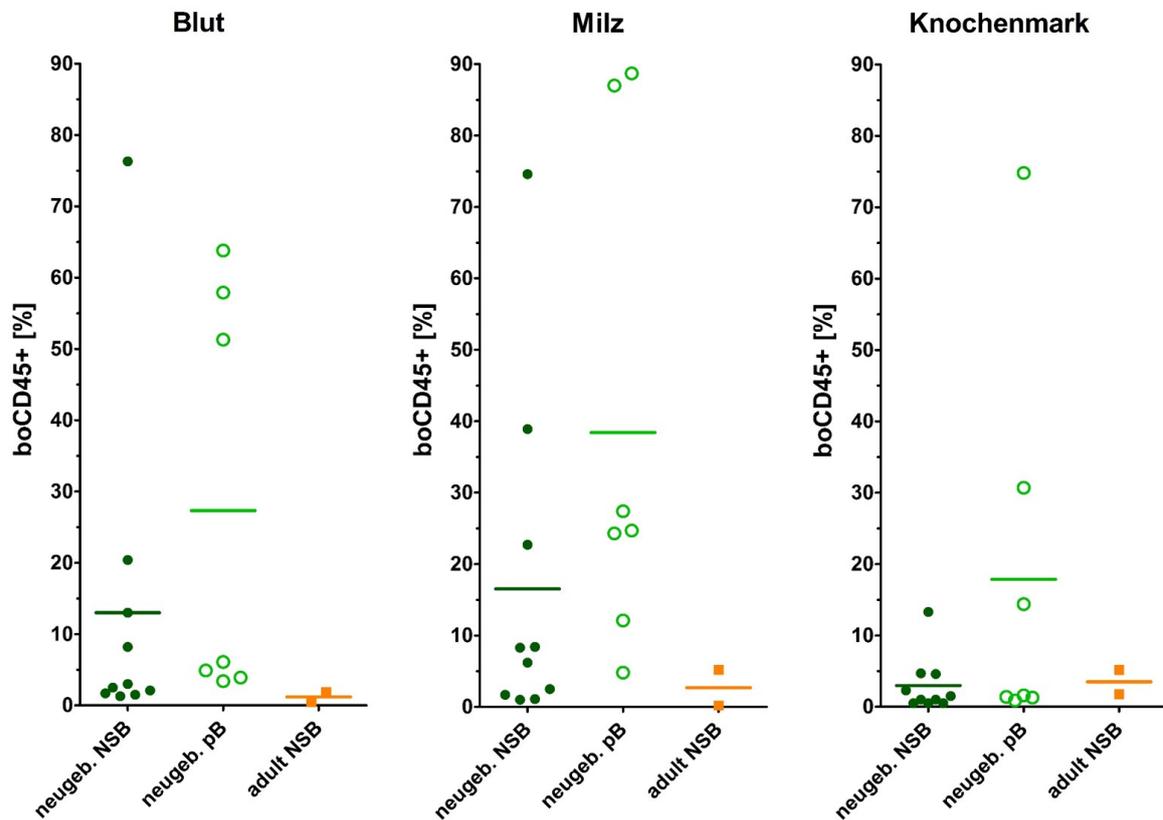


Abb. 23: Prozentualer Anteil boviner CD45-positiver Zellen in Blut, Milz und Knochenmark der Mäuse der Versuchsgruppe B bei Versuchsende. Durchflusszytometrisch analysiert wurden murines kardiales Blut sowie Zellsuspensionen aus murinem Milz- und Knochenmarksgewebe (Gewinnung siehe Kapitel 3.6.7). Den Mäusen wurden neugeboren oder adult die mittels negativer Selektion von T-Lymphozyten befreiten Stammzell-enthaltenden Zellfraktionen aus bovinem Nabelschnurblut (neugeb. NSB; adult NSB) oder bovinem peripherem Blut (neugeb. pB) transplantiert. Zur durchflusszytometrischen Analyse wurden anti-bovine CD45-Antikörper sowie anti-murine CD45-Antikörper verwendet. Die Gewinnung der Gewebe erfolgte zum Zeitpunkt des Versuchsendes. Darstellung als Boxplot mit Median, Minimum und Maximum. Auswertung mittels Mann-Whitney-Test; neugeb. NSB gegen neugeb. pB; adult NSB nicht statistisch auswertbar. n = 10 (neugeb. NSB); n = 7 (neugeb. pB); n = 2 (adult NSB).

Die für die Versuchsgruppe A festgestellte Tendenz, dass in der Milz vereinzelt doppelt so viele bovine CD45-positive Zellen auftraten wie im peripheren Blut, konnte auch für die Versuchsgruppe B und hier vornehmlich für die neugeborenen transplantierten Tiere bestätigt werden. Bei acht von neunzehn Mäusen der Versuchsgruppe B wurden in der Milz mehr als doppelt so viele bovine CD45-positive Zellen nachgewiesen wie im Blut (davon vier von sieben der Untergruppe neugeb. pB). Im Milzgewebe wurden teilweise Maximalwerte boviner CD45-positiver Zellen von 88,7 % und 87,0 % gemessen. Die

höchsten Werte wurden fast ausnahmslos bei den Tieren festgestellt, bei denen im Versuchszeitraum die höchsten Werte boviner CD45-positiver Zellen im peripheren Blut nachgewiesen werden konnten.

Bezüglich der Analysen des Knochenmarks wurden hingegen bei der Mehrheit der Tiere grundsätzlich sehr viel geringere Werte boviner CD45-positiver Zellen nachgewiesen als in Blut und Milzgewebe. Lediglich bei zwei Mäusen war dies nicht der Fall. Eine dieser Ausnahmen gehörte zu den Tieren mit dem höchsten Anteil boviner CD45-positiver Zellen im Blut und zugleich zur Gruppe derer, denen neugeborene Zellen aus dem bovinen peripheren Blut transplantiert wurden. Zum Versuchsende wurden bei diesem Tier im Blut 63,8 %, in der Milz 24,7 % und im Knochenmark 74,8 % bovine CD45-positive Zellen nachgewiesen.

Bei der Mehrzahl der Mäuse mit hohen Anteilen boviner CD45-positiver Zellen im Blut standen den ebenfalls hohen Werten in der Milz grundsätzlich vergleichbar niedrige Anteile boviner CD45-positiver Zellen im Knochenmark entgegen (Daten nicht gezeigt).

4.3.3 Zusammenfassung des Transplantationsverlaufes

Sowohl bei Mäusen der Versuchsgruppe A als auch bei Mäusen der Versuchsgruppe B konnten mittels durchflusszytometrischer Messungen im Laufe des Versuches im Blut bovine CD45-positive Zellen nachgewiesen werden. Das Ziel, immundefiziente Mäuse erfolgreich mit bovinen Vorläuferzellen zu transplantieren und sogenannte „bovinisierte Mäuse“ zu entwickeln, wurde im Rahmen der vorliegenden Arbeit erreicht.

Die im peripheren Blut der Einzeltiere festgestellten Anteile boviner CD45-positiver Zellen an der Gesamtleukozytenzahl wichen allerdings teilweise deutlich voneinander ab (siehe Abbildung 24 auf Seite 79).

In der Versuchsgruppe A wurden bei einer Maus auffallend hohe Werte (maximal 60,5 % boCD45+) erreicht. In der Versuchsgruppe B hoben sich die Werte von fünf Mäusen deutlich von denen der übrigen Tiere ab (maximal 76,5 % boCD45+). Hierbei handelte es sich ausschließlich um Mäuse, denen im neugeborenen Alter bovine Zellen transplantiert worden waren. Bezüglich der Höhe der erreichten Mittelwerte boviner CD45-positiver Zellen gab es zwischen den Mäusen, die Zellen aus bovinem peripherem Blut erhalten hatten (neugeb. pB) und denen, die neugeborene Zellen aus bovinem NSB erhalten hatten (neugeb. NSB), keinen signifikanten Unterschied. In diesen beiden Untergruppen der Versuchsgruppe B wurden im Mittel höhere Anteile boviner CD45-positiver Zellen im peripheren Blut nachgewiesen als bei den Mäusen der Versuchsgruppe A. Im Blut der adult transplantierten Mäuse der Versuchsgruppe B hingegen wurden nur geringe Mengen boviner CD45-positiver Zellen festgestellt. Allerdings müssen sowohl bei dieser Untergruppe als auch bei der Versuchsgruppe A die geringen Gruppengrößen berücksichtigt werden.

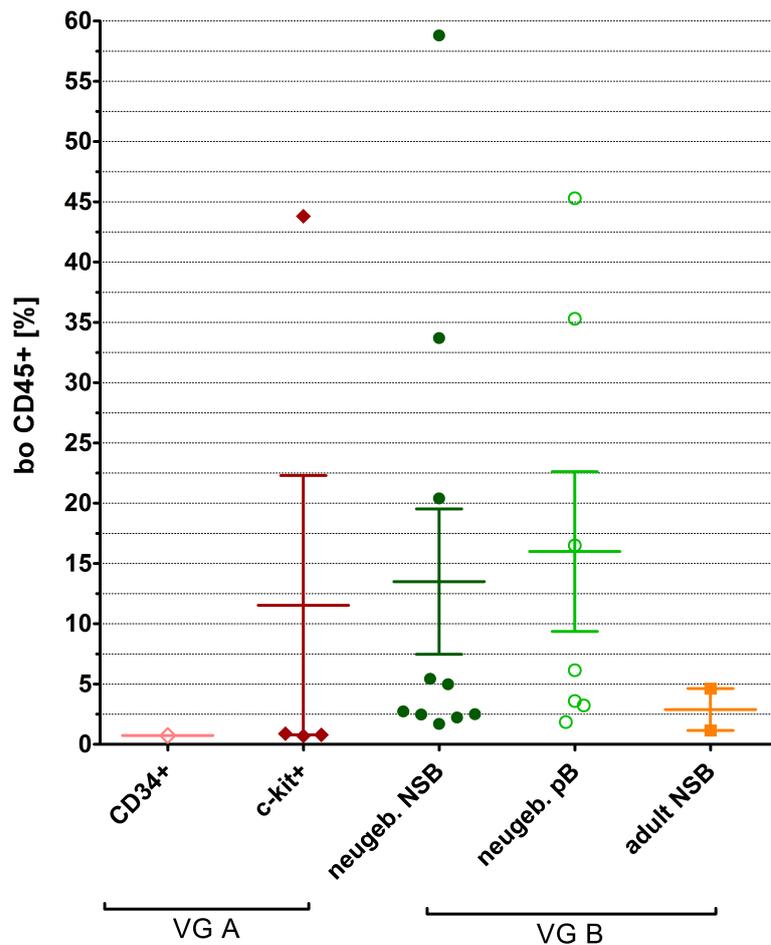


Abb. 24: Übersicht der Mittelwerte des prozentualen Anteils boviner CD45-positiver Zellen (bo CD45+) im Blut der Mäuse beider Versuchsgruppen während des Versuchszeitraumes. In der Versuchsgruppe A (VG A) wurden immundefizienten NSG Mäusen selektierte bovine CD34-positive (CD34+) oder c-kit-positive (c-kit+) Zellen transplantiert. Den Mäusen der Versuchsgruppe B (VG B) wurde eine mittels negativer Separation von T-Lymphozyten befreite Stammzell-enthaltende Fraktion transplantiert. Dies wurde sowohl mit bovinem Nabelschnurblut (NSB) als auch mit bovinem peripherem Blut (pB) durchgeführt und den NSG Mäusen neugeboren (neugeb. NSB und neugeb. pB) und adult (adult NSB) transplantiert. Das in zweiwöchigem Abstand gewonnene murine periphere Blut wurde unter Verwendung boviner und muriner anti-CD45-Antikörper durchflusszytometrisch analysiert. Dargestellt sind die Mittelwerte des Prozentsatzes boviner CD45-positiver Zellen aller Einzelmessungen (n = 1 bis 7) der Einzeltiere. Zwischen den Untergruppen wurden keine signifikanten Unterschiede festgestellt. Mittelwert \pm SEM. Auswertung mittels Kruskal-Wallis-Test, c-kit+ gegen neugeb. NSB und neugeb. pB. VG A, CD34+: n = 1; VG A, c-kit+: n = 4; VG B, neugeb. NSB: n = 10; neugeb. pB: n = 7; adult NSB: n = 2.

Trotz der hinsichtlich des Parameters boviner CD45-positiver Zellen auftretenden Gemeinsamkeiten zwischen einzelnen Untergruppen der Versuchsgruppen A und B unterschied sich die klinische Entwicklung teilweise beträchtlich voneinander. Zusammenfassend verdeutlicht dies die Kaplan-Meier-Überlebenskurve auf Seite 80.

Lediglich die Mäuse der Versuchsgruppe A und die Mäuse der Untergruppe neugeb. pB der Versuchsgruppe B zeigten eine Überlebensrate von 100 %. Aus beiden Untergrup-

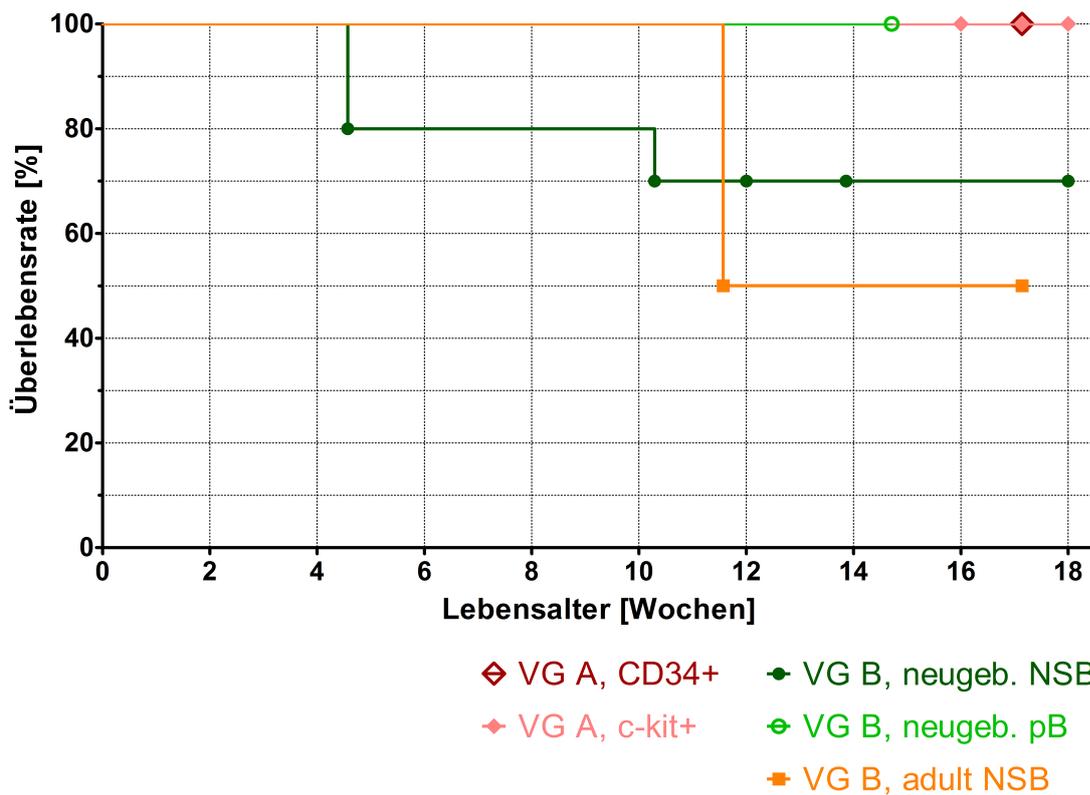


Abb. 25: Kaplan-Meier Überlebenskurve der Versuchsgruppen. Zusammenfassende Darstellung der Rate an bis zum Versuchsende überlebenden Mäusen der einzelnen Untergruppen der Versuche. Mononukleäre Zellen aus bovinem Nabelschnurblut und aus bovinem peripherem Blut wurden unterschiedlich aufgearbeitet und immundefizienten NSG Mäusen transplantiert. Mittels positiver Separation wurden aus den mononukleären Zellen der Nabelschnurblutproben bovine CD34-positive (CD34+) und bovine c-kit-positive (c-kit+) Zellen isoliert, welche wiederum NSG Mäusen transplantiert wurden (Versuchsgruppe A, VG A). Mittels negativer Separation, hier als T-Zell-Depletion durchgeführt, wurden aus beiden Arten boviner mononukleärer Zellen die T-Lymphozyten selektiert und somit die Stammzell-enhaltenden Fraktionen (SeF) gewonnen. In der Versuchsgruppe B (VG B) wurden diese Zellen ebenfalls NSG Mäusen transplantiert, jedoch, im Unterschied zur Versuchsgruppe A, neugeboren (neugeb. NSB; neugeb. pB) und adult (adult NSB). VG A, CD34+: n = 1; VG A, c-kit+: n = 4; VG B, neugeb. NSB: n = 10; neugeb. pB: n = 7; adult NSB: n = 2.

pen der Versuchsgruppe B, welche Zellen aus bovinem NSB erhielten (neugeb. NSB und adult NSB), mussten einige Mäuse vorzeitig aus dem Versuch ausgeschlossen werden (siehe Kapitel 4.3.2.1).

Dennoch konnten im peripheren Blut einzelner Mäuse aller Versuchsgruppen teilweise sehr hohe Gehalte boviner CD45-positiver Zellen über einen längeren Zeitraum hinweg nachgewiesen werden. Bezugnehmend auf alle analysierten Parameter gelang dies in der Versuchsgruppe A für die Untergruppe der mit c-kit-positiven Zellen transplantierten Mäuse und in der Versuchsgruppe B für die Mäuse der Untergruppe neugeb. pB am besten.

Diskussion

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit sollte das erfolgreich angewendete Prinzip des Humanisierens von Mäusen für die Spezies Rind übernommen und somit ein bovines Mausmodell generiert werden. Damit soll zukünftig die Entwicklung von Krankheitsmodellen ausgewählter boviner Infektionserreger und deren Erforschung im Organismus Maus ermöglicht werden.

Zunächst wurde hierfür in der vorliegenden Arbeit die Gewinnung boviner Vorläuferzellen aus bovinem Nabelschnurblut und aus bovinem peripherem Blut etabliert, wofür zwei gegensätzliche Methoden angewendet wurden. Zum einen wurde eine positive Zellseparation mit Hilfe spezifischer boviner Antikörper (anti-boCD34; anti-bo-c-kit) durchgeführt. Hierdurch wurden die Zielzellen, bovine Vorläuferzellen, unmittelbar gewonnen. Zum anderen wurden die nicht gewünschten Zellpopulationen, hier bovine T-Lymphozyten, selektiert und somit mittels negativer Zellseparation eine Zellfraktion isoliert, welche bovine Vorläuferzellen enthielt. Das bovine Nabelschnurblut stellte sich in den vorliegenden Untersuchungen als das geeignetere Material zur Generierung boviner Vorläuferzellen heraus, da daraus signifikant mehr bovine mononukleäre Zellen gewonnen werden konnten, aus denen anschließend die eigentlichen Vorläuferzellen isoliert wurden.

Die durch positive und negative Zellseparation gewonnenen Zellfraktionen wurden daraufhin immundefizienten NSG Mäusen injiziert. Neugeborene NSG Mäuse erhielten Zellen beider Separationsmethoden, adulte Mäuse wurden nur mit den mittels negativer Zellseparation gewonnenen Vorläuferzellen enthaltenden Zellfraktionen behandelt. Das Anwachsen der transplantierten bovinen Vorläuferzellen sowie deren Reifung und Auswanderung im Organismus Maus wurden mit Hilfe verschiedener Methoden, unter anderem mittels durchflusszytometrischer Analysen, nachvollzogen.

Das Ziel der vorliegenden Arbeit, die Entwicklung eines bovinen Mausmodells, wurde in unterschiedlicher Ausprägung für alle Versuchs- und Untergruppen erreicht. Die höchsten Anteile boviner Leukozyten wurden in den Geweben der Mäuse dreier Untergruppen festgestellt (Versuchsgruppe A – c-kit; Versuchsgruppe B – neugeb. NSB; Versuchsgruppe B – neugeb. pB). Im Gewebe der Mäuse der anderen beiden Untergruppen (Versuchsgruppe A – CD34+; Versuchsgruppe B – adult NSB) wurden hingegen nur sehr geringe Mengen boviner Leukozyten nachgewiesen.

Die klinische Entwicklung verlief für die Mäuse der Versuchsgruppe A, der Zellen aus der positiven Separation injiziert wurden sowie für die Mäuse der Versuchsgruppe B, denen neugeborene Zellen aus bovinem peripherem Blut injiziert wurden, am besten. Keines der Tiere dieser Gruppen musste aufgrund des Erreichens klinischer Abbruchkriterien vorzeitig getötet werden.

Zusammenfassend wurden bei Betrachtung aller Kriterien für die Tiere der zuletzt genannten Untergruppe der Versuchsgruppe B (neugeb. pB) somit die besten Ergebnisse erzielt.

5.1 Gewinnung boviner mononukleärer Zellen

Zur Isolierung boviner Vorläuferzellen mussten zunächst bovine mononukleäre Zellen (MC) gewonnen werden. In der vorliegenden Arbeit wurden diese aus Nabelschnurblut (bCBMC) und aus peripherem Blut (bPBMC) von Rindern gewonnen. Hierbei stand deutlich mehr peripheres Blut zur Verfügung. Dies war maßgeblich auf die schwierigen Grundvoraussetzungen bei der Gewinnung bovines Nabelschnurblutes zurückzuführen. Die bovine Nabelschnur ist sehr kurz und reißt daher bei der natürlichen Geburt sehr leicht (siehe Kapitel 2.5 und 3.4.1).

Bovines peripheres Blut war dagegen sehr viel besser verfügbar. Jedoch wurde dies zu jeweils unterschiedlichen Zwecken von adulten Rindern zum einen und von Kälbern zum anderen gewonnen. Die gewonnenen Volumina waren deshalb vor allem in Abhängigkeit von der jeweiligen Entnahmetechnik zu betrachten. Zudem lag der Fokus bei der Entnahme peripheren Blutes adulter Rinder nicht auf einer möglichst hohen Ausbeute an bPBMC, da dieses Material für die vorliegende Arbeit überwiegend zu Testzwecken für beispielsweise bovine Antikörper genutzt wurde (siehe Kapitel 3.8.2).

Im Falle des peripheren Blutes von Kälbern war die Zielstellung eine andere. Für die weitere Verwendung und Isolierung von hämatopoetischen Vorläuferzellen wurde, wie für das bovine Nabelschnurblut, eine hohe Ausbeute an bPBMC/ bCBMC angestrebt.

Die gewonnenen Probenvolumina des Nabelschnurblutes entsprachen denen, welche in vergleichbaren Untersuchungen erreicht wurden. Bei der Entnahme bovines fetalen Nabelschnurblutes in einer Schlachtstätte konnte GRANDEL (2005) Volumina von 2 – 25 ml gewinnen. Die in vorliegender Arbeit methodengleich erreichten Zahlen sind nahezu deckungsgleich (siehe Kapitel 4.1).

Während eines Kaiserschnittes wurden von RAOUFI et al. (2011) im Durchschnitt 48,5 ml (minimale 22 ml bis maximale 75 ml) Nabelschnurblut entnommen. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit konnte hingegen pro Probeentnahme nur in etwa halb so viel Nabelschnurblut gewonnen werden. Dies war allerdings auf die diffizile und schwer

zu reproduzierende Entnahme während eines Kaiserschnittes zurückführen. Insbesondere bei der vorliegenden Arbeit lag der Schwerpunkt der durchgeführten Sectiones caesareae nicht bei der Gewinnung möglichst großer Probenvolumina, sondern bei der Lebenserhaltung des jeweiligen Kalbes. Eine Erhöhung der Stichprobengröße könnte jedoch zu einer Optimierung der Entnahmetechnik und damit zu einer Angleichung an die von RAOUFI et al. (2011) erreichten Ergebnisse beitragen.

Zur anschließenden Isolierung der bovinen PBMC/ CBMC wurden die Proben mittels Dichtegradientenzentrifugation (DGZ) aufgearbeitet. Etablierte Protokolle für bovine und humane Medien wurden zu Grunde gelegt, führten allerdings unter Verwendung des vorliegenden bovinen Probenmaterials zu keinem Erfolg. Daraufhin wurden diverse Veränderungen der Einzelparameter der Methoden vorgenommen. Wie im Kapitel 4.1.1 ausführlich beschrieben, gestaltete sich insbesondere die ungenügende Trennung der einzelnen Kompartimente als schwierig. Dies sowie eine augenscheinlich starke Verunreinigung mit Erythrozyten erschwerte die beabsichtigte separate Gewinnung der bovinen PBMC/ CBMC. Die hierdurch bedingten Auswirkungen auf diese Zellfraktion sowie auf die anschließend zu separierenden hämatopoetischen Vorläuferzellen wurden im Rahmen der vorliegenden Arbeit nicht untersucht. Für die Isolation hämatopoetischer Vorläuferzellen aus humanem Nabelschnurblut konnten in der Vergangenheit ähnliche erythrozytäre Verunreinigungen festgestellt und in einen negativen Zusammenhang mit der Ausbeute an Vorläuferzellen gebracht werden (ALMICI et al. 1995).

Einen großen Einfluss auf das Gelingen der Dichtegradientenzentrifugation hatte erwartungsgemäß das verwendete Dichtemedium. Im Rahmen der Etablierungsarbeiten kamen verschiedene Dichtemedien zum Einsatz (siehe Kapitel 4.1.1). Die Ergebnisse gestalteten sich heterogen und ließen die Schlussfolgerung zu, dass bovines Blut grundlegend andere Dichteverhältnisse als z.B. humanes Blut aufweist. Das Dichtemedium, welches für die DGZ humanen peripheren Blutes sowie humanen Nabelschnurblutes etabliert war, erwies sich bei den verwendeten bovinen Blutproben (Nabelschnurblut und peripheres Blut) zunächst als ungeeignet. Dies stand im Widerspruch zu den Angaben aus der Literatur. GRANDEL (2005) und RAOUFI et al. (2011) verwendeten zur DGZ bovinen Nabelschnurblutes ein Medium mit einer Dichte, welche Aufarbeitungsprotokollen für humanes Material zu entnehmen ist (1,077 g/ml). FRITSCH et al. (1991) verwendeten ein Medium derselben Dichte für die Aufarbeitung bovinen Knochenmarks. Und auch bei der Gewinnung mononukleärer Zellen aus bovinem peripherem Blut kamen Medien mit einer Dichte von 1,077 g/ml bereits erfolgreich zum Einsatz (SENOGLES et al. 1979; DAVIS et al. 1987; HUSSEN 2012). Dies konnte in den eigenen Untersuchungen nicht reproduziert werden. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde ein selbst hergestelltes Dichtemedium mit einer Dichte von 1,083 g/ml eingesetzt, da mit diesem zunächst die besten Ergebnisse erzielt werden konnten. Entgegen Angaben aus der Literatur (URBAN-CHMIEL et al. 2011) führte ein kommerzielles Dichtemedium derselben Dichte in der vorliegenden Arbeit nicht zum gewünschten Erfolg. Erst unter Verwendung von SepMate™-Tubes konnten in den eigenen Untersuchungen auch mit einem üblichen Dichtemedium mit einer Dichte von 1,077 g/ml zufriedenstellende Ergebnisse erreicht und bovine mononukleäre Zellen mit minimalen erythrozytären Verunreinigungen gewonnen werden (Kapitel 4.1.1). Die Ursache für dieses widersprüchliche Verhalten blieb unklar. Die unterschiedlichen Reaktionen hu-

manen und bovinen Nabelschnurblutes sind möglicherweise mit der unterschiedlichen zellulären Zusammensetzung des Blutes beider Spezies zu begründen. Rinder weisen ein lymphozytäres Blutbild auf, wohingegen im menschlichen Blut die Granulozyten überwiegen und ein sogenanntes granulozytäres Blutbild vorliegt (ENGELHARDT und BREVES 2005).

Mit dieser Tatsache ist möglicherweise auch zu erklären, dass bovines peripheres Blut in den eigenen Untersuchungen anders reagierte als bovines Nabelschnurblut, obwohl anfangs dasselbe Dichtemedium eingesetzt wurde. Auf zellulärer Ebene finden im Laufe der Gestation große Veränderungen statt, wie beispielsweise eine Verdopplung der Leukozytenzahl im letzten Drittel der Trächtigkeit (RÜSSE und SINOWATZ 1998). Solche Änderungen der zellulären Zusammensetzung könnten die Dichteverhältnisse maßgeblich beeinflussen und zu den widersprüchlichen Ergebnissen bei Verwendung verschiedener Dichtemedien führen. Zusätzlich dazu könnten weitere Unterschiede der Einzelproben, wie beispielsweise das Alter und die Art und Weise der Gewinnung, eine Rolle spielen und einen Einfluss auf den Erfolg der DGZ haben (URBAN-CHMIEL et al. 2011). Hierin kann auch eine weitere Ursache dafür gesehen werden, dass bovines Material in den eigenen Untersuchungen mit unterschiedlichen Dichtemedien anders reagierte als in der Literatur beschrieben.

Die bei zahlreichen Proben auftretende Verunreinigung mit Erythrozyten ist möglicherweise durch im Nabelschnurblut teilweise noch vorkommende Retikulozyten zu begründen. Im Gegensatz zu den reifen Erythrozyten weisen diese eine ähnliche Dichte wie Leukozyten auf (WEISS et al. 1989). Hier wäre sogar ein eventueller Bezug zum Alter der Feten bei Nabelschnurblutentnahme herzustellen. Die Zahl der Retikulozyten sinke zwar zur Geburt hin drastisch ab, diese konnten aber bis zur ersten Lebenswoche nachgewiesen werden (TENNANT et al. 1974). Mögliche Zusammenhänge wurden im Rahmen der vorliegenden Arbeit nicht untersucht.

Mittels DGZ wurden aus bovinem Nabelschnurblut und bovinem peripherem Blut unterschiedlich hohe Zahlen an bovinen CBMC/ PBMC gewonnen. Hierbei war die Streuung der Einzelergebnisse im Falle des Nabelschnurblutes bedeutend größer als im Falle des peripheren Blutes (siehe Abbildung 1 auf Seite 46). Zu berücksichtigen waren diesbezüglich allerdings die unterschiedlichen Stichprobengrößen, welche zu einer Verzerrung dieser Einschätzung beitragen könnten. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit konnten aus den Nabelschnurblutproben signifikant mehr bMC pro ml gewonnen werden als aus dem peripheren Blut. Dies bestätigten unter anderem die von SUTHERLAND et al. (1994) und GRANDEL (2005) generierten Ergebnisse, wonach in humanem und bovinem Nabelschnurblut mehr Vorläuferzellen nachzuweisen seien als in peripherem Blut. Zudem konnte bereits gezeigt werden, dass sich die Leukozytenzahl vor allem im letzten Graviditätsdrittel zu Lasten der Zahl kernhaltiger Erythrozyten erhöht (RÜSSE und SINOWATZ 1998; GRANDEL 2005).

Von Interesse waren im Rahmen der durchgeführten Arbeiten auch die erzielten Ergebnisse der unterschiedlichen Gewinnungsmethoden des bovinen Nabelschnurblutes. Vor allem im Hinblick auf das zum Teil sehr viel höhere Alter der klinisch und extern gewonnen Proben (bis zu 48 Stunden alt) überraschte die Feststellung, dass aus diesen im Durchschnitt dennoch eine deutlich höhere Anzahl an bovinen CBMC gewonnen werden konnte als aus den frisch gewonnenen Proben vom Schlachthof. CAMPOS et al.

(1995) konnten für die Aufarbeitung humanen Nabelschnurblutes bereits negative Auswirkungen des Probenalters feststellen und kamen zu dem Schluss, dass von der Proben- gewinnung bis zur Weiterbearbeitung ein Zeitraum von 24 Stunden nicht überschritten werden sollte. Dies konnte anhand der eigenen Ergebnisse für bovines Nabelschnur- blut nicht bestätigt werden. Bezugnehmend auf die bereits getätigten Erläuterungen hinsichtlich zellulärer Veränderungen mit zunehmender Nähe zum Geburtszeitpunkt, erschienen die eigenen Ergebnisse schlüssig.

In der vorliegenden Arbeit konnte die Methode der Dichtegradientenzentrifugation so- mit erfolgreich für das verwendete bovine Material etabliert werden. Sowohl aus bovi- nem Nabelschnurblut als auch aus bovinem peripherem Blut konnten jeweils die mono- nukleären Zellen isoliert werden. Das bovine Nabelschnurblut erwies sich in Bezug auf die Ausbeute als signifikant besser geeignet. Die gewonnenen bovinen mononukleären Zellen dienten anschließend der Isolierung boviner Vorläuferzellen, welche daraufhin immundefizienten Mäusen injiziert werden sollten.

5.2 Stammzellisolierung

Für die Transplantation in den Organismus Maus mussten aus den mittels Dichte- gradientenzentrifugation gewonnenen bovinen mononukleären Zellen (bPBMC und bCB- MC) zunächst die bovinen hämatopoetischen Vorläuferzellen isoliert werden. Der Fo- kus der beiden hierfür eingesetzten Methoden lag zum einen in einer möglichst hohen Ausbeute sowie zum anderen in einer möglichst hohen Reinheit der hämatopoetischen Vorläuferzellen. Vor allem für die anschließende Transplantation spielten diese Fakto- ren eine große Rolle.

Die eigenen Ergebnisse zeigten auf, dass die Stammzellausbeute jedoch maßgeblich durch teilweise sehr geringe Probenvolumina sowie daraus folgende geringe Mengen iso- lierter bPBMC/ bCBMC beeinflusst wurde. Aus diesen Zellfraktionen wiederum wur- den die eigentlichen Zielzellen, die hämatopoetischen Vorläuferzellen, gewonnen. Diese wurden infolgedessen in noch geringerer Zahl isoliert. Allerdings ist die Menge an Vor- läuferzellen für eine erfolgreiche Transplantation in vivo von großer Bedeutung. KING et al. (2008) konnten beispielsweise für die Injektion humaner PBMC in NSG Mäuse eine mengenmäßige Abhängigkeit für den Erfolg des Engraftments feststellen. Aller- dings galt dies nur bis zu einem gewissen Grad, was HÖLSCHER et al. (1999) bereits für die Transplantation boviner Lymphozyten des peripheren Blutes in SCID Mäusen zeigen konnten. Eine steigende Zahl transplantierte Zellen führte hier wiederum zu einer Verschlechterung des Allgemeinbefindens der Versuchstiere (HÖLSCHER et al. 1999).

Die aus bovinem Probenmaterial gewonnenen bPBMC/ bCBMC wurden im Rahmen der vorliegenden Arbeit grundsätzlich zunächst eingefroren und mussten somit vor der weiteren Verwendung aufgetaut werden. Direkt nach dem Auftauen wurde die Vitalität der bPBMC/ bCBMC bestimmt. Hierbei wurde für die Zellvitalität der mononukleären Zellen aus dem Nabelschnurblut sowie für die Zellen aus dem peripheren Blut nur ein minimaler Unterschied festgestellt (siehe Kapitel 4.2).

Der Anteil aufgetauter Zellen an der Ursprungszellzahl divergierte zwischen den Einzelproben sehr stark, es wurde aber über alle Proben hinweg eine Reduktion der Zellzahl nach dem Auftauen festgestellt. Im Durchschnitt standen nach dem Auftauprozess nur noch etwas mehr als die Hälfte der ursprünglich gewonnenen bMC zur Verfügung (siehe Kapitel 4.2). Auffällig war die starke Streuung dieser Werte bezogen auf alle Einzelproben. Da die vor dem Einfrierprozess durchgeführten Arbeitsschritte sowie der Einfrierprozess selbst stets nach demselben Protokoll durchgeführt wurden (siehe Kapitel 3.5.1 und 3.5.2), konnte als Grund hierfür lediglich die Qualität und auch das Alter jeder einzelnen Ursprungsprobe herangezogen werden. Eventuelle Zusammenhänge wurden im Rahmen der vorliegenden Arbeit allerdings nicht untersucht.

5.2.1 Positive Separation

Die positive Separation wurde mit Hilfe zweier spezifischer Antikörper durchgeführt, mittels derer aus den zuvor gewonnenen bCBMC die hämatopoetischen Vorläuferzellen isoliert werden sollten. Zum einen wurde ein Antikörper gegen das bovine CD34-Molekül angewendet. Dieses wird unter anderem auf der Oberfläche primitiver hämatopoetischer Vorläuferzellen exprimiert (NIKU et al. 2007). Zum anderen kam ein Antikörper gegen das bovine CD117-Molekül, auch c-kit-Rezeptor genannt, zum Einsatz. Auch dieser Marker kommt insbesondere auf der Oberfläche hämatopoetischer Vorläuferzellen vor (KUBOTA et al. 1994).

Der verwendete bovine anti-CD34-Antikörper stammte von der japanischen Arbeitsgruppe um Dr. Michiharu Sakurai (SAKURAI et al. 2006; MERKWITZ et al. 2011) (vgl. Tabelle 3 auf Seite 27) und lag nur in geringer Menge vor. Da für die durchgeführte magnetische Separationsmethode, abhängig von der vorliegenden Zahl an bCBMC, ein bestimmtes Volumen des Antikörpers eingesetzt werden musste (siehe Kapitel 3.5.2.1), reichte die zur Verfügung stehende Menge des Antikörpers für die Separation aus den bCBMC lediglich einer Nabelschnurblutprobe (siehe Kapitel 4.2.1). Die Aussagekraft dieses Ergebnisses war somit begrenzt. Der erreichte Prozentsatz an isolierten CD34-positiven Zellen an der aufgetauten Gesamtzellzahl lag in den eigenen Untersuchungen bei 0,28 % (siehe Tabelle 11 auf Seite 50). Für bovines Nabelschnurblut lagen hierzu keine vergleichenden Angaben aus der Literatur vor. Für humane Proben wurde in der Vergangenheit jedoch ein Gehalt von circa 1 % CD34-positiver Zellen an der Gesamtheit der kernhaltigen Zellen bestimmt (KINNIBURGH und RUSSELL 1993; REISBACH et al. 1993; FRITSCH et al. 1994; SUTHERLAND et al. 1994; MAYANI und LANSDORP 1998). Im Zusammenhang mit den Erkenntnissen aus der zu Grunde liegenden Publikation (SAKURAI et al. 2006), wonach der zur Verfügung stehende CD34-Antikörper nur an bestimmte Allele des bovinen CD34-Moleküls spezifisch bindet, erschien das vorliegende niedrige Ergebnis von 0,28 % somit plausibel. Auf einen weiteren, laut vorliegender Literatur umfänglicher bindenden, bovinen CD34-Antikörper (NIKU et al. 2007) konnte im Rahmen der vorliegenden Arbeit leider nicht zurückgegriffen werden. Mit einem zukünftig möglicherweise zur Verfügung stehenden kommerziellen bovinen anti-CD34-Antikörper wären die im Rahmen dieser Arbeit generierten Ergebnisse anhand eines ausreichenden Stichprobenumfangs zu überprüfen.

Neben dem bovinen anti-CD34-Antikörper wurde zur positiven Separation auch ein boviner anti-c-kit-Antikörper eingesetzt. Aus den bovinen Nabelschnurblutproben wurden im Rahmen der vorliegenden Arbeit mit 0,63 % in etwa doppelt so viele c-kit-positive Zellen gewonnen wie CD34-positive Zellen (siehe Tabelle 11 auf Seite 50). Aufgrund der sehr niedrigen Stichprobengröße der durchgeführten CD34-Separation ($n = 1$) konnte hieraus allerdings keine Schlussfolgerung bezüglich des allgemeinen Gehaltes der positiv für den jeweiligen Marker reagierenden Zellen getroffen werden.

Laut Angaben aus der Literatur exprimieren in etwa 1,5 % der Zellen des bovinen peripheren Blutes den c-kit-Rezeptor (HIKONO et al. 2001b). Diese Gehalte wurden im Rahmen der vorliegenden Arbeit auch nicht im bovinen Nabelschnurblut erreicht, obwohl der erwartete Gehalt hier sogar höher liegen müsste als im peripheren Blut. Konkrete Untersuchungen zum Gehalt c-kit-positiver Zellen im Nabelschnurblut von Rindern lagen leider nicht vor, weshalb eine vergleichende Einschätzung der eigenen Ergebnisse nicht vorgenommen werden konnte.

Das Vorliegen verlässlicher spezifischer Antikörper ist für die Isolation hämatopoetischer Vorläuferzellen von zentraler Bedeutung. Die Ausbeute an bovinen hämatopoetischen Vorläuferzellen und somit die für eine anschließende Transplantation zur Verfügung stehende Zellzahl könnte bei Verfügbarkeit solcher Antikörper bedeutend verbessert werden.

5.2.2 T-Zell-Depletion

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit kam neben der positiven Separation auch eine indirekte Methode zur Isolierung boviner Vorläuferzellen zur Anwendung. Hierbei wurden über eine sogenannte negative Separation die bovinen T-Lymphozyten selektiert (T-Zell-Depletion) und die verbliebene Zellfraktion, die Stammzell-enthaltende Fraktion SeF, für die Transplantation immundefizienter Mäuse eingesetzt.

Der Anteil an T-Lymphozyten war in den verwendeten Proben erwartungsgemäß hoch (siehe Abbildung 3 auf Seite 52). Mittels einer Kombination mehrerer Antikörper gegen Oberflächenmoleküle auf bovinen T-Lymphozyten sollte der überwiegende Teil dieser Zellen selektiert werden (siehe Kapitel 3.5.2.2). Das bovine Analogon zum humanen CD3-Molekül auf T-Lymphozyten wird bei Rindern von 60 - 80 % der Lymphozyten des peripheren Blutes exprimiert (DAVIS et al. 1993). Angaben aus der Literatur zufolge weisen allerdings auch Rinder im peripheren Blut zahlreiche Subpopulationen von T-Lymphozyten auf (AYOUB und YANG 1996; WILSON et al. 1996). Im Zusammenhang mit den eigenen Ergebnissen muss jedoch berücksichtigt werden, dass überwiegend Proben bovinen Nabelschnurblutes verwendet wurden. Wie bereits an anderer Stelle ausgeführt, lagen keine Publikationen vor, welche die zelluläre Zusammensetzung des bovinen Nabelschnurblutes thematisieren. Vergleiche hierzu konnten somit nicht gezogen werden.

Auffällig waren die großen Unterschiede der prozentualen Anteile an T-Lymphozyten zwischen den untersuchten Einzelproben (siehe Abbildung 3 auf Seite 52). Ein möglicher Zusammenhang zum Alter der Proben oder zum jeweiligen Alter der Feten, von denen die Proben entnommen wurden, konnte anhand der vorliegenden Daten nicht

hergestellt werden.

Der prozentuale Anteil der Stammzell-enthaltenden Zellfraktion konnte für die dementsprechend aufgearbeiteten Einzelproben teilweise als sehr hoch bewertet werden (15,63 % bis 57,33 %; siehe Abbildung 3 auf Seite 52). Dies war allerdings darauf zurückzuführen, dass die für die anschließenden Transplantationen im Fokus stehenden Vorläuferzellen nur einen kleinen Teil dieser Zellfraktion ausmachten. Den größten Anteil bildeten weitere Zellpopulationen, die neben den Zielzellen nicht selektiert wurden, wie unter anderem bovine B-Lymphozyten, Monozyten und nach der DGZ noch vorhandene Rest-Granulozyten. Da der Einfluss der T-Lymphozyten auf fremde Organismen im Rahmen von Transplantationen allerdings einen wesentlich negativeren Effekt zu haben scheint als der anderer Zellpopulationen (GOKER et al. 2001; SHLOMCHIK 2007; HUANG et al. 2018), wurde die verwendete Methode als zweckmäßig eingeschätzt. Darüber hinaus könnten weitere Separationsschritte womöglich zu einer Verschlechterung des Zustandes der Zellen führen.

Direkt nach jeder positiven und negativen Separation wurde die Zellvitalität der jeweils isolierten Zellfraktionen bestimmt. Die Vitalität der Zellen nach positiver Separation war hierbei signifikant geringer als die Vitalität der Zellen, die einer negativen Separation zugeführt wurden (siehe Abbildung 4 auf Seite 53). Ein methodenbedingter Einfluss erscheint hierfür ursächlich am wahrscheinlichsten. Der augenscheinlichste Unterschied zwischen den Methoden bestand darin, dass im Rahmen der positiven Separation die „Zielzellen“ magnetisch markiert wurden. Bei der negativen Separation wurden dagegen die zu separierenden Zellen, hier die T-Lymphozyten, markiert. Die Zellfraktion, welche die Vorläuferzellen enthielt, blieb unmarkiert. Das deutliche Ergebnis in Bezug auf die Zellvitalität kann insofern gegebenenfalls auf einen negativen Einfluss dieser magnetischen Markierung auf die Zellen zurückgeführt werden. Darüber hinaus müssen auch die unterschiedlichen Stichprobengrößen der durchgeführten positiven und negativen Zellseparationen berücksichtigt werden. Bei einzelnen Proben konnte nach der Separation sogar eine Zunahme des Prozentsatzes an vitalen Zellen festgestellt werden. Wie auch im Falle der Auftauraten kann die Ursache hierfür in Ungenauigkeiten der Zellzählung liegen, da diese manuell durchgeführt wurde (siehe Kapitel 3.5.1). CAMPOS et al. (1995) wiesen für die Zellen humanen Nabelschnurblutes unter anderem eine signifikante Abnahme der Zellvitalität bei Kühlung vor dem Einfrieren nach. Dieser Einfluss konnte für die vorliegenden Arbeiten ausgeschlossen werden, da die bovinen Blutproben bis zur Dichtegradientenzentrifugation bei Raumtemperatur gelagert wurden.

Aufgrund der guten Verfügbarkeit der benötigten Antikörper wurden im Rahmen der durchgeführten Arbeiten mehr Einzelproben einer T-Zell-Depletion ($n = 9$) unterzogen als einer positiven Separation ($n = 4$) (siehe Kapitel 4.2.2 und 4.2.1). Dies hatte direkte Auswirkungen auf die Anzahl der im Anschluss an die Separationen transplantierten NSG Mäuse.

5.3 Transplantationsverlauf

5.3.1 Versuchsgruppe A – CD34+/ c-kit+

In der Versuchsgruppe A wurden neugeborenen NSG Mäusen die mittels positiver Selektion gewonnenen bovinen Vorläuferzellen transplantiert und der Erfolg der Transplantation im Zeitverlauf anhand verschiedener Parameter beurteilt. Insgesamt stellte diese Versuchsgruppe mit fünf Tieren eine sehr kleine Versuchsgruppe dar (siehe Abbildung 5 auf Seite 54). Für die Vergleiche der Einzelergebnisse beider Untergruppen müssen zudem die deutlich voneinander abweichenden Tierzahlen für die Transplantation CD34-positiver ($n = 1$) und c-kit-positiver Zellen ($n = 4$) berücksichtigt werden. Die Ableitung sicherer Schlussfolgerungen ist aus diesem Grund erschwert bis nicht möglich.

In der Literatur zu humanisierten Mäusen werden maximale Lebensspannen der Tiere von 59 bis 95 Wochen benannt (SHULTZ et al. 2005). Die Lebensspanne der Einzeltiere aus den eigenen Untersuchungen konnte allerdings versuchsbedingt nicht auf das Maximum ausgeweitet werden (siehe TVV 30/15, genehmigt am 19. Mai 2016). Trotz optimaler Überlebensraten der Mäuse der Versuchsgruppe A von 100 % (siehe Kapitel 4.3.1.1 und Abbildung 25 auf Seite 80) können zur maximal möglichen Überlebensspanne der auf diese Weise bovinisierten Mäuse somit keine Aussagen getroffen werden.

Bei einem Großteil der Versuchstiere aus der Versuchsgruppe A wurden im peripheren Blut sehr einheitliche Durchschnittswerte des Prozentsatzes an bovinen CD45-positiven Zellen festgestellt (siehe Kapitel 4.3.1.3). Mit durchschnittlich unter 1 % lagen diese allerdings sehr niedrig. Bei einem Tier aus dieser Versuchsgruppe konnte mit durchschnittlich 43,8 % bovinen CD45-positiven Zellen im peripheren Blut jedoch ein Vielfaches dieser Werte nachgewiesen werden. Aufgrund der Konstanz dieser hohen Werte über einen Zeitraum von 18 Wochen wurde insbesondere bei dieser Maus von einem erfolgreichen Engraftment ausgegangen.

In der Literatur zu humanisierten NSG Mäusen existieren verschiedenste Angaben bezüglich Schwellenwerten des Prozentsatzes an humanen CD45-positiven Zellen im peripheren Blut, ab welchen die Transplantation als erfolgreich gilt. Angegeben werden sowohl 5 % (SKIRECKI et al. 2019) als auch 10 % (MISHARIN et al. 2012) oder 20 % (LEE et al. 2013; RODEWOHL et al. 2017). In der Literatur zu bovinen Mausmodellen hingegen, wird mit 2 % von einem sehr viel niedrigeren Schwellenwert ausgegangen (HAAS et al. 2001). Berücksichtigt werden muss bezüglich der letztgenannten Veröffentlichung allerdings der im Gegensatz zur vorliegenden Arbeit grundlegend abweichende Versuchsaufbau. Unabhängig davon, welcher Schwellenwert herangezogen wird, kann für die Versuchsgruppe A somit eine (c-kit+) der fünf Mäuse als sehr gut bovinisiert angesehen werden.

Zusätzlich zu der Bestimmung der murinen und bovinen Leukozytenzahl dieser Maus wurden ab der 12. bis zur 18. Lebenswoche alle zwei Wochen durchflusszytometrisch die Anteile boviner T-Lymphozyten, B-Lymphozyten und Natürlicher Killerzellen im peripheren Blut quantifiziert. Die Analysen wurden mit Hilfe spezifischer Antikörper durchgeführt (siehe Tabelle 10 auf Seite 41). Für die Bestimmung boviner T-Lymphozyten kam etwa ein intrazellulär bindender anti-CD3-Antikörper zum Einsatz. In den Analy-

sen fiel vor allem die mengenmäßige Dominanz der T-Lymphozyten auf (siehe Abbildung 11 auf Seite 62). Auch im Blut humanisierter Mäuse sind humane T-Lymphozyten in unterschiedlich hoher Anzahl nachzuweisen (HIRAMATSU et al. 2003; ISHIKAWA et al. 2005; SHULTZ et al. 2005; SCHOLBACH et al. 2012; RODEWOHL et al. 2017). Deren Anzahl steigt zwar mit zunehmendem Alter der transplantierten Tiere auf etwa 30 % in der 20. Lebenswoche an (HIRAMATSU et al. 2003), erreicht aber dennoch nicht die vorliegend nachgewiesenen sehr hohen Gehalte an T-Lymphozyten von 97,0 % bis 99,5 % im peripheren Blut. Lediglich für einen gänzlich anderen Versuchsaufbau der Humanisierung, einer Transplantation humaner PBMC, konnten mit über 98 % ähnlich hohe Werte an T-Lymphozyten im peripheren Blut sowie der Milz humanisierter Mäuse aufgezeigt werden (KING et al. 2008). Auch für ein viel verwendetes bovines Mausmodell, die sogenannte SCID-bo-Maus, die mittels Transplantation bovinen fetalen Gewebes entwickelt wurde (siehe Kapitel 2.4.2), wurden annähernd hohe Anteile an T-Lymphozyten (> 80 %) im peripheren Blut der Versuchstiere nachgewiesen (SMITH et al. 1999). In den Untersuchungen von KING et al. (2008) zeigten die mittels Injektion humaner PBMC erfolgreich humanisierten Mäuse in den ersten 30 Tagen keine Anzeichen einer Abstoßungsreaktion, entwickelten in der Folgezeit aber deutliche Anzeichen einer solchen Graft-versus-Host Disease. Der Zeitraum von vier bis fünf Wochen nach der Injektion der humanen PBMC wurde von den Autoren in der Folge als günstig für Untersuchungen des humanen Immunsystems in den humanisierten Mäusen angesehen (KING et al. 2008). Dieser Zeitraum unterscheidet sich maßgeblich von dem in den eigenen Untersuchungen festgestellten Überlebensalter der in der Versuchsgruppe A erfolgreich transplantierten Maus. Sogar zum Zeitpunkt des Versuchsendes in der 18. Lebenswoche und somit 18 Wochen nach der Injektion boviner hämatopoetischer Vorläuferzellen, zeigte dieses Tier keinerlei klinische Auffälligkeiten sowie Anzeichen von Abstoßungsreaktionen (siehe Kapitel 4.3.1.1). Berücksichtigt werden muss hierbei allerdings der gänzlich unterschiedliche Versuchsaufbau (Transplantation humaner PBMC). Die mittels scil Vet abc-Analysegerät durchgeführten Messungen von Einzelparametern des Blutbildes, insbesondere die bovine Leukozytenzahlbestimmung, führten innerhalb der Versuchsgruppe A zu unterschiedlichen Ergebnissen (siehe Abbildung 7 auf Seite 57). Hervorzuheben sind hier allerdings die fast ausnahmslos konstanten Einzelwerte der Maus, welche als erfolgreich transplantiert galt. Bei den vier anderen Versuchstieren schwankten die gemessenen Einzelwerte sehr stark und konnten aufgrund dessen nur schwer in einen Zusammenhang gebracht werden. Die Höhe der ebenfalls bestimmten Anteile von bovinen Lymphozyten, Granulozyten und Monozyten in der bovinen Leukozytenpopulationen wiederum erschien vergleichsweise einheitlich (siehe Abbildung 8 auf Seite 58) und ähnelte stark der Zusammensetzung bovinen peripheren Blutes. Hier könnte aufgrund einer durchschnittlichen Menge von über 50 % Lymphozyten sogar von lymphozytären Blutbildern gesprochen werden, wie sie im Falle adulter Rinder nachzuweisen sind (siehe Kapitel 2.2).

Die nach einer finalen Präparation durchgeführten Analysen ergaben für das Milzgewebe der Mäuse in der Regel deutlich höhere Gehalte boviner CD45-positiver Zellen als für das periphere Blut und das Herzblut (siehe Abbildungen 9 und 13 auf den Seiten 60 und 64). Dies konnte auch im Falle humanisierter NSG Mäuse nachgewiesen werden (WATANABE et al. 2007; KING et al. 2008; RODEWOHL et al. 2017). Die damit möglicherweise in Zusammenhang stehenden klinischen Auffälligkeiten (WATANABE et al. 2007) erwiesen sich für die Mäuse der Versuchsgruppe A indes nicht als zutref-

find.

Bei der Milz handelt es sich um ein sekundäres lymphatisches Organ, in das die Zellen des Immunsystems nach ihrer Ausreifung auswandern. Demnach könnten die festgestellten hohen Gehalte boviner CD45-positiver Zellen im Milzgewebe einzelner Mäuse der Versuchsgruppe A für eine Auswanderung dieser Zellen und somit für ein erfolgreiches Engraftment der bovinen transplantierten Zellen sprechen. Die im peripheren Blut nachgewiesenen hohen Gehalte boviner Leukozyten bei einem der Tiere stützen diese Annahme.

5.3.2 Versuchsgruppe B – T-Zell-Depletion

Die mittels negativer Selektion gewonnenen SeFs aus unterschiedlichen bovinen Geweben wurden in der Versuchsgruppe B neugeborenen und adulten NSG Mäusen injiziert. Diese Versuchsgruppe war mit insgesamt 19 Tieren deutlich größer als die Versuchsgruppe A und in Bezug auf die Untergruppen relativ heterogen zusammengesetzt (siehe Abbildung 5 auf Seite 54). Neugeborenen NSG Mäusen wurden zum einen mittels T-Zell-Depletion aus bovinem Nabelschnurblut (neugeb. NSB) sowie aus bovinem peripherem Blut (neugeb. pB) gewonnene Stammzell-enhaltende Zellfraktionen injiziert. Außerdem wurden in der Versuchsgruppe B auch adulten NSG Mäusen Vorläuferzellen aus bovinem Nabelschnurblut transplantiert (adult NSB). Aufgrund der sehr unterschiedlichen Tierzahlen dieser einzelnen Untergruppen der Versuchsgruppe B konnten statistische Vergleiche nur zwischen zwei Untergruppen durchgeführt werden (neugeb. NSB und neugeb. pB).

In Bezug auf Überlebensrate sowie Score- und Gewichtsentwicklung wurden bei den Mäusen der Untergruppe neugeb. pB die besten Ergebnisse der gesamten Versuchsgruppe B erreicht (siehe Kapitel 4.3.2.1). Keine der Mäuse dieser Untergruppe musste aufgrund des Erreichens von Abbruchkriterien frühzeitig getötet werden.

Unter anderem in der Gruppe neugeb. NSB musste der Versuch hingegen für mehrere Mäuse vorzeitig beendet werden. Die Grundvoraussetzungen dieser Untergruppe der Versuchsgruppe B (neugeborenen, transplantierte Zellen aus bovinem Nabelschnurblut) entsprachen denen der Versuchsgruppe A. Die Ergebnisse in Bezug auf die klinische Entwicklung der Mäuse waren allerdings sehr unterschiedlich. Die Überlebensrate betrug für die Mäuse der Versuchsgruppe A 100 % und für die Untergruppe neugeb. NSB der Versuchsgruppe B 70 % (siehe Abbildung 25 auf Seite 80).

Eine Ursache hierfür könnten unter anderem die grundlegend unterschiedlichen Isoliermethoden der bovinen Vorläuferzellen sein. Transplantiert wurden im Fall der Versuchsgruppe B sogenannte Stammzell-enhaltende Zellfraktionen, SeFs, denen eine negative Separation vorausging (siehe Kapitel 3.5.2.2). Hierbei wurden aus den bovinen PBMC lediglich die bovinen T-Lymphozyten isoliert und die übrigen Zellfraktionen, zu denen unter anderem die bovinen Vorläuferzellen gehörten, für die Transplantation verwendet. Den Mäusen der Versuchsgruppe A wurden hingegen mittels positiver Separation gewonnene, reine bovine Vorläuferzellen transplantiert (siehe Kapitel 3.5.2.1). Somit bestand der grundlegende Unterschied zwischen den Mäusen der Versuchsgruppe A und den entsprechenden Untergruppen der Versuchsgruppe B, neugeb. NSB und adult NSB, in der zellulären Zusammensetzung des injizierten Materials. Insbesondere die

Injektion möglicherweise verbliebener T-Lymphozyten erschien als Ursache für die festgestellten klinischen Auffälligkeiten mehrerer Mäuse als sehr wahrscheinlich. Bei einzelnen Mäusen konnten im Rahmen der vorliegenden Arbeit Anzeichen einer laut Literatur entwickelten Graft-versus-Host Disease, wie gekrümmter Rücken, verschlechtertes Allgemeinbefinden und Splenomegalie, festgestellt werden (PFLUMIO et al. 1993; HOZUMI et al. 1994; HÖLSCHER et al. 1999; HUANG et al. 2018)(siehe Kapitel 4.3.2.1). Es existieren bereits zahlreiche Modelle der GvHD in humanisierten Mäusen, welche vornehmlich auf der Injektion humaner Leukozyten oder PBMC basieren (PFLUMIO et al. 1993; HOZUMI et al. 1994; SHLOMCHIK 2007; KING et al. 2008; KING et al. 2009; ZHANG et al. 2009; NORELLI et al. 2016; HUANG et al. 2018). Da den Mäusen der Versuchsgruppe B in den eigenen Untersuchungen ebenfalls bovine PBMC (hier ohne bovine T-Lymphozyten) injiziert wurden, kann angenommen werden, dass diese vermutlich teilweise eine GvHD entwickelten.

Bei den Mäusen der Versuchsgruppe B, insbesondere bei den neugeborenen transplantierten Tieren, wurden im Blut vereinzelt sehr hohe Werte boviner CD45-positiver Zellen festgestellt (siehe Kapitel 4.3.2.3). Über den gesamten Versuchszeitraum betrachtet lagen diese für die Mäuse der Untergruppe neugeb. pB am höchsten. Die niedrigsten Werte wiesen die Tiere auf, welche adult Zellen aus Nabelschnurblut erhielten (adult NSB).

Orientierend an einem der bereits angeführten Schwellenwerte CD45-positiver Zellen für humanisierte Mäuse von 10 % (MISHARIN et al. 2012), wurde dieser Wert bei vier der zwölf Versuchstiere, welche neugeborenen oder adult Zellen aus bovinem Nabelschnurblut erhalten hatten, überschritten. Für die Untergruppe neugeb. pB galt dies sogar für fast die Hälfte der Tiere (drei von sieben). Ausgehend von dem sehr viel niedrigeren Schwellenwert aus der Literatur zu bovinen Mausmodellen von 2 % (HAAS et al. 2001), würde man ein sehr viel deutlicheres Ergebnis erhalten. Bei zehn von zwölf Tieren der Untergruppen neugeb. NSB und adult NSB sowie bei allen Tieren (sieben von sieben) der Gruppe neugeb. pB konnte unter dieser Voraussetzung von einem erfolgreichen Engraftment ausgegangen werden.

Insofern konnte hinsichtlich der Anzahl boviner CD45-positiver Zellen im peripheren Blut für die gesamte Versuchsgruppe B ein erfolgreicher Engraftment als für die Versuchsgruppe A angenommen werden. Zu berücksichtigen sind bezüglich dieser Annahme jedoch erneut die stark voneinander abweichenden Gruppengrößen der Versuchs- sowie der Untergruppen.

Die am Versuchsende durchgeführten Analysen ergaben vor allem für die Mäuse der Untergruppe neugeb. pB im Herzblut nochmals höhere Werte boviner CD45-positiver Zellen als im Laufe des Versuches im peripheren Blut (siehe Abbildung 23 auf Seite 77). Es handelte sich um die Untergruppe der Versuchsgruppe B, bei der die beste Überlebensrate sowie mit die höchsten Werte boviner CD45-positiver Zellen im peripheren Blut festgestellt wurden (siehe Abbildung 25 auf Seite 80 und Abbildung 19 auf Seite 72).

Sowohl bei den Mäusen der Versuchsgruppe A als auch bei den Mäusen der anderen Untergruppen der Versuchsgruppe B (neugeb. NSB und adult NSB) konnte dies nicht festgestellt werden. Zum Versuchsende konnten bei diesen Tieren im Blut annähernd

gleich große oder sogar geringere Anteile boviner CD45-positiver Zellen nachgewiesen werden als im Laufe des Versuches. Der Unterschied zwischen den genannten Versuchsgruppen lag in der Herkunft der transplantierten Zellen. Diese stammten zum einen aus bovinem peripherem Blut (neugeb. pB) und zum anderen aus bovinem Nabelschnurblut (VG A; neugeb. NSB; adult NSB). Ein Zusammenhang zu den erhöhten Anteilen boviner CD45-positiver Zellen der Untergruppe neugeb. pB am Versuchsende kann mit den vorliegenden Ergebnissen nicht sicher angenommen werden.

Das in der Versuchsgruppe A festgestellte Ergebnis, dass zum Versuchsende in der Milz teilweise deutlich mehr bovine CD45-positive Zellen nachgewiesen wurden als im Blut, galt teilweise auch für die Versuchsgruppe B. Insbesondere war dies bei den neugeborenen transplantierten Mäusen nachzuweisen (neugeb. NSB und neugeb. pB; siehe Abbildung 23 auf Seite 77). Ein Zusammenhang zwischen dieser Feststellung sowie dem notwendigen vorzeitigen Versuchsende einzelner Tiere der Untergruppe neugeb. NSB konnte nicht hergestellt werden. Dies widersprach allerdings den Ergebnissen von WATANABE et al. (2007), obwohl bei drei Tieren aus der Versuchsgruppe B im Milzgewebe vergleichbare hohe Prozentsätze an CD45-positiven Zellen (um die 80 %) gemessen wurden. Hierbei handelte es sich ausschließlich um Tiere, bei denen während des Versuches auch im peripheren Blut hohe Werte boviner CD45-positiver Zellen nachgewiesen werden konnten. Klinische Auffälligkeiten wurden bei diesen Mäusen trotz hoher Leukozytenzahlen nicht festgestellt.

Auch die für die Versuchsgruppe B generierten Ergebnisse in Bezug auf den Anteil boviner CD45-positiver Zellen im Milzgewebe lassen darauf schließen, dass von einem erfolgreichen Engraftment der transplantierten bovinen Zellen sowie von einer Auswanderung dieser in die sekundären lymphatischen Organe ausgegangen werden kann.

Im Vergleich zu den Ergebnissen der durchflusszytometrischen Analyse von Blut und Milzgewebe wurden im Knochenmarksgewebe am Versuchsende bis auf Ausnahmen niedrigere Anteile boviner CD45-positiver Zellen nachgewiesen (siehe Abbildung 23 auf Seite 77). Dies könnte ebenfalls als Indiz für ein erfolgreiches Engraftment der transplantierten bovinen Zellen im Organismus Maus angesehen werden. Zellen des bovinen Immunsystems könnten im Knochenmark gebildet werden und ausreifen, um dann über das Blut in die Peripherie (hier Milz) auszuwandern. Somit lägen im Knochenmark geringere Zahlen boviner CD45-positiver Zellen vor als in den anderen Geweben. Um dies zu bestätigen, könnten Knochenmarksanalysen kurz nach Transplantation sowie aus dem laufenden Versuch hilfreich sein. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit können hierzu keine Aussagen getroffen werden.

Zusammenfassend konnten auch in der Versuchsgruppe B erfolgreich bovine Zellen in immundefiziente Mäuse transplantiert werden. Die Ergebnisse der im Rahmen der vorliegenden Arbeit durchgeführten Analysen sprechen sowohl für ein erfolgreiches Engraftment der transplantierten Vorläuferzellen als auch für ein Auswandern daraufhin gebildeter und ausgereifter Zellen des bovinen Immunsystems bei den Mäusen aller Untergruppen. Die besten Ergebnisse wurden für die neugeborenen transplantierten Tiere erzielt. Diesen wurden aus bovinem Nabelschnurblut (neugeb. NSB) und aus bovinem peripherem Blut (neugeb. pB) gewonnene Zellen injiziert. In der erstgenannten Gruppe traten im Laufe des Versuches bei Einzeltieren jedoch so ausgeprägte klinische Abweichungen auf, dass der Versuch für diese frühzeitig beendet werden musste. In der

Untergruppe neugeb. pB musste hingegen für keines der Tiere ein vorzeitiges Versuchsende eingeleitet werden.

Bei den adult transplantierten Mäusen (adult NSB) wurden im Laufe des Versuches sehr viel niedrigere Anteile boviner CD45-positiver Zellen im Blut nachgewiesen als bei den Tieren der bereits aufgeführten Untergruppen der Versuchsgruppe B. Die geringe Stichprobengröße dieser Untergruppe ($n = 2$) ließ aussagekräftige statistische Vergleiche zu den anderen beiden Untergruppen jedoch nicht zu.

5.4 Bewertung und Ausblick

Bezogen auf die im Rahmen der vorliegenden Arbeit durchgeführten Untersuchungen kann zunächst für die Resultate der primär notwendigen Gewinnungs- und Separationsarbeiten ergebnisorientiert ein positives Fazit gezogen werden. Aus den zur Verfügung stehenden Proben bovinen Nabelschnurblutes und bovinen peripheren Blutes konnten mittels Dichtegradientenzentrifugation bovine PBMC gewonnen werden. Hierbei erwies sich nach umfangreicher Austestung die Verwendung sogenannter SepMate™-Tubes zusammen mit einem Dichtemedium mit einer Dichte von 1,077 g/ml für die bovinen Proben als am besten geeignet. Aus den bovinen Nabelschnurblutproben wurden in der Folge signifikant mehr PBMC gewonnen als aus dem bovinen peripheren Blut (Abbildung 1 auf Seite 46).

Anschließend konnten aus den gewonnenen bovinen PBMC mittels entweder positiver oder negativer Zellseparation die bovinen hämatopoetischen Vorläuferzellen isoliert beziehungsweise angereichert werden. Für beide Methoden standen bovine Antikörper zur Verfügung. Die isolierten Vorläuferzellen wurden immundefizienten NSG Mäusen transplantiert, um in deren Organismus die Entwicklung boviner Immunzellen zu ermöglichen.

Dies ist im Rahmen der vorliegenden Arbeit gelungen. Zellen mit bovinen Oberflächenmarkern konnten über einen längeren Zeitraum hinweg im peripheren Blut der Versuchstiere nachgewiesen werden (siehe Abbildung 9 auf Seite 60 und Abbildung 19 auf Seite 72).

Bezogen auf die in der Vergangenheit bereits durchgeführten Versuche zu bovinen Mausmodellen (siehe Kapitel 2.4) stellten die im Rahmen der vorliegenden Arbeit vorgenommenen Untersuchungen eine völlig neue Herangehensweise dar. Die Unterschiede bestanden zum einen in dem hier genutzten, hochgradig immundefizienten NSG Mausstamm und zum anderen in dem für die Transplantation erstmals verwendeten bovinen Material, bovinen Vorläuferzellen. Bisher wurden für die Entwicklung boviner Mausmodelle entweder bovine Leukozyten (STIRTZINGER et al. 1990; GREENWOOD und CROY 1993; GREENWOOD et al. 1997; HÖLSCHER et al. 1999) oder bovines fetales Gewebe eingesetzt (BOERMANS et al. 1992; DENNY et al. 1996; SMITH et al. 1999; HAAS et al. 2001; GATTO et al. 2006; ALVAREZ et al. 2009).

Die im Rahmen der vorliegenden Arbeit erzielten Ergebnisse in Bezug auf die Entwicklung eines bovinen Mausmodells sind vielversprechend, müssen aber im Hinblick auf die angestrebte weiterführende Verwendung der transplantierten Versuchstiere noch optimiert werden. Insbesondere die Reproduzierbarkeit verlässlicher Ergebnisse sowie ausstehende Funktionalitätsprüfungen im Organismus Maus sollten hierbei im Fokus

stehen. Einen Beitrag könnten hier neu entwickelte bovine Antikörper zur Isolation boviner Vorläuferzellen sowie grundlegend weiterentwickelte Isolationsmethoden einzelner boviner Zellpopulationen, z.B. mittels Durchflusszytometrie, leisten. Auch die Verwendung sonstigen bovinen Ursprungsmaterials, wie beispielsweise Vorläuferzellen aus dem bovinen Knochenmark, könnte in Frage kommen. Für einen aussagekräftigen Vergleich der hier durchgeführten Transplantationswege müsste zudem die Stichprobengröße innerhalb der einzelnen Versuchs- und Untergruppen erhöht werden. Die Vorgehensweise sollte generell vereinheitlicht werden.

Inhalt möglicher weiterführender Untersuchungen könnte unter Verwendung spezifischer boviner Krankheitserreger (z.B. des bovinen Leukosevirus) die Entwicklung spezieller boviner Krankheitsmodelle im Organismus Maus sein.

Wie bereits einleitend angedeutet, kann das vorliegend etablierte bovine Mausmodell ein wertvolles Werkzeug für neue Entwicklungen sowie präklinische und Grundlagenforschung im Bereich der Rindermedizin und spezifischer Infektionskrankheiten der Rinder darstellen. Dies kann besonders im Hinblick auf die aktuell global stattfindende Veränderung der Überlebens- und Vermehrungsbedingungen einzelner Infektionserreger und der damit in Zusammenhang stehenden Vektoren von großer Bedeutung sein.

Angesichts des breiten Einsatzes humanisierter Mausmodelle (AKKINA 2013; BREHM et al. 2014; GASKA und PLOSS 2015; MARSDEN und ZACK 2015; RODEWOHL et al. 2017; LAI und CHEN 2018) könnten auch bovine Mausmodelle auf vielfältige Art und Weise eingesetzt werden und der Gewinnung zahlreicher neuer Erkenntnisse im veterinärmedizinischen Bereich dienen. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit konnten hierfür erste vielversprechende Ergebnisse generiert werden.

Zusammenfassung

Anne Kühlmann

Untersuchungen zur Etablierung eines bovinisierten NSG™ Maus-Modells

Institut für Virologie, Veterinärmedizinische Fakultät, Universität Leipzig

Eingereicht im April 2021.

101 Seiten, 25 Abbildungen, 11 Tabellen, 174 Literaturangaben, Anhang (mit 7 Abbildungen, 5 Tabellen)

Schlüsselwörter: bovin, NSG™, CD34+, c-kit+, Durchflusszytometrie, boCD45+

Einleitung: Humanisierte Mausmodelle werden in der humanmedizinischen Forschung bereits vielseitig eingesetzt und haben zu zahlreichen wissenschaftlichen Erkenntnissen im Zusammenhang mit zum Beispiel humanen Vorläuferzellen oder in Bezug auf humane Infektionskrankheiten beigetragen. Orientierung für die vorliegende Arbeit bot eine der zahlreichen Methoden zur Humanisierung von Mäusen, bei der immundefizienten Mäusen hämatopoetische Vorläuferzellen transplantiert werden.

Ziele der Untersuchungen: Das etablierte Modell der humanisierten Maus sollte im Rahmen der vorliegenden Arbeit auf die Spezies Rind übertragen werden, um sogenannte bovinisierte Mäuse zu entwickeln und somit die Grundlage für ein vielversprechendes Modell des Immunsystems des Rindes zu schaffen. Es sollten zweckmäßige Transplantationsmethoden etabliert werden, die zu einer nachweisbaren Bovinisierung immundefizienter Mäuse führen.

Tiere, Material und Methoden: Aus bovinem Nabelschnurblut (NSB) und bovinem

peripheren Blut (pB) wurden mittels Dichtegradientenzentrifugation die jeweiligen mononukleären Zellen gewonnen (bCBMC (bovine cord blood mononuclear cells) aus NSB; bPBMC (bovine peripheral blood mononuclear cells) aus pB). Hierfür wurde methodisch die Durchführung unter Anwendung eines Mediums mit einer Dichte von 1,077 g/ml etabliert. Zur Isolierung boviner hämatopoetischer Vorläuferzellen aus den genannten Zellfraktionen kamen verschiedene magnetische Separationsmethoden zum Einsatz. Mittels positiver Separation wurden aus den bCBMC zum einen CD34-positive (CD34+) und zum anderen *c-kit*-positive (*c-kit*+) Zellen isoliert, welche jeweils neugeborenen NSGTM Mäusen (NOD.Cg-Prkdc^{scid}Il2rg^{tm1Wjl}) transplantiert wurden (Versuchsgruppe A: *CD34+*: n = 1 und *c-kit+*: n = 4). Darüber hinaus wurden mittels negativer Separation die T-Lymphozyten aus den bCBMC und bPBMC depletiert um die Stammzell-enthaltenden Fraktionen (SeF) zu gewinnen. Zur Depletion boviner T-Lymphozyten kamen zeitgleich drei Antikörper gegen bovine Oberflächenmarker dieses Zelltyps zum Einsatz: WC1, CD4 und CD8. Die isolierten SeF wurden in der Versuchsgruppe B ebenfalls NSGTM Mäusen transplantiert, jedoch, im Unterschied zur Versuchsgruppe A, neugeboren und auch adult (Versuchsgruppe B: *neugeb. NSB*: n = 10; *neugeb. pB*: n = 7; *adult NSB*: n = 2). Beide Versuchsgruppen bestanden aus mehreren unterschiedlich großen Untergruppen, welches auf die Größe der jeweils selektierten Zellpopulationen zurückzuführen war. Transplantationsverlauf und -erfolg innerhalb der Versuchsgruppen wurden mittels klinischem Scoring und Gewichtsbestimmung, wiederholter Blutbildanalyse sowie mittels durchflusszytometrischer Analysen des Blutes im laufenden Versuch und Analysen von Blut und Organsuspensionen aus Milz und Knochenmark zum Zeitpunkt des Versuchsendes untersucht. Für die durchflusszytometrischen Analysen des peripheren Blutes der Mäuse kamen verschiedene bovine Antikörper zum Einsatz, wobei dem Pan-Leukozytenmarker anti-CD45 die größte Bedeutung zukam. Durch den Einsatz muriner und boviner anti-CD45-Antikörper gelang die Unterscheidung zwischen originären murinen Leukozyten und den nach der Transplantation im Organismus der Maus sich etablierten bovinen Leukozyten. Statistische Analysen zwischen den Untergruppen waren aufgrund der unterschiedlichen Gruppengrößen nur eingeschränkt möglich. Es wurde mittels Kolmogorov-Smirnov-Test auf Normalverteilung untersucht. Je nach Anzahl der zu vergleichenden Grundgesamtheiten wurden die Daten anschließend entweder mittels t-Test für unabhängige Stichproben beziehungsweise mittels Mann-Whitney-U-Test (n = 2) oder mittels nicht parametrischer, einfaktorierter Varianzanalyse (Kruskal-Wallis-Test, wenn n ≥ 3) ausgewertet. Das Signifikanzniveau wurde jeweils auf p = 0,05 festgesetzt.

Ergebnisse: Bei den Tieren der Untergruppe *neugeb. pB* der Versuchsgruppe B wurden nach der Transplantation während des Versuchszeitraumes von 18 Wochen keine klinischen Auffälligkeiten festgestellt. Das gleiche galt für die Tiere beider Untergruppen der Versuchsgruppe A. Aus den anderen beiden Untergruppen der Versuchsgruppe B, *neugeb. NSB* und *adult NSB*, mussten hingegen aufgrund des eingetretenen starken Gewichtsverlustes und der Verschlechterung des klinischen Zustandes Tiere vorzeitig getötet werden. In der Untergruppe *neugeb. NSB* der Versuchsgruppe B handelte es sich um 3 von 10 Tieren (30 %), in der Untergruppe *adult NSB* um 1 von 2 Tieren (50 %). In allen Versuchsgruppen konnten im Laufe des Experimentes im peripheren Blut der Mäuse durchflusszytometrisch bovine CD45-positive Zellen nachgewiesen werden. Im Falle der Versuchsgruppe A wurden während des gesamten Versuches im peripheren

Blut der Tiere der Untergruppe *c-kit+* im Mittel höhere Anteile boviner CD45-positiver Zellen an der Gesamtleukozytenzahl nachgewiesen als im Blut der Tiere der Untergruppe *CD34+* (*c-kit+*: 11,5 %; *CD34+*: 0,733 %). Im Vergleich zu den genannten Ergebnissen der Versuchsgruppe A wurde bei den neugeborenen transplantierten Tieren der Versuchsgruppe B durchschnittlich eine größere Zahl boviner CD45-positiver Zellen im peripheren Blut nachgewiesen (*neugeb. NSB*: 13,5 % und *neugeb. pB*: 16,0 %). Es konnte kein signifikanter Unterschied zur Untergruppe *c-kit+* der Versuchsgruppe A festgestellt werden (Kruskal-Wallis-Test). Im peripheren Blut der adult transplantierten Mäuse der Versuchsgruppe B wurden während des Versuchszeitraumes im Mittel 2,89 % bovine CD45-positive Zellen nachgewiesen.

Schlussfolgerungen: Im Rahmen der vorliegenden Arbeit ist es gelungen, ein Modell bovinisierter Mäuse zu entwickeln. Unter Berücksichtigung der klinischen Parameter erwies sich die Transplantation von T-Zell-depletierten mononukleären Zellen aus bovinem peripherem Blut in neugeborene NSGTM Mäuse als am vielversprechendsten, auch wenn aufgrund der begrenzten Tierzahlen statistische Analysen nur eingeschränkt auswertbar waren. Daran anknüpfend können die dargelegten Untersuchungen fortgesetzt und bovinisierte Mausmodelle ausgewählter Infektionserreger des Rindes etabliert werden. Die im Rahmen der vorliegenden Arbeit durchgeführten Untersuchungen bilden eine Grundlage, um weitere Anwendungen zur Immunologie in der Rindermedizin zu etablieren.

Summary

Anne Kühlmann

Studys of the establishment of a bovinized NSG™ mice-model

Institute of Virology, Faculty of Veterinary Medicine, University of Leipzig

Submitted in April 2021.

101 pages, 25 figures, 11 tables, 174 references, appendix (including 7 figures, 5 tables)

keywords: bovine, NSG™, CD34+, c-kit+, flow cytometry, boCD45+

Introduction: Humanized mouse models are already well established in human biomedical research and have led to various scientific innovations for example in connection with human progenitor cells or human infectious diseases. The present work is based on one of the numerous methods for the humanization of mice, particularly the transplantation of hematopoietic progenitor cells into immunodeficient mice.

Objectives: The aim of the present work was to transfer the well established humanized mice model to the bovine species in order to develop so called bovinized mice and thus to create groundwork for a promising model of the bovine immune system in general. Appropriate transplantation methods should be established which lead to a detectable bovinization of immunodeficient mice.

Animals, material and methods: Bovine mononuclear cells out of bovine cord blood (CB) and bovine peripheral blood (pB) were obtained by density gradient centrifugation (bCBMC (bovine cord blood mononuclear cells) from CB; bPBMC (bovine peripheral blood mononuclear cells) from pB). For this purpose the method using a

medium with a density of 1,077 g/ml was established. For the isolation of bovine hematopoietic progenitor cells from the cell fractions mentioned above, different magnetic separation methods were used. Using positive separation, CD34-positive (CD34+) and *c-kit*-positive (*c-kit*+) cells were isolated from the bCBMC and each transplanted into newborn NSGTM mice (NOD.Cg-Prkdc^{scid}Il2rg^{tm1Wjl}; experimental group A: *CD34*+; *n* = 1 and *c-kit*+: *n* = 4). In addition, negative separation was used to deplete the T lymphocytes from the bCBMC and bPBMC to obtain the stem cell-containing fraction (ScF). For the depletion of bovine T lymphocytes three antibodies against bovine surface markers of this cell type were used simultaneously: WC1, CD4 and CD8. In experimental group B the isolated ScF were also transplanted into NSGTM mice, but, in contrast to experimental group A, newborn and also adult (experimental group B: *newborn CB*: *n* = 10; *newborn pB*: *n* = 7; *adult CB*: *n* = 2). Both experimental groups consisted of several subgroups of different sizes, which was due to the size of the cell populations selected in each case. Transplantation progression and success within the experimental groups were assessed by clinical scoring including weight determination, repeated blood count analysis and flow cytometric analyses of blood during the trial and analyses of blood and organ suspensions from spleen and bone marrow at the end of the trial. For the flow cytometric analyses of the peripheral blood of the mice, different bovine antibodies were used, with the pan-leukocyte marker anti-CD45 being the most significant. By using murine and bovine anti-CD45 antibodies, it was possible to distinguish between original murine leukocytes and the engrafted bovine leukocytes in the mouse organism after transplantation. Statistical analyses between subgroups were limited due to differences in group size. A Kolmogorov-Smirnov-test was carried out for validation of a normal distribution. Depending on the number of populations to be compared, the data were then tested either by means of t-test for independent samples or by Mann-Whitney-U-test (*n* = 2) or, if *n* ≥ 3, by non-parametric one-way analysis of variance (Kruskal-Wallis-test). The significance level was set at *p* = 0,05 in each case.

Results: No clinical deviations were observed in the animals of the subgroup *newborn pB* of experimental group B after transplantation during the experimental period of 18 weeks. The same was true for the animals of both subgroups of experimental group A. In contrast, animals of the other two subgroups of experimental group B, *newborn CB* and *adult CB*, had to be sacrificed before the intended end of the experiments owing to severe loss of weight and a decline of the clinical condition (humane endpoints). In subgroup *newborn CB* this referred to 3 out of 10 mice (30 %), in subgroup *adult CB* to 1 out of 2 mice (50 %). In the peripheral blood of mice from all experimental groups bovine CD45-positive cells were detected. In the case of experimental group A throughout the experiment averagely higher proportions of bovine CD45-positive cells in the total leukocyte count were detected in the peripheral blood of animals of the *c-kit*+ subgroup than in the peripheral blood of animals of the *CD34*+ subgroup (*c-kit*+: 11,5 %; *CD34*+: 0,733 %). In comparison to the stated results of experimental group A, a greater average number of bovine CD45-positive cells were detected in the peripheral blood of the newborn transplanted animals of experimental group B (*newborn CB*: 13,5 % und *newborn pB*: 16,0 %). No significant difference to the results of subgroup *c-kit*+ of experimental group A could be determined (Kruskal-Wallis-test). In the peripheral blood of adult transplanted mice of experimental group B, during the experimental period an average number of 2,89 % bovine CD45-positive cells was

detected.

Conclusions: In the present work a model of bovinized mice successfully could be generated. Considering the clinical parameters, the transplantation of T cell-depleted bovine peripheral blood mononuclear cells into newborn NSGTM mice proved to be most promising, although statistical analyses were restricted due to limited animal numbers. Following on from this, the studies presented can be continued and bovinized mouse models of selected infectious agents of cattle can be established. The investigations carried out within the scope of the present work form a basis for establishing further applications for immunology in bovine medicine.

Literaturverzeichnis

1. Abboud M, Xu F, LaVia M und Laver J. Study of early hematopoietic precursors in human cord blood. *Exp Hematol.* 1992;20:1043–7.
2. Akkina R. New generation humanized mice for virus research: Comparative aspects and future prospects. *Virology.* 2013;435:14–28.
3. Almici C, Carlo-Stella C, Mangoni L et al. Density Separation of Umbilical Cord Blood and Recovery of Hemopoietic Progenitor Cells. Implications for Cord Blood Banking. *Stem Cells.* 1995;13:533–40.
4. Alvarez AJ, Endsley JJ, Werling D und Mark Estes D. WC1(+) gammadelta T cells Indirectly Regulate Chemokine Production During Mycobacterium bovis Infection in SCID-bo Mice. *Transbound Emerg Dis.* 2009;56:275–84.
5. Andrews RG, Singer JW und Bernstein ID. Monoclonal antibody 12-8 recognizes a 115-kd molecule present on both unipotent and multipotent hematopoietic colony-forming cells and their precursors. *Blood.* 1986;67:842–5.
6. Ashman LK. The biology of stem cell factor and its receptor C-kit. *Int J Biochem Cell Biol.* 1999;31:1037–51.
7. Ayoub IA und Yang TJ. Age-dependent changes in peripheral blood lymphocyte subpopulations in cattle: A longitudinal study. *Dev Comp Immunol.* 1996;20:353–63.
8. Baldwin CL, Sathiyaseelan T, Rocchi M und McKeever D. Rapid changes occur in the percentage of circulating bovine WC1(+)gamma delta Th1 cells. *Res Vet Sci.* 2000;69:175–80.
9. Baldwin CL, Teale AJ, Naessens JG, Goddeeris BM, MacHugh ND und Morrison WI. Characterization of a subset of bovine T lymphocytes that express BoT4 by monoclonal antibodies and function: similarity to lymphocyte defined by human T4 and murine L3T4. *J Immunol.* 1986;136:4385–91.

10. Baldwin CL und Telfer JC. The bovine model for elucidating the role of gamma-delta T cells in controlling infectious diseases of importance to cattle and humans. *Mol Immunol.* 2015;66:35–47.
11. Bensaïd A und Hadam M. Individual antigens of cattle. Bovine CD4 (BoCD4). *Vet Immunol Immunopathol.* 1991;27:51–4.
12. Birkeland ML, Metlay J, Sanders VM et al. Epitopes on CD45R T200 molecules define differentiation antigens on murine B and T lymphocytes. *J Mol Cell Immunol.* 1988;4:71–85.
13. Boermans HJ, Percy DH, Stirtzinger T und Croy BA. Engraftment of severe combined immune deficient/beige mice with bovine foetal lymphoid tissues. *Vet Immunol Immunopathol.* 1992;34:273–89.
14. Bosma GC, Custer RP und Bosma MJ. A severe combined immunodeficiency mutation in the mouse. *Nature.* 1983;301:527–30.
15. Boysen P und Storset AK. Bovine natural killer cells. *Vet Immunol Immunopathol.* 2009;130:163–77.
16. Brehm MA, Shultz LD und Greiner DL. Humanized mouse models to study human diseases. *Curr Opin Endocrinol Diabetes Obes.* 2010;17:120–5.
17. Brehm MA, Wiles MV, Greiner DL und Shultz LD. Generation of improved humanized mouse models for human infectious diseases. *J Immunol Methods.* 2014;410:3–17.
18. Broudy VC, Lin N, Zsebo KM et al. Isolation and characterization of a monoclonal antibody that recognizes the human c-kit receptor. *Blood.* 1992;79:338–46.
19. Brown JA und Boussiotis VA. Umbilical cord blood transplantation: basic biology and clinical challenges to immune reconstitution. *Clin Immunol.* 2008;127:286–97.
20. Broxmeyer HE, Douglas GW, Hango G et al. Human umbilical cord blood as a potential source of transplantable hematopoietic stem/progenitor cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1989;86:3828–32.
21. Brun-Hansen HC, Kampen AH und Lund A. Hematologic values in calves during the first 6 months of life. *Vet Clin Pathol.* 2006;35:182–7.
22. Bucy RP, Chen CL und Cooper MD. Tissue localization and CD8 accessory molecule expression of T gamma delta cells in humans. *J Immunol.* 1989;142:3045–9.
23. Campos L, Roubi N und Guyotat D. Definition of optimal conditions for collection and cryopreservation of umbilical cord hematopoietic cells. *Cryobiology.* 1995;32:511–5.
24. Cao X, Shores EW, Hu-Li J et al. Defective lymphoid development in mice lacking expression of the common cytokine receptor gamma chain. *Immunity.* 1995;2:223–38.
25. Cardoso AA, Li ML, Batard P et al. Release from quiescence of CD34+ CD38- human umbilical cord blood cells reveals their potentiality to engraft adults. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1993;90:8707–11.

26. Cardoso TC, Ferrari HF, Garcia AF et al. Isolation and characterization of Wharton's jelly-derived multipotent mesenchymal stromal cells obtained from bovine umbilical cord and maintained in a defined serum-free three-dimensional system. *BMC Biotechnol.* 2012;12:18.
27. Case J, Rice A und Vowels M. Conditions affecting the isolation of human umbilical cord blood CD34+ cells. *J Hematother.* 1996;5:255–60.
28. Civin CI, Strauss LC, Brovall C, Fackler MJ, Schwartz JF und Shaper JH. Antigenic analysis of hematopoiesis. III. A hematopoietic progenitor cell surface antigen defined by a monoclonal antibody raised against KG-1a cells. *J Immunol.* 1984;133:157–65.
29. Clevers H, MacHugh ND, Bensaid A et al. Identification of a bovine surface antigen uniquely expressed on CD4-CD8- T cell receptor gamma/ delta+ T lymphocytes. *Eur J Immunol.* 1990;20:809–17.
30. Cohen Y und Nagler A. Cord Blood Biology and Transplantation. *Isr Med Assoc J.* 2004;6:39–46.
31. Custer RP, Bosma GC und Bosma MJ. Severe Combined Immunodeficiency (SCID) in the Mouse. Pathology, Reconstitution, Neoplasms. *Am J Pathol.* 1985;120:464–477.
32. D'Arena G, Musto P, Cascavilla N und Carotenuto M. Thy-1 (CDw90) and c-kit receptor (CD117) expression on CD34+ hematopoietic progenitor cells. a five dimensional flow cytometric study. *Haematologica.* 1998;83:587–92.
33. Daha MR. Grand challenges in molecular innate immunity. *Front Immunol.* 2011;2:1–2.
34. Davis WC, Brown WC, Hamilton MJ et al. Analysis of monoclonal antibodies specific for the gamma delta TcR. *Vet Immunol Immunopathol.* 1996;52:275–83.
35. Davis WC, Marusic S, Lewin HA et al. The development and analysis of species specific and cross reactive monoclonal antibodies to leukocyte differentiation antigens and antigens of the major histocompatibility complex for use in the study of the immune system in cattle and other species. *Vet Immunol Immunopathol.* 1987;15:337–76.
36. Davis WC, MacHugh ND, Park YH, Hamilton MJ und Wyatt CR. Identification of a monoclonal antibody reactive with the bovine orthologue of CD3 (BoCD3). *Vet Immunol Immunopathol.* 1993;39:85–91.
37. De Bruyn C, Delforge A, Bron D et al. Comparison of the Coexpression of CD38, CD33 and HLA-DR Antigens on CD34+ Purified Cells from Human Cord Blood and Bone Marrow. *Stem Cells.* 1995;13:281–8.
38. Denny SL, Brackett NY, Mann FA, Kreeger JM und Estes DM. Antigen-Specific Humoral Immune Responses to a Hapten-Carrier Conjugate in SCID Mice Engrafted with Bovine Fetal Hematopoietic Tissues. *Lab Anim Sci.* 1996;46:48–55.
39. DiSanto JP, Müller W, Guy-Grand D, Fischer A und Rajewsky K. Lymphoid development in mice with a targeted deletion of the interleukin 2 receptor gamma chain. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1995;92:377–81.

40. Drake AC, Khoury M, Leskov I et al. Human CD34+ CD133+ Hematopoietic Stem Cells Cultured with Growth Factors Including Angptl5 Efficiently Engraft Adult NOD-SCID Il2ry^{-/-} (NSG) Mice. *PLoS One*. 2011;6:e18382.
41. Eapen M, Rubinstein P, Zhang MJ et al. Outcomes of transplantation of unrelated donor umbilical cord blood and bone marrow in children with acute leukaemia: a comparison study. *Lancet*. 2007;369:1947–54.
42. Ellis JA, Baldwin CL, MacHugh ND, Bensaid A, Teale AJ und Goddeeris BM. Characterization by a monoclonal antibody and functional analysis of a subset of bovine T lymphocytes that express BoT8, a molecule analogous to human CD8. *Immunology*. 1986;58:351–8.
43. Engelhardt Wv und Breves G. *Physiologie der Haustiere*. 99 Tabellen. Hrsg. von Engelhardt Wv. 2., völlig neu bearb. Aufl. Stuttgart: Enke, 2005. XXII, 682 Seiten.
44. Foote JB, Lutful Kabir FM, Graff EC et al. Engraftment of canine peripheral blood lymphocytes into nonobese diabetic-severe combined immune deficient IL-2R common gamma chain null mice. *Vet Immunol Immunopathol*. 2013;157:131–41.
45. Fritsch G, Nelson RT, Muiya P, Naessens J und Black SJ. Characterization of bovine haemopoietic progenitor cells using monoclonal antibodies and fluorocytometry. *Vet Immunol Immunopathol*. 1991;27:277–92.
46. Fritsch G, Stimpfl M, Buchinger P et al. Does cord blood contain enough progenitor cells for transplantation? *J Hematother*. 1994;3:291–8.
47. Gaska JM und Ploss A. Study of viral pathogenesis in humanized mice. *Curr Opin Virol*. 2015;11:14–20.
48. Gatto NT, Confer AW, Estes DM, Whitworth LC und Murphy GL. Lung Lesions in SCID-bo and SCID-bg Mice after Intratracheal Inoculation with Wild-type or Leucotoxin-deficient Mutant Strains of *Mannheimia haemolytica* Serotype 1. *J Comp Pathol*. 2006;2006:355–65.
49. Gluckman E, Broxmeyer HA, Auerbach AD et al. Hematopoietic reconstitution in a patient with Fanconi's anemia by means of umbilical-cord blood from an HLA-identical sibling. *N Engl J Med*. 1989;321:1174–8.
50. Goker H, Haznedaroglu IC und Chao NJ. Acute graft-vs-host disease Pathobiology and management. *Exp Hematol*. 2001;29:259–77.
51. Grandel D. *Isolierung und Charakterisierung der hämatopoietischen Stammzellen aus dem Nabelschnurblut beim Rind (Bos taurus)*[Dissertation med. vet]. Institut für Tieranatomie. München: Ludwig-Maximilians-Univ., 2005. 194 S.
52. Greenwood JD und Croy BA. A study on the engraftment and trafficking of bovine peripheral blood leukocytes in severe combined immunodeficient mice. *Vet Immunol Immunopathol*. 1993;38:21–44.
53. Greenwood JD, Croy BA, Trout DR und Wilcock BP. Xenogeneic (bovine) peripheral blood leukocytes engrafted into severe combined immunodeficient mice retain primary immune function. *Vet Immunol Immunopathol*. 1997;59:93–112.

54. Greiner DL, Hesselton RA und Shultz LD. SCID mouse models of human stem cell engraftment. *Stem Cells*. 1998;16:166–77.
55. Haas KM, Taylor KA, MacHugh ND, Kreeger JM und Estes DM. Enhancing effects of anti-CD40 treatment on the immune response of SCID-bovine mice to *Trypanosoma congolense* infection. *J Leukoc Biol*. 2001;70:931–40.
56. Haas L, Perdrizet J, Butt M, Posso M, Quimby F und Casey JW. Engraftment of Bovine Leukemia Virus Infected Lymphocytes into SCID Mice. *Virology*. 1993;192:655–8.
57. Harper SB, Hurst WJ, Ohlsson-Wilhelm B und Lang CM. The Response of Various Hematologic Parameters in the Young Bovine Subjected to Multiple Phlebotomies. *ASAIO J*. 1994:816–26.
58. Hein WR und Dudler L. TCR gammadelta+ cells are prominent in normal bovine skin and express a diverse repertoire of antigen receptors. *Immunology*. 1997;91:58–64.
59. Hein WR und Mackay CR. Prominence of $\gamma\delta$ T cells in the ruminant immune system. Review. *Immunol Today*. 1991;12:30–4.
60. Hikono H, Ohta M, Kubota T, Zhou JH, Inumaru S und Sakurai M. Production and characterization of monoclonal antibodies that recognize bovine Kit receptor. *Vet Immunol Immunopathol*. 1999;68:101–12.
61. Hikono H, Ohta M, Sakurai M und Momotani E. Expression of Kit, the receptor for stem cell factor, in bovine peripheral blood. *J Vet Med Sci*. 2001b;63:321–4.
62. Hikono H, Ohta M, Zhou JH und Sakurai M. Expression and distribution of the Kit receptor in bovine bone marrow cells. *Am J Vet Res*. 2001a;62:974–7.
63. Hiramatsu H, Nishikomori R, Heike T et al. Complete reconstitution of human lymphocytes from cord blood CD34+ cells using the NOD/SCID/gammanull mice model. *Blood*. 2003;102:873–80.
64. Hirt W, Reddehase MJ und Saalmüller A. Distinct gamma/delta T cell receptors define two subsets of circulating porcine CD2-CD4-CD8- T lymphocytes. *Eur J Immunol*. 1990;20:265–9.
65. Hölscher C, Hasch G, Joswig N, Stauffer U, Müller U und Mossmann H. Long term substitution and specific immune responses after transfer of bovine peripheral blood lymphocytes into severe combined immunodeficient mice. *Vet Immunol Immunopathol*. 1999;70:67–83.
66. Holyoake TL, Nicolini FE und Eaves CJ. Functional differences between transplantable human hematopoietic stem cells from fetal liver, cord blood, and adult marrow. *Exp Hematol*. 1999;27:1418–27.
67. Howard CJ, Morrison WI, Bensaid A et al. Summary of workshop findings for leukocyte antigens of cattle. *Vet Immunol Immunopathol*. 1991;27:21–7.
68. Hozumi N, Gorczynski R, Peters W und Sandhu JS. A SCID mouse model for human immune response and disease. *Res Immunol*. 1994;145:370–9.

69. Huang D, Wang Y, Hawthorne WJ et al. Ex vivo-expanded baboon CD39 + regulatory T cells prevent rejection of porcine islet xenografts in NOD-SCID IL-2ry^{-/-} mice reconstituted with baboon peripheral blood mononuclear cells. *Xenotransplantation*. 2017;24.
70. Huang F, Cao FL und Zheng SG. Update of humanized animal disease models in studying Graft-versus-host disease. *Hum Vaccin Immunother*. 2018;14:2618–23.
71. Hussen J. Einfluss von konjugierten Linolsäuren (CLA) auf das bovine Immunsystem [Dissertation med. vet]. Hannover: Tierärztliche Hochschule, 2012. 145 S.
72. Ishikawa F, Yasukawa M, Lyons B et al. Development of functional human blood and immune systems in NOD/SCID/IL2 receptor gamma chain(null) mice. *Blood*. 2005;106:1565–73.
73. Ito M, Hiramatsu H, Kobayashi K et al. NOD/SCID/gamma(c)(null) mouse: an excellent recipient mouse model for engraftment of human cells. *Blood*. 2002;100:3175–3182.
74. Ito R, Takahashi T, Katano I und Ito M. Current advances in humanized mouse models. *Cell Mol Immunol*. 2012;9:208–14.
75. Ito T, Tajima F und Ogawa M. Developmental changes of CD34 expression by murine hematopoietic stem cells. *Exp Hematol*. 2000;28:1269–73.
76. Itohara S, Nakanishi N, Kanagawa O, Kubo R und Tonegawa S. Monoclonal antibodies specific to native murine T-cell receptor gamma delta. Analysis of gamma delta T cells during thymic ontogeny and in peripheral lymphoid organs. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1989;86:5094–8.
77. Jagannath S, Reading CL, Dicke KA et al. Clinical application of Percoll gradient-separated bone marrow. *Bone Marrow Transplant*. 1987;1:281–8.
78. Jones MLJ und Allison RW. Evaluation of the Ruminant Complete Blood Cell Count. *Vet Clin North Am Food Anim Pract*. 2007:377–402.
79. Kampen AH, Olsen I, Tollersrud T, Storset AK und Lund A. Lymphocyte subpopulations and neutrophil function in calves during the first 6 months of life. *Vet Immunol Immunopathol*. 2006;113:53–63.
80. Kaufmann SHE. *Basiswissen Immunologie*. 7. Aufl. Springer-Lehrbuch. Berlin: Springer-Verlag, 2014. 138 S.
81. Kim JY, Jeon HB, Yang YS, Oh W und Chang JW. Application of human umbilical cord blood-derived mesenchymal stem cells in disease models. *World J Stem Cells*. 2010;2:34–8.
82. Kimura K, Goff JP, Kehrli Jr. ME und Harp JA. Phenotype Analysis of Peripheral Blood Mononuclear Cells in Periparturient Dairy Cows. *J Dairy Sci*. 1999;82:315–9.
83. King MA, Covassin L, Brehm MA et al. Human peripheral blood leucocyte non-obese diabetic-severe combined immunodeficiency interleukin-2 receptor gamma chain gene mouse model of xenogeneic graft-versus-host-like disease and the role of host major histocompatibility complex. *Clin Exp Immunol*. 2009;157:104–18.

84. King M, Pearson T, Shultz LD et al. A new Hu-PBL model for the study of human islet alloreactivity based on NOD-scid mice bearing a targeted mutation in the IL-2 receptor gamma chain gene. *Clin Immunol.* 2008;126:303–14.
85. Kinniburgh D und Russell NH. Comparative study of CD34-positive cells and subpopulations in human umbilical cord blood and bone marrow. *Bone Marrow Transplant.* 1993;12:489–94.
86. Kirchgessner CU, Patil CK, Evans JW et al. DNA-Dependent Kinase (p350) as a Candidate Gene for the Murine SCID Defect. *Science.* 1995;267:1178–83.
87. Kubota T, Hikono H, Sasaki E und Sakurai M. Sequence of a bovine c-kit proto-oncogene cDNA. *Gene.* 1994;141:305–6.
88. Kurtzberg J, Prasad VK, Carter SL et al. Results of the Cord Blood Transplantation Study (COBLT): clinical outcomes of unrelated donor umbilical cord blood transplantation in pediatric patients with hematologic malignancies. *Blood.* 2008;112:4318–4327.
89. Lai F und Chen Q. Humanized Mouse Models for the Study of Infection and Pathogenesis of Human Viruses. *Viruses.* 2018;10.
90. Leary AG und Ogawa M. Blast cell colony assay for umbilical cord blood and adult bone marrow progenitors. *Blood.* 1987;69:953–6.
91. Leary AG, Ogawa M, Strauss LC und Civin CI. Single cell origin of multilineage colonies in culture. Evidence that differentiation of multipotent progenitors and restriction of proliferative potential of monopotent progenitors are stochastic processes. *J Clin Invest.* 1984;74:2193–7.
92. Lee J, Brehm MA, Greiner D, Shultz LD und Kornfeld H. Engrafted human cells generate adaptive immune responses to *Mycobacterium bovis* BCG infection in humanized mice. *BMC Immunol.* 2013;14:53.
93. MacHugh ND, Mburu JK, Carol MJ, Wyatt CR, Orden JA und Davis WC. Identification of two distinct subsets of bovine yd T cells with unique cell surface phenotype and tissue distribution. *Immunology.* 1997;92:340–5.
94. MacHugh ND und Sopp P. Individual antigens of cattle. Bovine CD8 (BoCD8). *Vet Immunol Immunopathol.* 1991;27:65–9.
95. MacHugh ND, Wijngaard PL, Clevers HC und Davis WC. Clustering of monoclonal antibodies recognizing different members of the WC1 gene family. *Vet Immunol Immunopathol.* 1993;39:155–60.
96. Mackay CR. Sheep leukocyte molecules: a review of their distribution, structure and possible function. *Vet Immunol Immunopathol.* 1988;19:1–20.
97. Mackay CR, Beya MF und Matzinger P. Gamma/delta T cells express a unique surface molecule appearing late during thymic development. *Eur J Immunol.* 1989;19:1477–83.
98. Mackay CR und Hein WR. A large proportion of bovine T cells express the gamma-delta T cell receptor and show a distinct tissue distribution and surface phenotype. *Int Immunol.* 1989;1.

-
99. Marsden MD und Zack JA. Studies of retroviral infection in humanized mice. *Virology*. 2015;479-480:297–309.
 100. Martin FH, Suggs SV, Langley KE et al. Primary structure and functional expression of rat and human stem cell factor DNAs. *Cell*. 1990;63:203–11.
 101. Mayani H und Lansdorp PM. Biology of human umbilical cord blood-derived hematopoietic stem/progenitor cells. *Stem Cells*. 1998;16:153–65.
 102. McClure SJ, Hein WR, Yamaguchi K, Dudler L, Beya MF und Miyasaka M. Ontogeny, morphology and tissue distribution of a unique subset of CD4-CD8-sheep T lymphocytes. *Immunol Cell Biol*. 1989;67 (Pt 4):215–21.
 103. McCune JM, Namikawa R, Kaneshima H, Shultz LD, Lieberman M und Weissman IL. The SCID-hu Mouse: Murine Model for the Analysis of Human Hematolymphoid Differentiation and Function. *Science*. 1988;241:1632–9.
 104. McDermott SP, Eppert K, Lechman ER, Doedens M und Dick JE. Comparison of human cord blood engraftment between immunocompromised mouse strains. *Blood*. 2010;116:193–200.
 105. McGill JL, Sacco RE, Baldwin CL, Telfer JC, Palmer MV und Waters WR. The role of gamma delta T cells in immunity to *Mycobacterium bovis* infection in cattle. *Vet Immunol Immunopathol*. 2014;159:133–43.
 106. Merkwitz C, Pessa-Morikawa T, Lochhead P et al. The CD34 surface antigen is restricted to glucagon-expressing cells in the early developing bovine pancreas. *Histochem Cell Biol*. 2011;135:59–71.
 107. Mertens B, Muriuki C, Muiya P, Andrianarivo A, Mwangi S und Logan-Henfrey L. Bovine stem cell factor. production of a biologically active protein and mRNA analysis in cattle infected with *Trypanosoma congolense*. *Vet Immunol Immunopathol*. 1997;59:65–78.
 108. Meurer DG und Wolf S. *Allgemeine Pathologie. Kompendium für die Veterinärmedizin. 2., neu bearb. u. erw. Aufl., rev. Ausg.* Stuttgart: Schattauer, 2012. Online-Ressource.
 109. Meyerrose TE, Herrbrich P, Hess DA und Nolta JA. Immune-deficient mouse models for analysis of human stem cells. *Biotechniques*. 2003;35:1262–72.
 110. Miller RD, Hogg J, Ozaki JH, Gell D, Jackson SP und Riblet R. Gene for the catalytic subunit of mouse DNA-dependent protein kinase maps to the scid locus. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1995;92:10792–5.
 111. Misharin AV, Haines G, Rose S, Gierut AK, Hotchkiss RS und Perlman H. Development of a new humanized mouse model to study acute inflammatory arthritis. *J Transl Med*. 2012;10:190.
 112. Morrison WI und Davis WC. Individual antigens of cattle. Differentiation antigens expressed predominantly on CD4- CD8- T lymphocytes (WC1, WC2). *Vet Immunol Immunopathol*. 1991;27:71–6.
 113. Mosier DE, Gulizia RJ, Baird SM und Wilson DB. Transfer of a functional human immune system to mice with severe combined immunodeficiency. *Nature*. 1988;335:256–9.

114. Munoz J, Shah N, Rezvani K et al. Concise review: umbilical cord blood transplantation: past, present, and future. *Stem Cells Transl Med.* 2014;3:1435–43.
115. Naessens J, Howard CJ und Hopkins J. Nomenclature and characterization of leukocyte differentiation antigens in ruminants. *Immunol Today.* 1997;18:365–8.
116. Nakahata T und Ogawa M. Hemopoietic colony-forming cells in umbilical cord blood with extensive capability to generate mono- and multipotential hemopoietic progenitors. *J Clin Invest.* 1982;70:1324–8.
117. Namikawa R, Weilbaecher KN, Kaneshima H, Yee EJ und McCune JM. Long-term human hematopoiesis in the SCID-hu mouse. *J Exp Med.* 1990;172:1055–63.
118. Niemeyer GP, Hudson J, Bridgman R, Spano J, Nash RA und Lothrop CD. Isolation and characterization of canine hematopoietic progenitor cells. *Exp Hematol.* 2001;29:686–93.
119. Niku M, Pessa-Morikawa T, Ra R, Ekman A und Iivanainen A. Expression of CD34 mRNA and protein in cattle. *Vet Immunol Immunopathol.* 2007;117:162–72.
120. Norelli M, Camisa B und Bondanza A. Modeling Human Graft-Versus-Host Disease in Immunocompromised Mice. *Methods Mol Biol.* 2016;1393:127–32.
121. Ogawa M, Matsuzaki Y, Nishikawa S et al. Expression and Function of c-kit in Hemopoietic Progenitor Cells. *J Exp Med.* 1991;174:63–71.
122. Ohbo K, Suda T, Hashiyama M et al. Modulation of Hematopoiesis in Mice with a Truncated Mutant of the Interleukin-2 receptor gamma Chain. *Blood.* 1996;87:956–67.
123. Perman V, Dirks VA, Fangmann G et al. Statistical evaluation of lymphocyte values on Minnesota dairy cattle. *Am J Vet Res.* 1970;31:1217–22.
124. Pertoft H. Fractionation of cells and subcellular particles with Percoll. *J Biochem Biophys Methods.* 2000;44:1–30.
125. Pessa-Morikawa T, Niku M und Iivanainen A. Fetal bovine bone marrow is a rich source of CD34+ hematopoietic progenitors with myelo-monocytic colony-forming activity. *Dev Comp Immunol.* 2012;36:572–7.
126. Pflumio F, Lapidot T, Murdoch B, Patterson B und Dick JE. Engraftment of human lymphoid cells into newborn SCID mice leads to graft-versus-host disease. *Int Immunol.* 1993;5:1509–22.
127. Pollock JM und Welsh MD. The WC1+ yd T-cell population in cattle. a possible role in resistance to intracellular infection. Mini-review. *Vet Immunol Immunopathol.* 2002;89:105–14.
128. Raoufi MF, Tajik P, Dehghan MM, Eini F und Barin A. Isolation and differentiation of mesenchymal stem cells from bovine umbilical cord blood. *Reprod Domest Anim.* 2011;46:95–9.
129. Reisbach G, Bartke I, Kempkes B et al. Characterization of hemopoietic cell populations from human cord blood expressing c-kit. *Exp Hematol.* 1993;21:74–9.

130. Robert-Richard E, Ged C, Ortet J et al. Human cell engraftment after busulfan or irradiation conditioning of NOD/SCID mice. *Haematologica*. 2006;91:1384.
131. Rocha V und Gluckman E. Clinical use of umbilical cord blood hematopoietic stem cells. *Biol Blood Marrow Transplant*. 2006;12:34–41.
132. Rodewohl A, Scholbach J, Leichsenring A, Köberle M und Lange F. Age-dependent cellular reactions of the human immune system of humanized NOD scid gamma mice on LPS stimulus. *Innate Immun*. 2017;23:258–75.
133. Rodrigues GC, Oliviera LJ, Monteiro JM et al. Ultrastructural characterization of bovine umbilical cord blood cells. *Pesqui Vet Bras*. 2010;30:897–902.
134. Rogers AN, VanBuren DG, Hedblom E, Tilahun ME, Telfer JC und Baldwin CL. Function of ruminant gammadelta T cells is defined by WC1.1 or WC1.2 isoform expression. *Vet Immunol Immunopathol*. 2005;108:211–7.
135. Rüsse I und Sinowatz F. *Lehrbuch der Embryologie der Haustiere*. 2., unveränd. Aufl. Berlin: Parey Buchverlag, 1998. 478 S.
136. Sakurai M, Furusawa T, Ikeda M et al. Anti-bovine CD34 monoclonal antibody reveals polymorphisms within coding region of the CD34 gene. *Exp Hematol*. 2006;34:905–13.
137. Schnorr B und Kressin M. *Embryologie der Haustiere*. Ein Kurzlehrbuch. 5., neu bearb. Aufl. Stuttgart: Enke Verlag, 2006. IX, 260 S.
138. Scholbach J, Schulz A, Westphal F et al. Comparison of hematopoietic stem cells derived from fresh and cryopreserved whole cord blood in the generation of humanized mice. *PLoS One*. 2012;7:e46772.
139. Schubert HJ, Hadam M und Leibold W. Differenzierungs- und Transplantationsantigene auf der Oberfläche mononukleärer Zellen von Rind, Pferd und Hund. *Tierarztl Prax*. 1991;19:119–22.
140. Schütt C und Bröker B. *Grundwissen Immunologie*. 3. Aufl. Heidelberg: Spektrum Akademischer Verlag, 2011. 281 S.
141. Senogles DR, Paul PS, Johnson DW und Muscoplat CC. Ontogeny of T cells, B cells and Monocytes in the bovine foetus. *Clin Exp Immunol*. 1979:299–303.
142. Shlomchik WD. Graft-versus-host disease. *Nat Rev Immunol*. 2007;7:340–52.
143. Shultz LD, Schweitzer PA, Christianson SW et al. Multiple defects in innate and adaptive immunologic function in NOD/LtSz-scid mice. *J Immunol*. 1995;154:180–191.
144. Shultz LD, Brehm MA, Garcia-Martinez JV und Greiner DL. Humanized mice for immune system investigation: progress, promise and challenges. *Nat Rev Immunol*. 2012;12:786–98.
145. Shultz LD, Ishikawa F und Greiner DL. Humanized mice in translational biomedical research. *Nat Rev Immunol*. 2007;7:118–30.
146. Shultz LD, Lyons BL, Burzenski LM et al. Human lymphoid and myeloid cell development in NOD/LtSz-scid IL2R gamma null mice engrafted with mobilized human hemopoietic stem cells. *J Immunol*. 2005;174:6477–89.

147. Skirecki T, Drechsler S, Hoser G et al. The Fluctuations of Leukocytes and Circulating Cytokines in Septic Humanized Mice Vary With Outcome. *Front Immunol.* 2019;10:1427.
148. Smith RA, Kreeger JM, Alvarez AJ et al. Role of CD8+ and WC-1+ γ/δ T cells in resistance to *Mycobacterium bovis* infection in the SCID-bo mouse. *J Leukoc Biol.* 1999;28–34.
149. Sordillo LM. Nutritional strategies to optimize dairy cattle immunity. *J Dairy Sci.* 2016;99:4967–82.
150. Sousa BR, Parreira RC, Fonseca EA et al. Human Adult Stem Cells from Diverse Origins: An Overview from Multiparametric Immunophenotyping to Clinical Applications. *Cytometry.* 2014;85:43–77.
151. Sowder JT, Chen CL, Ager LL, Chan MM und Cooper MD. A large subpopulation of avian T cells express a homologue of the mammalian T gamma/delta receptor. *J Exp Med.* 1988;167:315–22.
152. Springer T, Galfrè G, Secher DS und Milstein C. Monoclonal xenogeneic antibodies to murine cell surface antigens: identification of novel leukocyte differentiation antigens. *Eur J Immunol.* 1978;8:539–51.
153. Stirtzinger T, Boermans HJ, Croy BA und Johnson R, Hrsg. Successful engraftment of SCID and SCID-beige mice with bovine peripheral blood lymphocytes. Canadian Veterinary Medical Association 42nd Annual Convention (Halifax, Nova Scotia). Research Rostrum Abstracts. 1990.
154. Storset AK, Kulberg S, Berg I, Boysen P, Hope JC und Dissen E. NKp46 defines a subset of bovine leukocytes with natural killer cell characteristics. *Eur J Immunol.* 2004;34:669–76.
155. Sutherland DR, Keating A, Nayar R, Anania S und Stewart AK. Sensitive detection and enumeration of CD34+ cells in peripheral and cord blood by flow cytometry. *Exp Hematol.* 1994;22:1003–10.
156. Szilvassy SJ. The biology of hematopoietic stem cells. *Arch Med Res.* 2003;34:446–60.
157. Teale AJ, Baldwin CL, Morrison WI, Ellis J und MacHugh ND. Phenotypic and Functional Characteristics of Bovine T Lymphocytes. *Vet Immunol Immunopathol.* 1987;17:113–23.
158. Telfer JC und Baldwin CL. Bovine gamma delta T cells and the function of gamma delta T cell specific WC1 co-receptors. *Cell Immunol.* 2015;296:76–86.
159. Tennant B, Harrold D, Reina-Guerra M, Kendrick JW und Laben RC. Hematology of the neonatal calf. erythrocyte and leukocyte values of normal calves. *Cornell Vet.* 1974;64:516–32.
160. Thilaganathan B, Nicolaidis KH und Morgan G. Subpopulations of CD34-positive haemopoietic progenitors in fetal blood. *Br J Haematol.* 1994;87:634–6.
161. Trowbridge IS. Interspecies spleen-myeloma hybrid producing monoclonal antibodies against mouse lymphocyte surface glycoprotein, T200. *J Exp Med.* 1978;148:313–323.

-
162. Urban-Chmiel R, Lisiecka U, Chłopaś A, Kurek L und Wernicki A. The influence of selected techniques of bovine leukocyte isolation on their viability and metabolism. *Pol J Vet Sci.* 2011;14:663–5.
 163. Walker ID, Glew MD, O’Keeffe MA et al. A novel multi-gene family of sheep gamma delta T cells. *Immunology.* 1994;83:517–23.
 164. Watanabe S, Terashima K, Ohta S et al. Hematopoietic stem cell-engrafted NO-D/SCID/IL2Rgamma null mice develop human lymphoid systems and induce long-lasting HIV-1 infection with specific humoral immune responses. *Blood.* 2007;109:212–8.
 165. Weiss DJ, Kraemer R und Schmit K. Isolation of Granulocytes and Mononuclear Cells from the Blood of Dogs, Cats, Horses and Cattle. *Vet Clin Pathol.* 1989;18:33–6.
 166. Wijngaard PL, Metzelaar MJ, MacHugh ND, Morrison WI und Clevers HC. Molecular characterization of the WC1 antigen expressed specifically on bovine CD4-CD8- gamma delta T lymphocytes. *J Immunol.* 1992;149:3273–7.
 167. Wilkie BN. Review of Bovine Immunology for the Veterinary Practitioner. *Can Vet J.* 1974;15:243–8.
 168. Wilson RA, Zolnai A, Rudas P und Frenyo LV. T-cell subsets in blood and lymphoid tissues obtained from fetal calves, maturing calves, and adult bovine. *Vet Immunol Immunopathol.* 1996;53:49–60.
 169. Wittwer F und Bohmwald H. Leukocyte count in normal female Friesian cattle of various ages in the Valdivia Area, Chile. *Arch Med Vet.* 1974;6.
 170. Wyatt CR, Brackett EJ, Perryman LE und Davis WC. Identification of yd T lymphocyte subsets that populate calf ileal mucosa after birth. *Vet Immunol Immunopathol.* 1996;52:91–103.
 171. Wyatt CR, Madruga C, Cluff C et al. Differential distribution of yd T-cell receptor lymphocyte subpopulations in blood and spleen of young and adult cattle. *Vet Immunol Immunopathol.* 1994;40:187–99.
 172. Yarden Y, Kuang WJ, Yang-Feng T et al. Human proto-oncogene c-kit: a new cell surface receptor tyrosine kinase for an unidentified ligand. *EMBO J.* 1987;6:3341–3351.
 173. Zhang B, Duan Z und Zhao Y. Mouse models with human immunity and their application in biomedical research. *J Cell Mol Med.* 2009;13:1043–58.
 174. Zhou JH, Hikono H, Ohta M und Sakurai M. Cloning of Bovine CD34 cDNA. *J Vet Med Sci.* 2001;63:1051–3.

ANHANG A

Anhang

A.0.1 Tätowierschema

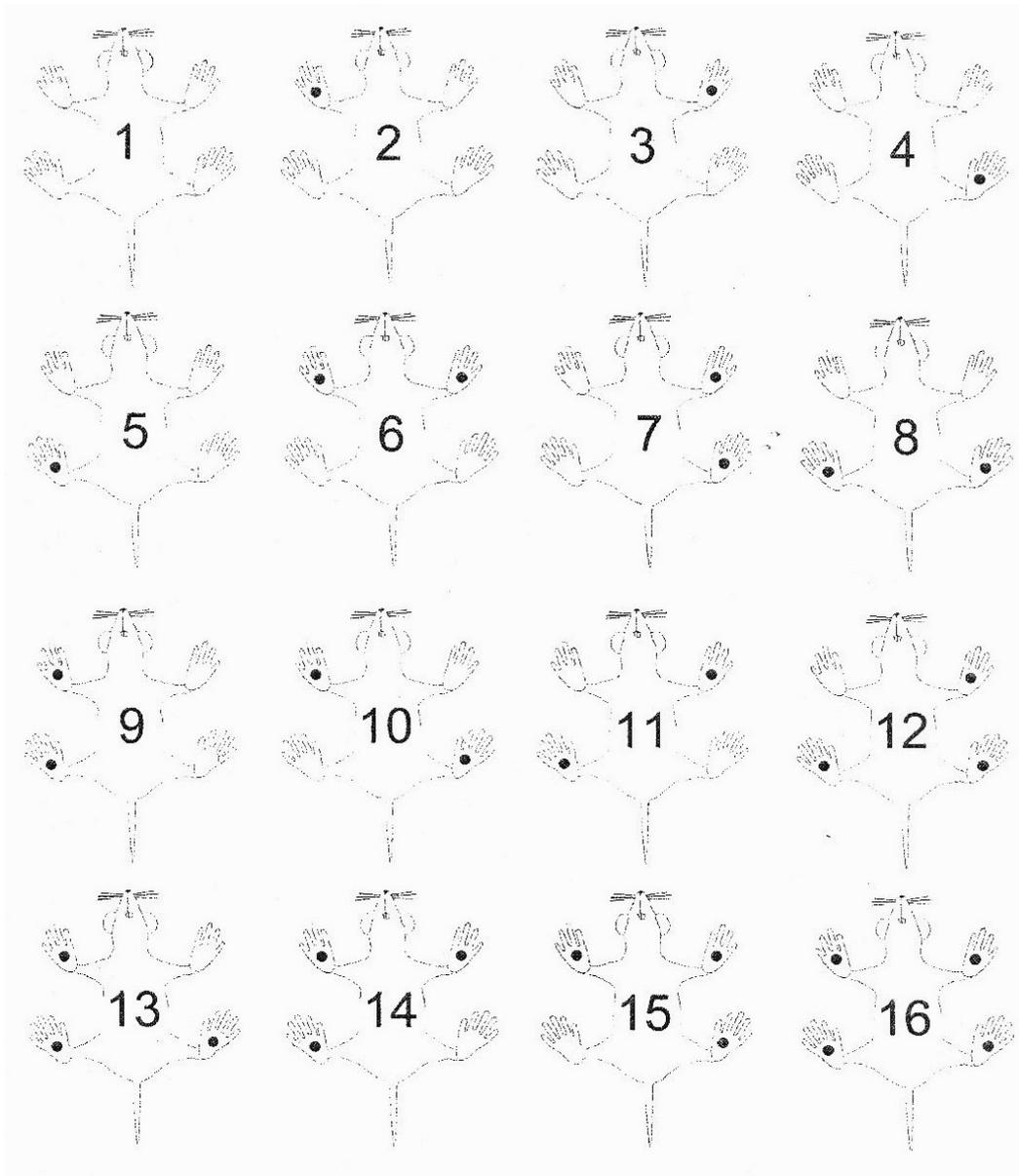


Abb. 26: Tätowierschema der verwendeten Versuchstiere. Um die eindeutige Zuordnung insbesondere neugeborener Mäuse zu gewährleisten, wurden diesen gemäß dargestelltem Schema die Pfoteninnenflächen markiert (siehe Kapitel 3.6.3).

A.0.2 Mittels T-Zell-Depletion isolierte Zellfraktionen

Tab. 12: Zusammenfassung der Höhe der aus den bovinen Proben mittels T-Zell-Depletion isolierten Stammzell-enthaltenden Fraktionen (SeFs) sowie der Anzahl der daraus rechnerisch resultierenden T-Lymphozyten (Probennummern 1 bis 8: bovines Nabelschnurblut; Probe Nummer 9: bovines peripheres Blut); siehe Kapitel 4.2.2

Probe	Zellzahl der isolierten SeF, vital	Zellzahl der depletierten T-Lymphozyten, rechnerisch
1	$5,94 \times 10^6$	$1,38 \times 10^7$
2	$1,06 \times 10^7$	$1,06 \times 10^7$
3	$9,0 \times 10^6$	$1,44 \times 10^7$
4	$1,48 \times 10^7$	$1,28 \times 10^7$
5	$9,8 \times 10^6$	$2,31 \times 10^7$
6	$5,6 \times 10^6$	$9,50 \times 10^6$
7	$3,74 \times 10^6$	$1,66 \times 10^7$
8	$5,0 \times 10^6$	$3,21 \times 10^7$
9	$3,36 \times 10^7$	$9,99 \times 10^7$

A.0.3 Versuchsgruppe A - Blutbild

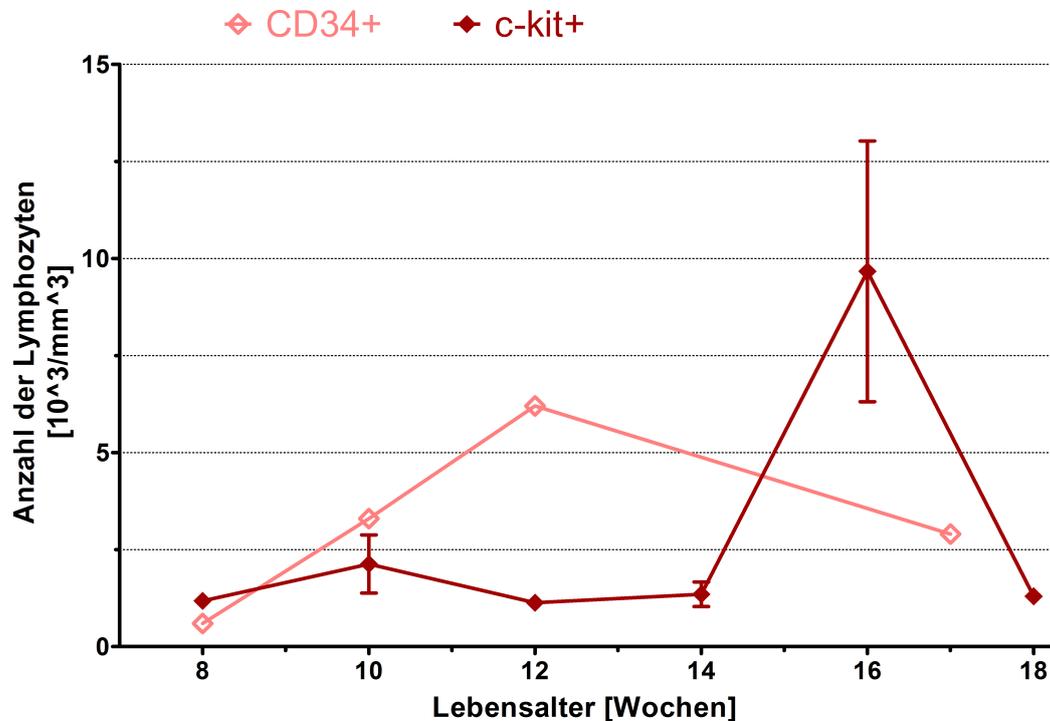


Abb. 27: Entwicklung der Anzahl der Lymphozyten im peripheren Blut der Mäuse der Versuchsgruppe A während des Versuchszeitraumes. Eine Maus wurde neugeboren mit bovinen CD34-positiven Zellen transplantiert (CD34+). Vier Mäusen wurden neugeboren bovine c-kit-positiv Zellen transplantiert (c-kit+). Die Blutentnahme erfolgte in zweiwöchigem Abstand. Die Anzahl der Lymphozyten wurde mittels Analysegerät (scil Vet abc) bestimmt. Die Zahl der Lymphozyten der mit c-kit-positiven Zellen transplantierten Mäuse entwickelte sich vor allem zu Beginn des Versuches konstant. In Richtung Versuchsende wurde eine starke Zunahme der Werte festgestellt. Bei der mit bovinen CD34-positiven Zellen transplantierten Maus stieg die Zahl der Lymphozyten zu Beginn des Versuches an und nahm am Versuchsende geringfügig ab. Mittelwert \pm SEM. Statistisch nicht auswertbar. n = 1 (CD34+); n = 4 (c-kit+); vgl. Kapitel 4.3.1.2.

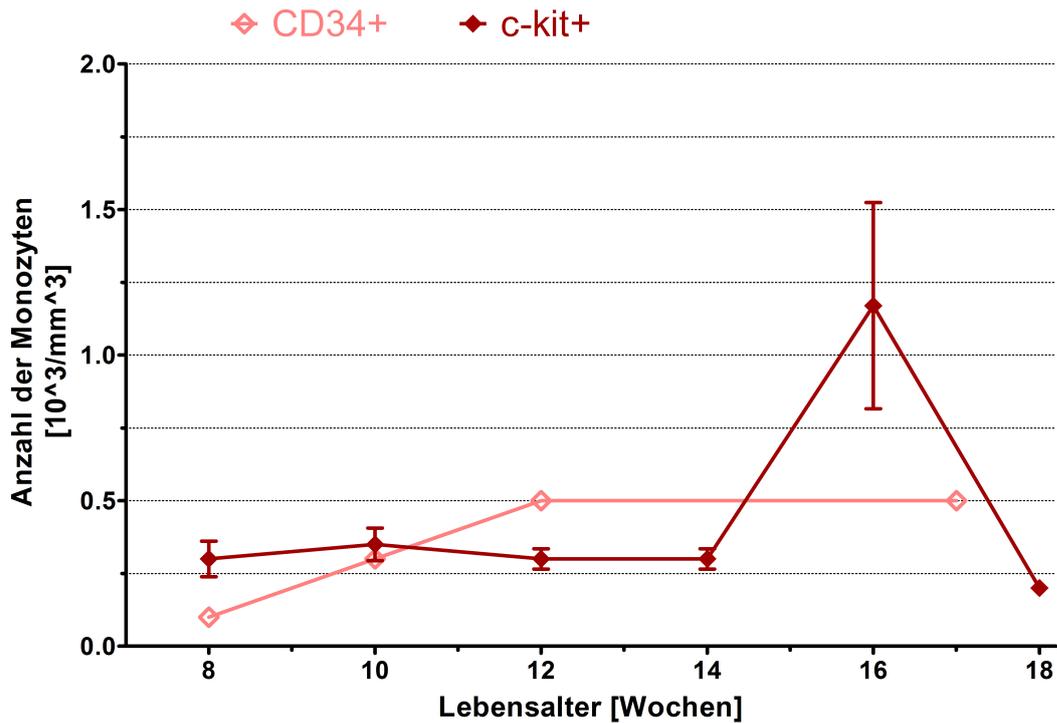


Abb. 28: Entwicklung der Anzahl der Monozyten im peripheren Blut der Mäuse der Versuchsgruppe A während des Versuchszeitraumes. Eine Maus wurde neugeboren mit bovinen CD34-positiven Zellen transplantiert (CD34+). Vier Mäusen wurden neugeborene bovine c-kit-positiv Zellen transplantiert (c-kit+). Die Blutentnahme erfolgte in zweiwöchigem Abstand. Die Anzahl der Monozyten wurde mittels Analysegerät (scil Vet abc) bestimmt. Die Zahl der Monozyten der mit c-kit-positiven Zellen transplantierten Mäuse entwickelte sich vor allem zu Beginn des Versuches konstant. In Richtung Versuchsende wurde eine starke Zunahme der Werte festgestellt. Bei der mit bovinen CD34-positiven Zellen transplantierten Maus stieg die Zahl der Monozyten zu Beginn des Versuches an und nahm am Versuchsende geringfügig ab. Mittelwert \pm SEM. Statistisch nicht auswertbar. n = 1 (CD34+); n = 4 (c-kit+); vgl. Kapitel 4.3.1.2.

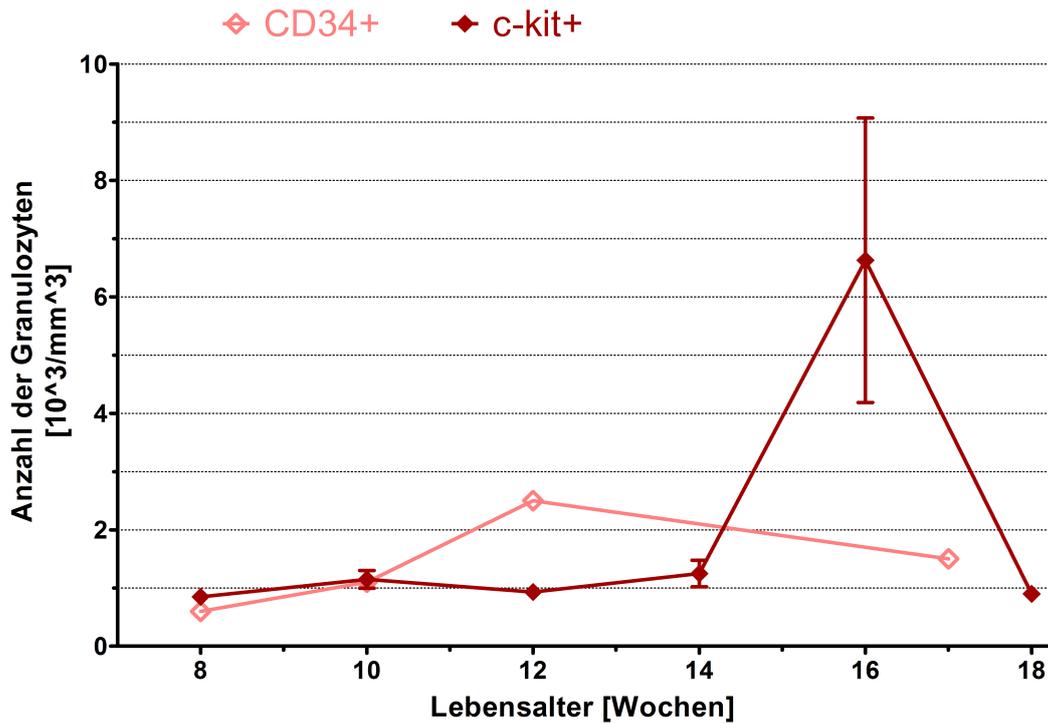


Abb. 29: Entwicklung der Anzahl der Granulozyten im peripheren Blut der Mäuse der Versuchsgruppe A während des Versuchszeitraumes. Eine Maus wurde neugeboren mit bovinen CD34-positiven Zellen transplantiert (CD34+). Vier Mäusen wurden neugeboren bovine c-kit-positive Zellen transplantiert (c-kit+). Die Blutentnahme erfolgte in zweiwöchigem Abstand. Die Anzahl der Granulozyten wurde mittels Analysegerät (scil Vet abc) bestimmt. Die Zahl der Granulozyten der mit c-kit-positiven Zellen transplantierten Mäuse entwickelte sich vor allem zu Beginn des Versuches konstant. In Richtung Versuchsende wurde eine starke Zunahme der Werte festgestellt. Bei der mit bovinen CD34-positiven Zellen transplantierten Maus stieg die Zahl der Granulozyten zu Beginn des Versuches an und nahm am Versuchsende geringfügig ab. Mittelwert \pm SEM. Statistisch nicht auswertbar. n = 1 (CD34+); n = 4 (c-kit+); vgl. Kapitel 4.3.1.2.

Tab. 13: Übersicht über die Höhe der im Blut der Mäuse der Versuchsgruppe A bestimmten erythrozytären Werte im Versuchszeitraum; n = 1 (CD34+); n = 4 (c-kit+); Analysegerät: scil Vet abc; siehe Kapitel 3.7 und 4.3.1.2

	<i>Lebensalter</i> [Wo- chen]	RBC [10 ⁶ / mm ³]	HGB [g/dl]	HCT [%]	PLT [10 ³ / mm ³]	MCV [μm ³]	MCH [pg]	MCHC [g/ dl]	RDW [%]	MPV [μm ³]
1 (CD- 34+)	8	6,85	13,3	37,9	1290	55	19,4	35,1	14,2	5,5
	10	7,49	14,6	41,8	892	56	19,5	35,0	13,7	5,8
	12	7,37	13,4	40,2	591	55	18,1	33,2	14,0	6,0
	17	8,86	15,8	47,9	790	54	17,9	33,0	14,0	5,9
2 (c- kit+)	8	7,15	13,5	40,0	676	56	18,9	33,8	13,5	5,5
	10	7,46	14,1	41,3	888	55	18,9	34,1	14,0	5,4
	12	7,35	13,5	40,4	1025	55	18,4	33,5	14,2	5,4
	14	8,14	14,3	44,5	680	55	17,6	32,1	13,7	5,8
	16	11,73	20,7	65,9	538	56	17,7	31,5	14,3	6,6
3 (c- kit+)	8	7,88	14,5	42,9	867	54	18,4	33,8	13,5	5,4
	10	8,25	14,7	44,9	1120	54	17,8	32,8	13,9	5,3
	12	6,61	12,4	35,1	1273	53	18,8	35,4	14,0	5,4
	14	7,8	13,5	41,6	1143	53	17,4	32,6	14,0	5,3
	16	11,63	20,1	64,0	371	55	17,3	31,5	14,5	7,0
4 (c- kit+)	8	8,02	14,4	43,5	900	54	18,0	33,1	13,6	5,3
	10	7,35	13,9	39,8	538	54	19,0	35,0	13,9	5,9
	12	6,92	12,4	37,4	765	54	18,0	33,2	14,1	5,4
	14	7,9	14,5	43,0	684	55	18,4	33,7	14,5	5,3
	16	7,33	13,5	40,0	683	55	18,4	33,8	14,3	5,5
	18	7,34	13,5	40,5	663	55	18,4	33,4	14,5	5,6
5 (c- kit+)	8	7,67	14,1	42,2	1059	55	18,4	33,4	13,8	5,6
	10	7,01	13,5	38,3	668	55	19,2	35,2	14,1	6,0
	12	6,71	12,4	36,0	531	54	18,4	34,3	14,1	5,7
	14	8,34	14,8	44,5	1022	53	17,7	33,2	13,6	5,2

A.0.4 Versuchsgruppe B - Blutbild

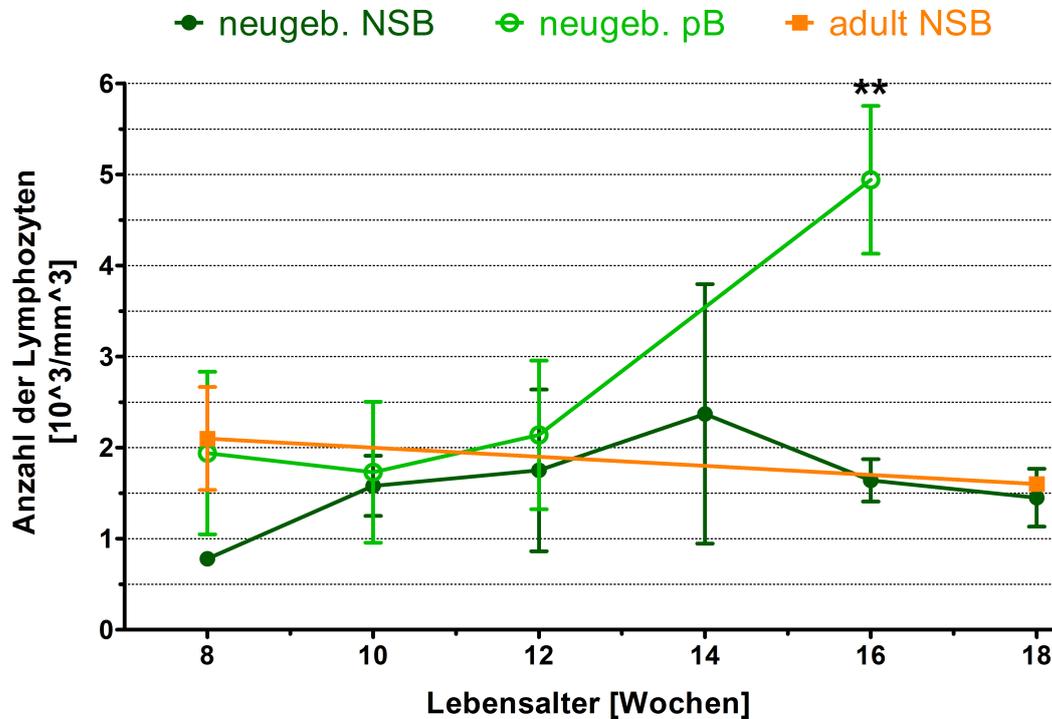


Abb. 30: Entwicklung der Anzahl der Lymphozyten im peripheren Blut der Mäuse der Versuchsgruppe B während des Versuchszeitraumes. Den Mäusen wurden neugeboren bzw. adult die mittels negativer Selektion von der T-Zell-Fraktion befreiten Stammzell-enthaltenden Zellfraktionen aus bovinem Nabelschnurblut (neugeb. NSB; adult NSB) bzw. bovinem peripherem Blut (neugeb. pB) transplantiert. Die Blutentnahme erfolgte in zweiwöchigem Abstand. Die Anzahl der Lymphozyten wurde mittels Analysegerät (scil Vet abc) bestimmt. Unterschiede zwischen den Versuchsgruppen sind mit ** gekennzeichnet. Mittelwert \pm SEM; Auswertung mittels Mann-Whitney-Test, ** $p \leq 0,01$; neugeb. NSB gegen neugeb. pB; adult NSB nicht statistisch auswertbar. $n = 8-10$ (neugeb. NSB); $n = 7$ (neugeb. pB); $n = 1-2$ (adult NSB); vgl. Kapitel 4.3.2.2.

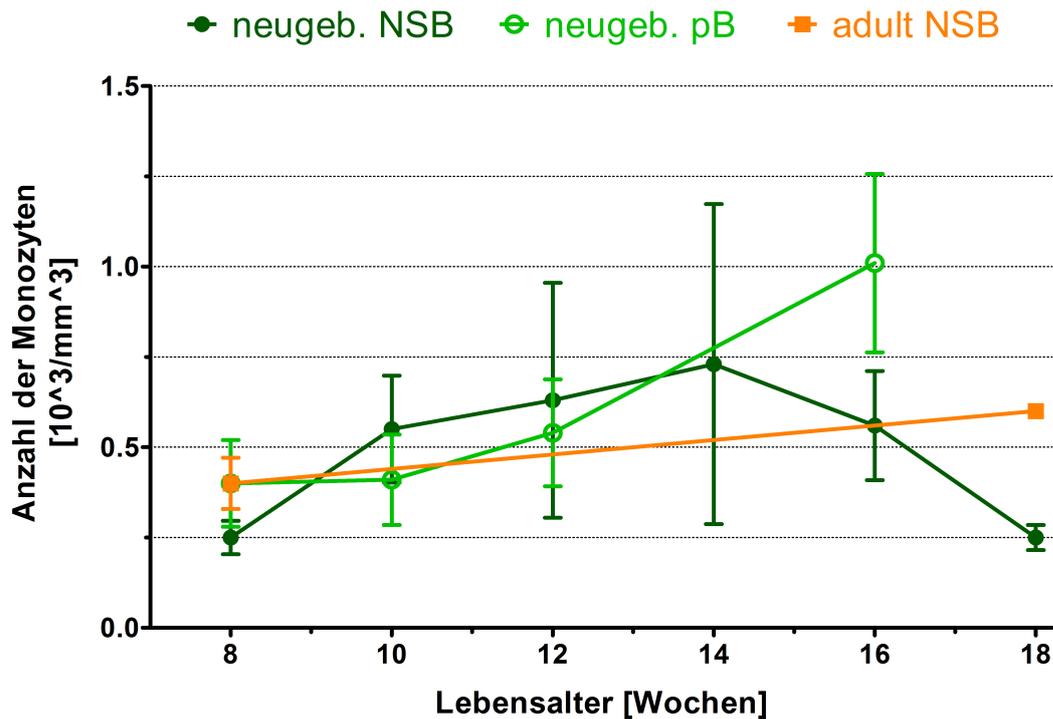


Abb. 31: Entwicklung der Anzahl der Monozyten im peripheren Blut der Mäuse der Versuchsgruppe B während des Versuchszeitraumes. Den Mäusen wurden neugeborenen bzw. adult die mittels negativer Selektion von der T-Zell-Fraktion befreiten Stammzell-enthaltenden Zellfraktionen aus bovinem Nabelschnurblut (neugeb. NSB; adult NSB) bzw. bovinem peripherem Blut (neugeb. pB) transplantiert. Die Blutentnahme erfolgte in zweiwöchigem Abstand. Die Anzahl der Monozyten wurde mittels Analysegerät (scil Vet abc) bestimmt. Die Werte der neugeborenen transplantierten Mäuse (neugeb. NSB; neugeb. pB) wiesen während des gesamten Versuches keine signifikanten Unterschiede auf. Mittelwert \pm SEM; Auswertung mittels Mann-Whitney-Test; neugeb. NSB gegen neugeb. pB; adult NSB nicht statistisch auswertbar. $n = 8-10$ (neugeb. NSB); $n = 7$ (neugeb. pB); $n = 1-2$ (adult NSB); vgl. Kapitel 4.3.2.2.

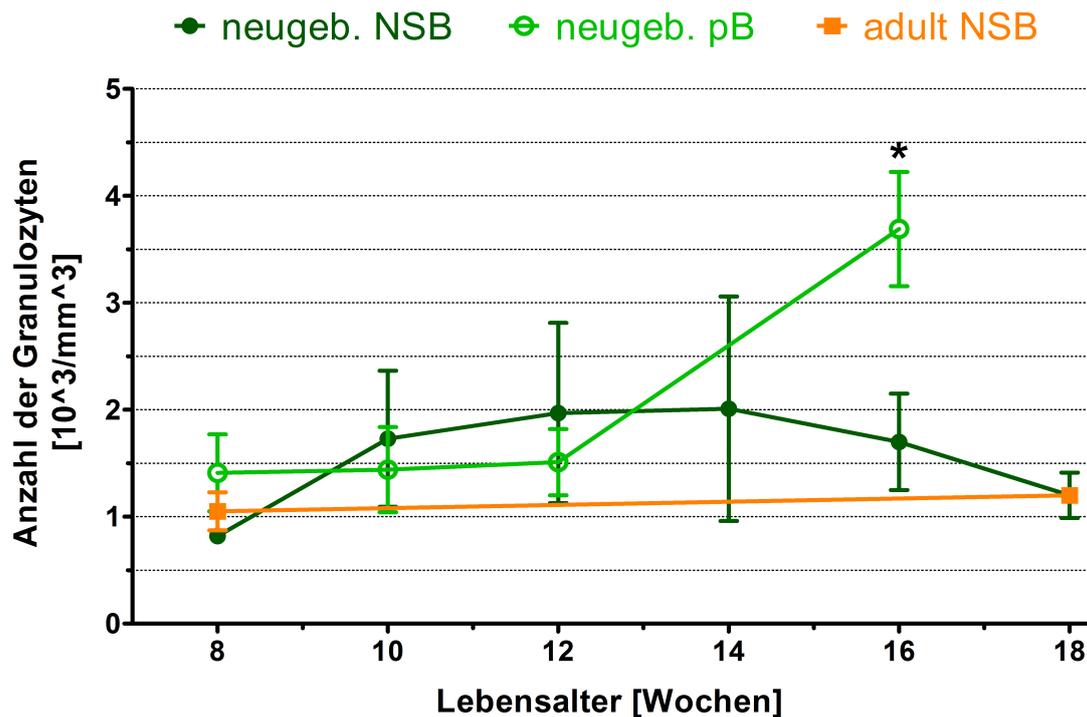


Abb. 32: Entwicklung der Anzahl der Granulozyten im peripheren Blut der Mäuse der Versuchsgruppe B während des Versuchszeitraumes. Den Mäusen wurden neugeboren bzw. adult die mittels negativer Selektion von der T-Zell-Fraktion befreiten Stammzell-enthaltenden Zellfraktionen aus bovinem Nabelschnurblut (neugeb. NSB; adult NSB) bzw. bovinem peripherem Blut (neugeb. pB) transplantiert. Die Blutentnahme erfolgte in zweiwöchigem Abstand. Die Anzahl der Granulozyten wurde mittels Analysegerät (scil Vet abc) bestimmt. Unterschiede zwischen den Versuchsgruppen sind mit * gekennzeichnet. Mittelwert \pm SEM; Auswertung mittels Mann-Whitney-Test, * $p \leq 0,05$; neugeb. NSB gegen neugeb. pB; adult NSB nicht statistisch auswertbar. $n = 8-10$ (neugeb. NSB); $n = 7$ (neugeb. pB); $n = 1-2$ (adult NSB); vgl. Kapitel 4.3.2.2.

Tab. 14: Übersicht über die Höhe der im Blut der Mäuse der Versuchsgruppe B bestimmten erythrozytären Werte im Versuchszeitraum - Untergruppe neugeb.NSB (n = 10); Analysegerät: scil Vet abc; siehe Kapitel 3.7 und 4.3.2.2

	<i>Lebensalter</i> [Wo- chen]	RBC [10 ⁶ / mm ³]	HGB [g/dl]	HCT [%]	PLT [10 ³ / mm ³]	MCV [μm ³]	MCH [pg]	MCHC [g/ dl]	RDW [%]	MPV [μm ³]
1	10	6,85	13,7	36,9	866	54	20,0	37,2	13,3	5,5
	14	8,79	16,1	46,8	760	53	18,3	34,4	13,4	5,3
	16	6,61	12,5	34,5	861	52	19,0	36,4	13,1	5,1
	18	8,76	14,7	46,2	734	53	16,7	31,8	13,9	5,4
2	4	4,32	9,1	25,0	277	58	21,0	36,4	17,8	7,3
3	10	6,57	12,8	37,3	884	57	19,5	34,4	14,7	6,1
4	4	4,75	9,0	26,4	197	56	18,9	33,9	17,2	7,0
5	8	7,82	15,0	43,9	851	56	19,2	34,1	14,3	5,6
	10	6,95	13,3	39,0	1053	56	19,1	34,0	14,1	5,3
	12	7,02	13,6	39,6	940	56	19,3	34,3	14,0	5,2
	14	7,18	13,7	41,4	1151	58	19,1	33,1	14,2	5,6
6	8	7,96	14,8	43,9	811	55	18,6	33,7	13,9	5,4
	10	7,7	14,1	42,2	1039	55	18,3	33,3	13,9	5,3
	12	6,56	12,4	36,1	1115	55	18,8	34,3	13,6	5,2
	14	8,01	15,3	44,0	957	55	19,1	34,7	13,8	5,3
	16	7,42	13,8	41,2	972	56	18,6	33,5	13,8	5,5
7	8	7,58	14,3	42,7	731	56	18,9	33,6	13,7	5,6
	10	7,79	14,1	43,1	1063	55	18,0	32,6	13,6	5,3
	12	7,07	13,3	38,7	955	55	18,8	34,4	13,2	5,2
	14	9,69	17,5	53,3	633	55	18,1	32,9	13,7	5,4
	16	7,13	13,3	39,6	1212	55	18,6	33,6	14,1	5,5
8	8	7,06	13,3	39,2	622	55	18,8	33,9	14,2	5,6
	10	7,5	13,9	41,6	1046	56	18,6	33,5	14,2	5,2
	12	6,85	12,8	37,3	971	54	18,7	34,3	13,8	5,3
	14	7,54	14,0	40,9	1085	54	18,5	34,1	14,0	5,3
	16	7,16	13,7	39,3	942	55	19,1	34,8	14,1	5,5

Fortsetzung der Tabelle 14:

	<i>Lebensalter</i> [Wochen]	RBC [10 ⁶ /- mm ³]	HGB [g/dl]	HCT [%]	PLT [10 ³ /- mm ³]	MCV [μ m ³]	MCH [pg]	MCHC [g/ dl]	RDW [%]	MPV [μ m ³]
9	8	8,09	14,6	44,9	671	56	18,0	32,5	14,2	5,6
	10	7,75	14,2	42,5	984	55	18,3	33,3	13,8	5,3
	12	7,32	13,1	40,2	1057	55	18,0	32,7	13,7	5,2
	14	6,8	12,6	37,3	880	55	18,5	33,7	14,0	5,3
	16	6,92	12,6	36,2	948	52	18,1	34,7	13,9	5,3
	18	7,53	13,8	40,5	953	54	18,3	34,0	14,1	5,2
10	8	8,92	16,3	49,3	840	55	18,3	33,1	13,2	5,4
	10	7,42	13,3	40,0	1217	54	17,9	33,3	13,6	5,3
	12	7,12	13,2	38,5	1187	54	18,5	34,3	14,4	5,3
	14	8,18	15,0	44,6	1499	54	18,4	33,8	14,8	5,3
	16	8,94	16,0	49,1	864	55	17,9	32,6	14,6	5,7

Tab. 15: Übersicht über die Höhe der im Blut der Mäuse der Versuchsgruppe B bestimmten erythrozytären Werte im Versuchszeitraum - Untergruppe neugeb.pB (n = 7); Analysegerät: scil Vet abc; siehe Kapitel 3.7 und 4.3.2.2

	<i>Lebensalter</i> [Wo- chen]	RBC [10 ⁶ / mm ³]	HGB [g/dl]	HCT [%]	PLT [10 ³ / mm ³]	MCV [μm ³]	MCH [pg]	MCHC [g/ dl]	RDW [%]	MPV [μm ³]
1	8	7,5	14,4	43,0	1206	58	19,3	33,6	13,2	4,9
	10	7,5	14,0	43,1	1316	57	18,6	32,4	13,5	4,9
	12	7,5	14,4	43,0	1331	57	19,2	33,4	14,0	4,7
	16	7,58	14,8	43,0	669	57	19,5	34,3	13,9	5,8
2	8	8,0	14,8	45,1	827	56	18,5	32,8	12,4	5,6
	10	7,2	13,4	40,4	1328	56	18,6	33,1	13,3	4,8
	12	7,9	14,4	43,7	1244	56	18,4	33,0	13,6	4,8
	16	8,84	15,6	49,5	58	56	17,7	31,6	13,7	7,1
3	8	7,9	14,2	44,4	1283	56	18,0	31,9	12,9	5,1
	10	7,8	14,0	43,9	1362	56	18,0	32,0	13,5	5,0
	12	8,2	14,7	46,0	1445	56	17,9	31,9	13,8	4,8
	16	8,01	13,8	44,1	109	55	17,3	31,3	15,0	7,2
4	8	7,1	13,4	40,1	1505	56	18,9	33,5	13,2	5,0
	10	7,4	13,4	41,5	1471	56	18,2	32,3	14,0	5,6
	12	7,4	13,6	42,3	1603	57	18,3	32,1	14,7	5,1
	16	7,92	14,2	45,5	71	57	17,9	31,1	14,5	6,6
5	8	7,6	14,4	43,1	1070	57	18,9	33,3	13,5	4,9
	10	7,3	13,6	42,1	1111	57	18,5	32,3	14,1	5,0
	12	8,0	14,8	46,2	936	58	18,5	32,1	14,1	5,2
	16	7,41	13,8	42,4	141	57	18,6	32,6	14,5	6,7
6	8	7,4	13,8	42,5	994	58	18,7	32,5	13,1	4,9
	10	8,6	15,3	50,4	1176	59	18,0	30,5	14,1	5,0
	12	8,2	15,3	47,8	1191	58	18,6	31,9	13,6	4,9
	16	7,91	14,2	45,3	109	57	17,9	31,3	13,7	6,6

Fortsetzung der Tabelle 15:

	<i>Lebensalter</i> [Wochen]	RBC [10 ⁶ /-mm ³]	HGB [g/dl]	HCT [%]	PLT [10 ³ /-mm ³]	MCV [μm ³]	MCH [pg]	MCHC [g/ dl]	RDW [%]	MPV [μm ³]
7	8	7,6	14,4	43,6	1060	57	18,9	33,1	13,6	5,0
	10	7,4	13,9	43,0	1135	58	18,7	32,4	13,8	4,8
	12	7,0	13,1	40,7	1179	58	18,7	32,1	13,8	4,8
	16	7,82	14,1	44,8	115	57	18,0	31,4	13,3	6,5

Tab. 16: Übersicht über die Höhe der im Blut der Mäuse der Versuchsgruppe B bestimmten erythrozytären Werte im Versuchszeitraum - Untergruppe adult NSB (n = 2); Analysegerät: scil Vet abc; siehe Kapitel 3.7 und 4.3.2.2

	<i>Lebensalter</i> [Wochen]	RBC [10 ⁶ /-mm ³]	HGB [g/dl]	HCT [%]	PLT [10 ³ /-mm ³]	MCV [μm ³]	MCH [pg]	MCHC [g/ dl]	RDW [%]	MPV [μm ³]
1	8	7,74	14,9	42,6	660	55	19,2	35,0	13,4	6,2
	12	4,88	9,5	26,2	76	54	19,5	36,4	14,2	7,4
	14	5,09	10,9	31,4	171	62	21,5	34,8	17,2	7,8
	18	7,3	14,2	41,6	880	57	19,5	34,1	13,9	5,7
2	8	7,6	14,9	41,8	336	55	19,6	35,6	13,6	6,6
	12	0,89	2,9	4,8	35	53	33,0	61,8	12,6	7,5

Danksagung

Ich möchte mich hiermit ganz herzlich bei allen Personen bedanken, die mich auf dem Weg bis zu der hier vorliegenden Dissertation begleitet und unterstützt haben.

Zuallererst bedanke ich mich bei Herrn Prof. Dr. Dr. Thomas Vahlenkamp für die Bereitstellung des spannenden und praxisnahen Themas sowie für die geduldige Betreuung und Begleitung meiner Arbeit.

Mein herzlicher Dank gilt im Weiteren den Mitarbeitern und Mitarbeiterinnen der Arbeitsgruppe Entzündungsmodelle und Immundiagnostik des Fraunhofer-Institutes für Zelltherapie und Immunologie IZI in Leipzig. Mein besonderer Dank gilt hier Frau Dr. Franziska Lange für die Möglichkeit, die Arbeiten im Fraunhofer-Institut in Leipzig durchzuführen und für die wertvolle fachliche Unterstützung bei der Erstellung der Arbeit. Ausdrücklich bedanken möchte ich mich auch bei Frau Dr. Anna Leichsenring. Mit ihrer fachlichen Expertise und ihrer Geduld hat sie maßgeblich zum vorliegenden Ergebnis beigetragen. Zudem danke ich ganz herzlich Anja Rodewohl, Dr. Margarethe Köberle, Viktoria Storbeck, Tamara Shahmary, Dr. Ingo Bäcker und Eva Kendzia für die lehrreiche Zusammenarbeit und bereitwillige Unterstützung. Als „FACS-Experten“ danke ich vielmals Manuela Ackermann und Oliver Pelz-Ackermann für die unersetzlichen Einblicke in das Gebiet der Durchflusszytometrie.

Für die Bereitstellung von Probenmaterial möchte ich Herrn Prof. Dr. Markus Freick, den Mitarbeitern der Ambulatorischen und Geburtshilflichen Tierklinik in Leipzig und Frau Dr. Jana Pürzel vom Veterinäramt im Schlachtbetrieb Südost Fleisch GmbH in Altenburg meinen allerherzlichsten Dank aussprechen. Ohne die unmittelbare Unterstützung und ohne das Ermöglichen der Probeentnahmen wäre die vorliegende Arbeit nicht realisierbar gewesen.

Zudem danke ich Herrn Dr. Michiharu Sakurai vom National Institute of Agrobiological Sciences in Japan für die äußerst bereitwillige und unkomplizierte Übersendung von Antikörperproben.

Danken möchte ich außerdem ganz herzlich meinen Arbeitskollegen und Kolleginnen aus dem Veterinäramt im Landkreis Harz für Ihre fortwährende Unterstützung bei der Erstellung der vorliegenden Arbeit. Ausdrücklich danken möchte ich an dieser Stelle Herrn Dr. Rainer Miethig sowie Frau DVM Christine Sapandowski, ohne deren Verständnis und Mithilfe die Fertigstellung deutlich mehr Zeit in Anspruch genommen hätte.

Nicht zuletzt gilt mein tiefer Dank meiner Familie, vor allem meinen Eltern und Andreas. Meinem Papa danke ich besonders für die notwendigen „Denkanstöße“ und den damit verbundenen langen Atem. Ein riesiges Dankeschön geht auch an meine Mama, die mir nicht nur mit Zuversicht und Optimismus sondern auch mit wertvoller Kritik und ihrer fachlichen Einschätzung beiseite stand. Andreas danke ich vor allem für das Verständnis, den unentbehrlichen emotionalen Beistand sowie für die unermüdliche Erinnerung an den Silberstreif am Horizont. Es war eine lange Reise. Ich danke euch von ganzem Herzen, dass ihr mich dabei unterstützt habt.