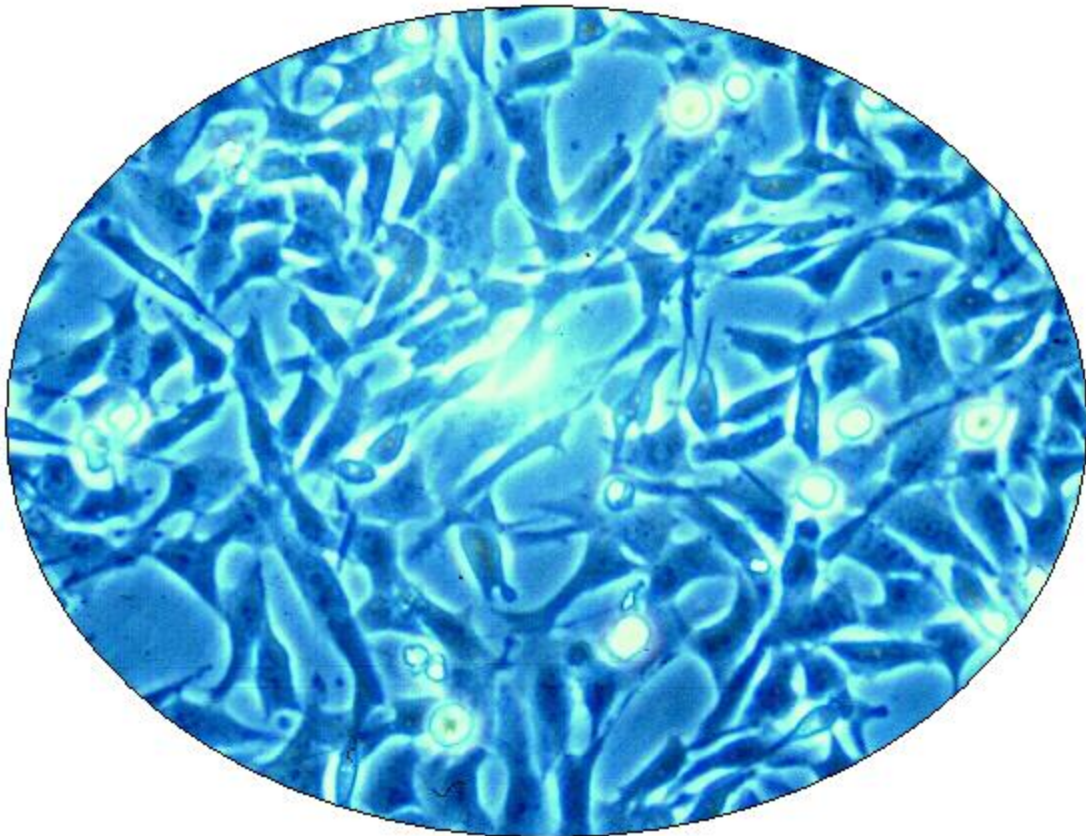


Einfluss von Immunsuppressiva auf das biologisch-immunologische Verhalten von Stammzellen in vitro



Uwe Sassen



Fakultät für Medizin

Einfluss von Immunsuppressiva auf das biologisch-immunologische Verhalten von Stammzellen in vitro

Uwe Andreas Sassen

Vollständiger Abdruck der von der
Fakultät für Medizin
der Technischen Universität München zur Erlangung des akademischen Grades
eines Doktors der Medizin
genehmigten Dissertation.

Vorsitzender: Prof. Dr. Ernst J. Rummeny

Prüfer der der Dissertation:

1. Priv.-Doz. Dr. Manfred Stangl
2. Prof. Dr. Bernhard Holzmann

Die Dissertation wurde am 02.11.2016 bei der Technischen Universität München eingereicht und durch die Fakultät für Medizin am 03.01.2018 angenommen.

Inhaltsverzeichnis:

	Seite:
Abkürzungsverzeichnis	5
1. Einleitung und Zielsetzung	7
1.1 Einführung	7
1.2 Stammzellen	7
1.2.1 Hämatopoetische Stammzellen	8
1.2.2 Quellen hämatopoetischer Stammzellen	10
1.2.3 In vitro Anreicherung von Stammzellen	11
1.2.4 CD34- Stammzellen und ihre Biologie	12
1.2.5 Der „Stammzell Zyklus“	14
1.2.6 Isolation von CD34- Stammzellen	16
1.2.7 Mesenchymale Stammzellen	17
1.3 Charakterisierung bestimmter Zelllinien	19
1.3.1 RM26	19
1.3.2 L87/4	20
1.4 Einsatz verschiedener Immunsuppressiva	21
1.4.1 ATG	21
1.4.2 Thymoglobulin und Lymphoglobulin	21
1.4.2.1 Lymphoglobulin	21
1.4.2.2 Thymoglobulin	22
1.4.3 Basiliximab	22
1.4.4 Ciclosporin A	23
1.4.5 Tacrolimus	23
1.5 Transplantation und Immunmechanismen	24
1.5.1 Transplantatabstoßung	25
1.5.2 Mechanismen der Transplantatabstoßung	26
1.5.3 T-Zellaktivierung	26

1.6 Die Kostimulatoren B7H1 und B7.1 und ihre Rolle bei der Immunantwort	27
1.6.1 B7H1	27
1.6.2 B7.1	28
1.7 Apoptose	29
1.8 Fragestellung der vorliegenden Arbeit	30
2. Material und Methode	32
2.1 Bezugsquellennachweis	32
2.1.1 Stammzellen	32
2.1.2 Cell-Counting-Kit-8®	32
2.1.3 Cell Proliferation ELISA, BrdU (colorimetric)®	32
2.1.4 Cell Death Detection ELISApus®	32
2.1.5 RNeasy Mini Kit 50®	33
2.1.6 DNA-free Kit	33
2.1.7 Reagenzien und Verbrauchsmaterial	33
2.1.8 Geräte	36
2.1.9 Medikamente	37
2.1.10 Primer	39
2.2 Stammlösungen und Puffer	39
2.3 Untersuchungsverfahren und Arbeiten mit den Zellen	40
2.3.1 Splitting und Kultivierung der Zellen	40
2.3.2 Zellkonzentrationsbestimmung mittels Neubauer-Zählkammer	41
2.3.3 ELISA – <u>E</u> nzyme- <u>l</u> inked <u>I</u> mmuno <u>s</u> orbent <u>A</u> ssay	42
2.3.4 CCK8 - Cell Counting Kit-8	43
2.3.4.1 Allgemeine Information zu CCK8	
2.3.4.2 Lagerung des CCK8	44
2.3.4.3 Arbeitsprotokoll für den CCK8	44
2.3.4.4 Kontrollen	45

2.3.4.5	Probleme bei der quantitativen Auswertung der Zellzahlen	45
2.3.4.6	Festlegen einer geeigneten Zellzahl für die Untersuchung der Auswirkungen der Immunsuppressiva auf die verschiedenen Zelllinien	45
2.3.5	Cell Proliferation ELISA, BrdU (colorimetric)	45
2.3.5.1	Allgemeine Information zum BrdU(5-bromo-2'-deoxyuridine)-Test	45
2.3.5.2	Vorbereiten der Arbeitslösungen	46
2.3.5.3	Kontrollen	47
2.3.5.4	Arbeitsprotokoll für den Cell Proliferation ELISA, BrdU (colorimetric)	48
2.3.5.5	Arbeitsprotokoll für DMSO-Hemmversuch	49
2.3.6	Auswirkungen der Immunsuppressiva auf das Apoptoseverhalten der Zellen mit Hilfe des Cell death Detection ELISA plus	50
2.3.6.1	Allgemeine Informationen zum Cell death Detection ELISA plus	50
2.3.6.2	Vorbereiten der Arbeitslösungen	51
2.3.6.3	Kontrollen	52
2.3.6.4	Arbeitsprotokoll zum Cell death Detection ELISA plus	52
2.4 Semiquantitative Untersuchung der Auswirkung von Immunsuppressiva auf das Expressionsgleichgewicht der kostimulatorischen Proteine B71 und B7H1		
2.4.1	Inkubation der Zellen und Zusetzen der Immunsuppressiva	54
2.4.2	RNA-Isolierung mit dem RNeasy Mini Kit 50 von Quiagen und dem DNA-free Kit	55
2.4.3	cDNA-Synthese	56
2.4.4	Amplifikation der cDNA durch PCR	57
2.4.5	Gelelektrophorese und Darstellung der DNA-Fragmente	58
2.5 Festlegen der therapeutischen Konzentration der Immunsuppressiva		
		59

3. Ergebnisse	61
3.1 Etablierung geeigneter Ausgangsbedingungen der Experimente	61
3.2 Apoptoseverhalten bei verschiedenen Konzentrationen an Immunsuppressiva	75
3.3 Proliferationsverhalten bei verschiedenen Konzentrationen an Immunsuppressiva	94
3.4 Exprimierung von B7.1 und B7H1	105
4. Diskussion	114
4.1 Etablierung der Ausgangsbedingungen	114
4.2 Auswirkungen der Immunsuppressiva auf das Apoptoseverhalten der Stammzellen	115
4.3 Auswirkungen der Immunsuppressiva auf das Proliferationsverhalten der Stammzellen	118
4.4 Auswirkungen der Immunsuppressiva auf die Exprimierung von B7.1 und B7H1	120
5. Zusammenfassung	121
6. Literaturverzeichnis	122

Abkürzungsverzeichnis

ABTS	2,2'-azino-bis (3-ethylbenzthiazoline-6-sulfonicacid)
APC	antigen presenting cell
BCL-2	B-cell lymphoma 2
BRDU	5-bromo-2'-deoxyuridine
CASPASE 3	cysteine-aspartic acid protease 3
CCK8	Cell Counting Kit-8
CD	Cluster of differentiation
CDNA	komplementäre DNA (DNA-Kopie der RNA)
CFU	colony forming units
CFU-GM	colony-forming units granulocyte macrophage
CYC	Cyclophilin
DMSO	Dimethylsulphoxide
DNA	Deoxyribonucleic acid
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ELISA	Enzyme-linked Immunosorbent Assay
FKBP	FK506-binding protein
G-CSF	granulocyte colony stimulating factor
GM-CSF	granulocyte-macrophage colony-stimulating factor
GVHD	graft-versus-host-disease
HLA	Human Leucocyte Antigen
HPP-CFC	high proliferative potential colony-forming cells
HSC	hematopoietic stem cells
IL-6	Interleukin 6
KDR	kinase insert domain-containing receptor (auch bekannt als „vascular endothelial growth factor receptor 2“, VEGFR2)

M	Mol
M-CSF	macrophage colony-stimulating factor
MHC	major histocompatibility complex
MP	Mikrotiterplatte
MNC	mononuclear cells
MPTP	mitochondrial permeability transition pores
MRNA	messenger Ribonucleic acid
NFAT	nuclear factor of activated T cells
NOD/SCID	nonobese-diabetic severe combined immunodeficiency
PBS	Phosphat gepuffertes Salz
PBMNC	peripheral blood mononuclear cells
PBSC	Peripheral blood stem cells
PD1	programmed death 1
PDL1	programmed death ligand 1
PMS	phenazinium methylsulfate
POD	Peroxidase
RNA	Ribonucleic acid
RPM	Rounds per minute
SCA-1	Stammzellantigen-1
SCF	stem cell factor
SCID	severe combined immunodeficiency
SRC	severe combined immunodeficiency repopulating cells
TAQ	Thermus aquaticus DNA-Polymerase
THY-1	Thymocyte differentiation antigen-1
TMB	Tetramethyl-Benzidin
WST-8	2-(2-methoxy-4-nitrophenyl)-3-(4- nitrophenyl)-5-(2,4-disulfohenyl)-2H- tetrazolium, monosodium salt

1. Einleitung und Zielsetzung

1.1 Einführung

Die Stammzellforschung ist ein breites und kontrovers diskutiertes Forschungsgebiet, das in vielen Bereichen noch in den Kinderschuhen steckt. Um das Potential der Stammzellen sinnvoll nutzen zu können, ist es wichtig, ihr Verhalten auf bestimmte Umwelteinflüsse zu kennen bzw. zu studieren.

1.2 Stammzellen

Bis heute ist der Begriff der „Stammzelle“ nicht klar und allgemein anerkannt definiert. Es gibt viele Auffassungen und Sichtweisen über Natur und Eigenschaften, die eine Stammzelle ausmachen. Nach Definition des National Institutes of Health „unterscheiden sich Stammzellen von anderen Zellen im Körper. Alle Stammzellen, unabhängig von ihrer Herkunft, haben drei generelle Eigenschaften:

- I) Sie sind fähig, sich über einen langen Zeitraum zu teilen und sich selbst zu erneuern.
- II) Sie sind nicht spezialisiert.
- III) Sie können zu spezialisierten Zellarten führen [109].

Asymmetrische Teilung

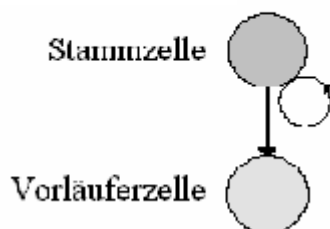


Abbildung 1.1:

Selbsterneuerung durch asymmetrische Teilung: Eine Tochterzelle ist eine Kopie des Originals, die andere eine bereits differenziertere Zelle, die oft als Vorläuferzelle bezeichnet wird (nach [119]).

Vor allem die ersten beiden Punkte werden von führenden Wissenschaftlern sehr kontrovers diskutiert [119, 120]. Bedingt durch unterschiedliche Definitionen lassen sich Stammzellen schwer einteilen. Zwei Hauptgruppen stellen die adulten Stammzellen und

die embryonalen Stammzellen dar. Adulte Stammzellen, wozu auch die hämatopoetischen und die mesenchymalen Stammzellen gehören, lassen sich während des gesamten Lebens in mehrzelligen Organismen nachweisen und isolieren. Dagegen sind embryonale Stammzellen nur während der Blastomeren- und Blastozystenphase isolierbar.

1.2.1 Hämatopoetische Stammzellen

Bereits 1961 fanden Till und McCulloch heraus, dass in der Milz jede Milzkolonie von einer einzelnen klonogenen Vorläuferzelle abgeleitet ist, die dazu befähigt ist Zellen aller Zelllinien zu bilden. Diese aus der Milz gewonnenen, hämatopoetischen Stammzellen (HSC) konnten dazu benutzt werden, bestrahlungsbedingte, hämatopoetische Schäden bei Mäusen zu beheben [168]. Dies führte dazu, dass HSC zu dieser Zeit definiert waren als A) zur Radioprotektion befähigt, B) fähig, Zellen aller hämatopoetischen Zelllinien zu entwickeln und C) fähig zur Selbsterneuerung. Bald wurde klar, dass nur ein kleiner Teil, der aus dem Knochenmark und der Milz gewonnenen Zellen, HSC sind [10,144]. Man fing daher an, hämatopoetische Zellen anhand ihrer Größe, Dichte und der Expression zellulärer Oberflächenmarker zu differenzieren [148, 151, 150, 175, 176]. So wurden HSC zuerst bei der Maus definiert. Neben der geforderten Expression bestimmter Oberflächenmarker (z.B. des Thy-1 Markers (Thy-1^{low})), durfte kein Marker einer bestimmten hämatopoetischen Zelllinie exprimiert werden (lin-) [150, 108, 160]. Diese Definition wurde später auf den menschlichen Organismus übertragen, in dem die HSC gegenwärtig als CD34+DR-lin- definiert ist [129]. DR gehört zu den Klasse II-Antigenen der Human Leucocyte Antigenes, kurz HLA. CD34 ist ein transmembranöses Zelloberflächen-Sialomucin, das auf hämatopoetischen Vorläuferzellen [30, 79, 5, 159] und auf Gefäßendothelzellen exprimiert wird [40, 9]. Das CD34 Antigen ist weitgehend auf den pluripotenten hämatopoetischen Vorläuferzellen exprimiert, nicht aber auf den neoplastischen Zellen von Patienten mit NHL, Myelom und den meisten soliden Tumoren. Es ist allerdings immer noch unklar, ob die frühest zu identifizierende HSC DR- oder DR+ ist [152]. *Huang und Terstappen* berichteten, dass eine CD34+DR- pluripotente Stammzelle sowohl zu einer CD34+DR+lin- HSC führen kann als auch zu einer gemischten Population, die CD34+DR+lin- HSC und DR- Elemente im Stroma enthält [59]. Trotzdem scheint die Expression von DR auf einer HSC einer der ersten Schritte der hämatopoetischen Differenzierung zu sein [60, 127]. Eine DR+ HSC ist immer noch dazu

im Stande, Zellen aller Zelllinien zu entwickeln und daher immer noch als echte Stammzelle anzunehmen [61]. Dies wurde bestätigt durch *Srouf et al.*, die berichteten, dass CD34+DR+ Knochenmarkzellen zu weiter differenzierten Vorläuferzellen führen, obwohl hauptsächlich potentiell hochproliferative, koloniebildende Zellen (high proliferative potential colony-forming cells (HPP-CFC)) in den CD34+DR+ Vorläuferzellen enthalten sind [153]. Die HPP-CFC konnten durch Selektion von c-Kit+ Zellen, die den Rezeptor für Stammzellfaktor exprimieren (SCF), weiter angereichert werden [19]. Obwohl gezeigt wurde, dass hämatopoetische Vorläuferzellen klonalen Ursprungs sind, bleibt es immer noch kontrovers, ob es eine absolute Stammzelle gibt, die mit jedem Zellzyklus („Spermatozytenmodell“) eine Selbsterneuerung durchmacht, oder ob die Zahl der HSC limitiert ist und daraufhin die Reifung zur hämatopoetischen Vorläuferzelle folgt („Oozytenmodell“).

Die Definition von HSC wurde ausgeweitet auf in vivo Modelle, bei denen verschiedene Knochenmarkzellen zuvor myeloablativ bestrahlten Mäusen transplantiert wurden, um das Knochenmark zu rekonstituieren. Eine Knochenmarktransplantation von zuvor erfolgreich transplantierten Mäusen, die nun als Spender dienten, sollte eine zweite Generation von Mäusen rekonstituieren. Die Zellen, die für eine dauerhafte Knochenmarkrestitution verantwortlich sind, wurden als „severe combined immunodeficiency (SCID)-repopulating cells“ (SRC) bezeichnet und auch in vitro als „long-term culture-initiating cells“ definiert [58, 85]. Die Differenzierungsstufe und Reifungsstufe einer HSC und der hämatopoetischen Vorläuferzelle definiert auch deren Reaktion auf Wachstumsfaktoren. Dies ist wichtig für die in vivo und ex vivo Anreicherung von HSC (siehe unten). Die Differenzierung einer pluripotenten Stammzelle zu einer sich differenzierenden oder sogar reifen Blutzelle unterliegt der Antwort auf eine Vielzahl von Wachstumsfaktoren [56, 107], von denen SCF (c-Kit Ligand) eine außerordentliche Rolle spielt [178, 183]. SCF wird hauptsächlich von Stromazellen des Knochenmarks produziert [27, 65] und HSC exprimieren den SCF-Rezeptor [70, 114], eine Tyrosinkinase, die c-Kit genannt wird [24, 180]. SCF selbst spielt eine wichtige Rolle beim Überleben der HSC in Bezug auf die Selbsterneuerung und als ein Komitogen bei der Bewegung der HSC aus dem HSC-Pool in den Vorläuferzellpool [4, 41]. HSC zeigen für gewöhnlich kaum eine Antwort auf einzeln gegebene Zytokine (sogar SCF alleine scheint dauerhaftes Überleben nur bei HSC zu gewährleisten, die nicht vom Zellverbund getrennt sind) [102]. Allerdings führt der Zusatz von anderen Wachstumsfaktoren in einer zweifachen, dreifachen oder multiplen Kombination zu determinierten Vorläuferzellen [110]. Die Verabreichung von SCF in

Kombination mit Interleukin 1 (IL-1), IL-3 oder IL-6 verursacht einen signifikant erhöhten Anteil von HSC, der in Richtung der myeloiden oder hämatoiden Zelllinien proliferiert; der Zusatz von G-CSF, GM-CSF oder macrophage colony-stimulating factor (M-CSF) führt hauptsächlich zu HSC, die sich zu myeloiden Vorläuferzellen differenzieren [12]. Eine der effektivsten Kombinationen in vitro war die Behandlung von CD34+ Zellen mit sechs Wachstumsfaktoren (IL-1, IL-3, IL-6, G-CSF, GM-CSF, und SCF) [99].

1.2.2 Quellen hämatopoetischer Stammzellen

Die Gewinnung hämatopoetischer Stammzellen ist prinzipiell aus verschiedenen Quellen des Organismus möglich. Traditionell werden Stammzelltransplantationen durchgeführt, indem man eine nicht manipulierte, komplette Mischung von Knochenmarkzellen infundiert [166, 165, 32]. Die Knochenmarksuspension enthält ein komplexes, heterogenes Zellgemisch, einschließlich der Haupt-Population der HSC. Mit sinkender Übereinstimmung von Spender und Empfänger bei einer allogenen Transplantation zeigen sich verschiedene Nebenwirkungen, wie die einer graft-versus-host-disease (GVHD). Aus diesem Grund wurden und werden verschiedene Methoden entwickelt, um das Zellgemisch von störenden Elementen zu reinigen [82, 136, 3, 43] bzw. um eine positive Selektion von Zellen mit der dauerhaften Fähigkeit zur Repopulation [8] zu erreichen. Bei Menschen sind diese Zellen immer noch als CD34+lin- definiert und haben eine hohe Wahrscheinlichkeit, frei von maligner Kontamination bei Autotransplantaten zu sein.

Eine andere Methode stellt die Anreicherung von Stammzellen aus dem peripheren Blut (Peripheral blood stem cells (PBSC)) dar. Obwohl Knochenmark den höchsten Anteil an CD34+ mononuclear cells (MNC) pro ml hat, kann man durch Mobilisation mit Chemotherapie und Wachstumsfaktoren eine noch größere Menge an CD34+ Zellen im peripheren Blut anreichern. Die große Menge an peripherem Blut, die während der Apherese verarbeitet werden kann, führt zu diesem guten Ergebnis [11]. Dass peripheres Blut dazu benutzt werden kann, myeloablativ bestrahlte Lebewesen zu rekonstituieren, wurde ursprünglich an der Ratte und später am Hund gezeigt [17, 155]. Nicht mobilisiertes Blut enthält einen sehr geringen Prozentsatz an CD34+ MNC (annähernd 0,15%). Die Mobilisation mit einer kurzen Chemotherapie und zusätzlicher Wachstumsfaktorbehandlung steigert jedoch den Prozentsatz an CD34+ Zellen [11, 77,

94, 22, 143]. Ein weiterer Vorteil der Verwendung peripheren Blutes besteht darin, dass es weniger wahrscheinlich maligne kontaminierte Zellen beinhaltet als Knochenmark [86, 141]. Bei der Isolation von PBSC wird angenommen, dass MNC aus peripherem Blut HSC enthalten. Es wurde gezeigt, dass während der Leukopherese gesammelte MNC colony-forming units granulocyte macrophage (CFU-GM) und CD34+ Zellen enthalten [100, 133].

Auch fetale Leber und Nabelschnurblut kann als Quelle für Stammzellen genutzt werden. Während der fetalen Entwicklung ist die Leber physiologischerweise Teil des hämatopoetischen Gewebes. Vom zweiten bis siebten Monat der Schwangerschaft und idealerweise vor Beginn der Lymphopoese kann die fetale Leber zur Transplantation genutzt werden. Wie klinisch bei Kindern mit angeborener Immundefizienz gezeigt, können die Zellen der fetalen Leber erfolgreich sowohl das hämatopoetische als auch das lymphatische System wiederherstellen [113, 171]. Während hämatopoetischer Ontogenese und perinatalem Wechsel der Lokalisation der Hämatopoese erreichen die HSC das Blut und zirkulieren. Der Vorteil des Nabelschnurblutes besteht darin, dass es zum Zeitpunkt der Geburt ohne Beeinträchtigung des Fetus oder der Mutter gesammelt und konserviert werden kann. Es wurde gezeigt, dass mit verbesserter Technik bis zu 200 ml Nabelschnurblut gewonnen werden kann, das bis zu 4×10^6 myeloide Vorläuferzellen enthält [54].

1.2.3 In vitro Anreicherung von Stammzellen

Die Anreicherung von hämatopoetischen Vorläuferzellen wird benutzt, um ein Standard-Autotransplantat zu ergänzen. Durch diese Technik stellt man mehr reife und funktionelle neutrophile Zellen zu Verfügung, was den Zeitraum der Neutropenie und die in vivo Verabreichung von Wachstumsfaktoren senken soll [20]. Kombinationen von Wachstumsfaktoren können in 7 Tagen die CFU-GM Produktion in vitro auf das 20- bis 200-fache steigern [139]. Die Induktion von Differenzierung ist auch in Verbindung mit Gentransfer-Experimenten von Interesse. Dies könnte nicht nur die Transduktionseffektivität steigern, sondern auch anhaltende Serumlevels an genetisch transferierten Konstrukten bereitstellen. Auf der anderen Seite kann Differenzierung auch ein Problem darstellen, da echte Stammzellen in vitro aufwendig gepflegt werden müssen.

Dies könnte durch den Gebrauch von vorübergehend immortalisierten CD34- HSC gelöst werden (siehe Abschnitt 1.2.4).

1.2.4 CD34- Stammzellen und ihre Biologie (in den folgenden Abschnitten 1.2.4 bis 1.2.7 werden die Ergebnisse aus [129] verwendet und zusammengefasst)

Während der Ontogenese beginnt die Hämatopoese im Dottersack, wechselt dann zur Milz und Leber und schließlich zur Knochenmarkshöhle. Im Knochenmark hängt die Differenzierung und Proliferation der hämatopoetischen Stammzellen (HSC) generell von einem intakten „Mikromilieu“ ab. Die Richtung der Differenzierung ist durch verschiedene Parameter wie Konzentration und Zusammensetzung der interagierenden Wachstumsfaktoren festgelegt [162, 91]. Man nimmt an, dass Stromazellen die Hauptquelle dieser Wachstumsfaktoren sind und auch mit HSC auf einem interzellulären Level interagieren [37]. Sowohl HSC als auch Stromazellen leiten sich aus dem Mesoderm ab und werden als zwei verschiedene Zellarten betrachtet. Nichts desto trotz beschreiben *Singer et al.* adhärente, gemeinsame Vorläufer für stromale und hämatopoetische Zellen [146, 147]. *Huang und Terstappen* schlugen vor, dass eine einzelne fetale CD34+DR-CD38- Stammzelle sich zu stromalen Elementen und zu Zellen mit hämatopoetischen Eigenschaften differenziert [59, 60]. Die Trennung zwischen „Stromazelle“ und „Stammzelle“ ließ zum ersten Mal die Diskussion über den Phänotyp der frühesten HSC-Population aufkommen. Über viele Jahre dachte man, dass Stromazellen CD34- sind, während sogar in der Ruhephase befindliche Stammzellen zumindest niedrige Level an CD34 Antigen exprimieren. Inzwischen zeigten verschiedene Forschungsgruppen in Tiermodellen, bei denen aus Knochenmark gewonnene HSC benutzt wurden, unabhängig voneinander, dass hämatopoetische Rekonstitution mit CD34- Zellen möglich ist [181, 13, 140, 115, 104]. Trotzdem bleibt dieses Thema kontrovers. Andere Forschungsgruppen fanden heraus, dass hämatopoetische Rekonstitution immer noch CD34+ Zellen benötigt, während CD34- Zellen die Repopulation im Rahmen der nonobese-diabetic severe combined immunodeficiency (NOD/SCID) erleichtern [84]. Trotzdem können aus Knochenmark-Stroma gewonnene, fibroblastenartige, CD34- Zellen zu CD34+ Zellen mit hämatopoetischen Eigenschaften in Bezug auf Koloniebildung und Einleitung einer Langzeitkultur [66] führen. Diese HSC können durch verschiedene Wachstumsfaktoren oder Kulturbedingungen sowohl in

Richtung Differenzierung als auch in Richtung Proliferation geleitet werden: Während der Ligand für den Tyrosinkinase-Rezeptor c-Kit, der stem cell factor (SCF), eine Differenzierung in Richtung einer determinierten hämatopoetischen Vorläuferzelle induziert [62], begünstigt IL-6 eher die Proliferation von CD34-, adhärent wachsenden HSC. IL-6 ist auch fähig, den Übergang von fibroblastenartigen, adhärent wachsenden CD34- HSC zu mehr determinierten CD34- HSC umzukehren. Dadurch findet sich eine Möglichkeit, aus menschlichen peripheral blood mononuclear cells (PBMNC) CD34-, adhärent wachsende Zellen [64] zu generieren. Diese fibroblastenartigen Zellen können spontan wieder zu CD34+, nicht adhären Zellen differenzieren, was allerdings von der autokrinen und parakrinen Produktion von SCF abhängig ist [68]. CD34- HSC wurden auch aus kleinen Mengen peripherer Blutzellen von Mäusen isoliert und nach der Immortalisierung, bei der ein retroviraler Vektor benutzt wurde, der ein SV-40 large T-Antigen enthält, geklont. Empfängermause wurden nach myeloablativer Bestrahlung mit einem einzigen Stammzellklon erfolgreich transplantiert [87]. Dieser CD34-Stammzellklon zeigte eine fibroblastenartige Morphologie und der Phänotyp enthüllte eine Koexpression von Stammzellantigen-1 (Sca-1) und c-Kit (CD117). Auch Thymocyte differentiation antigen-1 (Thy-1 bzw. CD90) wurde auf einem niedrigen Level exprimiert. All diese Oberflächenproteine gelten als Stammzellmarker. Diese Experimente zeigten, dass CD34- HSC zwar die Morphologie von stromaartigen Zellen zeigen, dieser Phänotyp aber eine echte HSC darstellt. Beim Gebrauch von CD34- HSC-Klonen zur hämatopoetischen Rekonstitution, stellte man fest, dass die zusätzliche Behandlung mit Wachstumsfaktoren die hämatopoetische Erholung nicht beschleunigt. Man nimmt an, dass die notwendigen Faktoren dieser Zellen in autokriner und parakriner Weise produziert werden [163]. Die Analyse von Knochenmarkbiopsien von Empfängermausen zeigte, dass transplantierte Zellen mit dem bekannten Phänotyp und der fibroblastenartigen Morphologie als knochenumkleidende Zellen entlang der Knochenpikula im Knochenmark lokalisiert waren. Dies wird gewöhnlich als die Nische für osteoblastische Zellen betrachtet. Es wurden auch menschliche, aus dem Knochenmarkstroma gewonnene, CD34-, fibroblastenartige Zellen auf ihr Potential hin analysiert, sich zu hämatopoetischen Vorläufern zu differenzieren. Diese Zellen produzierten colony forming units (CFU) und wurden NOD/SCID Mäusen transplantiert. Die Zellen produzierten auch c-Kit (CD117) und mesenchymale Marker wie Osteocalcin. Abbildung 1 zeigt den möglichen horizontalen Wandel zwischen einer gemeinhin bekannten „Stromazelle“, einer in Ruhephase befindlichen Stammzelle und einer aktiven

Stammzelle. Aus dem Stroma gewonnene Wachstumsfaktoren beeinflussen die aktive Stammzelle ebenso wie die mehr determinierte HSC und die mesenchymale Stammzelle.

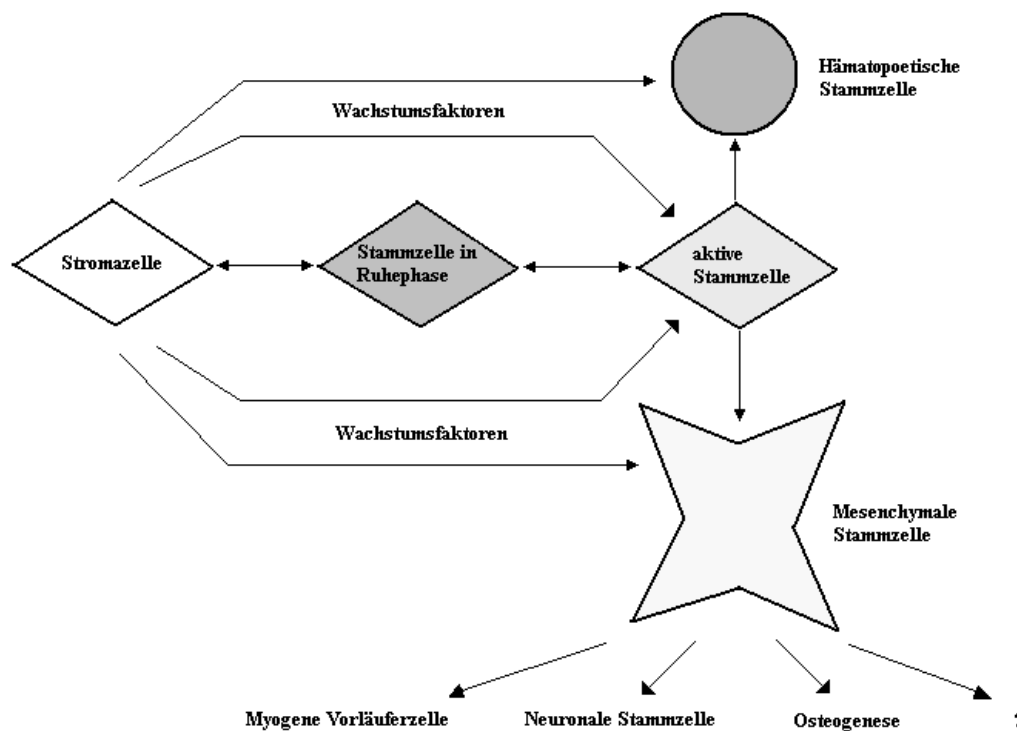


Abbildung 1.2 (nach[129]):

Verschiedene funktionelle Stadien von fibroblastenartigen, CD34- Stammzellen im Knochenmark "Mikromilieu". Die stromalen Knochenmarkelemente bestehen aus "Stromazellen", die notwendige Wachstumsfaktoren produzieren, um die Aktivierung, die Proliferation und die Differenzierung von ansprechenden Stammzellen zu fördern. Die Mehrheit der Stammzellen befindet sich in einer Ruhephase und spricht nicht auf die externen Signale an [63]. Eine kleine Zahl von Stammzellen ist aktiv und kann auf die parakrin produzierten Wachstumsfaktoren ansprechen. Diese aktive Stammzelle kann in eine mehr determinierte CD34+ HSC oder sogar in eine mesenchymale Stammzelle, die spezifischeres Gewebe generiert, differenzieren.

1.2.5 Der „Stammzell Zyklus“

Monoklonale CD34- Stammzelllinien sind dazu fähig, alle hämatopoetischen Zelllinien zu rekonstituieren [87]. Bei intravenösen Transfusionen mit CD34-, fibroblastenartigen Stammzellen war die hämatopoetische Erholung der Empfängermäuse nach myeloablativer, totaler Körperbestrahlung in keiner Weise verzögert. Dies lässt vermuten, dass zirkulierende Stammzellen sogar anfangs zu ihrem Platz im Knochenmark „Mikromilieu“ zurückkehren, bevor sie zu determinierten hämatopoetischen Vorläuferzellen differenzieren. *Huss et al.* konnten zeigen, dass CD34-, fibroblastenartige HSC eine hämatopoetische Pluripotenz beinhalten und eine gewisse Menge dieser Zellen im peripheren Blut zirkuliert. Sie können stets zu ihrer Ansiedlungsumgebung im

Knochenmarkstroma zurückkehren. *Huss et al.* nennen das den „Stammzellzyklus“ [69]. Der „Stammzellzyklus“ definiert die Zirkulation von CD34⁻ Stammzellen, die im Knochenmarkmikromilieu verharren, bis sie sich eventuell differenzieren und im peripheren Blut zirkulieren. Dennoch können zirkulierende CD34⁺ Zellen zum Knochenmark zurückkehren und die CD34-Expression einstellen, während sie als fibroblastenartige Zellen wachsen. Wenn man immortalisierte CD34⁻ Stammzellen nutzt, können die Klone dazu verwendet werden, am „Stammzellzyklus“ teilzunehmen und eine komplette hämatopoetische Rekonstitution mit genetisch modifizierten Stammzellen zu erreichen (Abbildung 1.3).

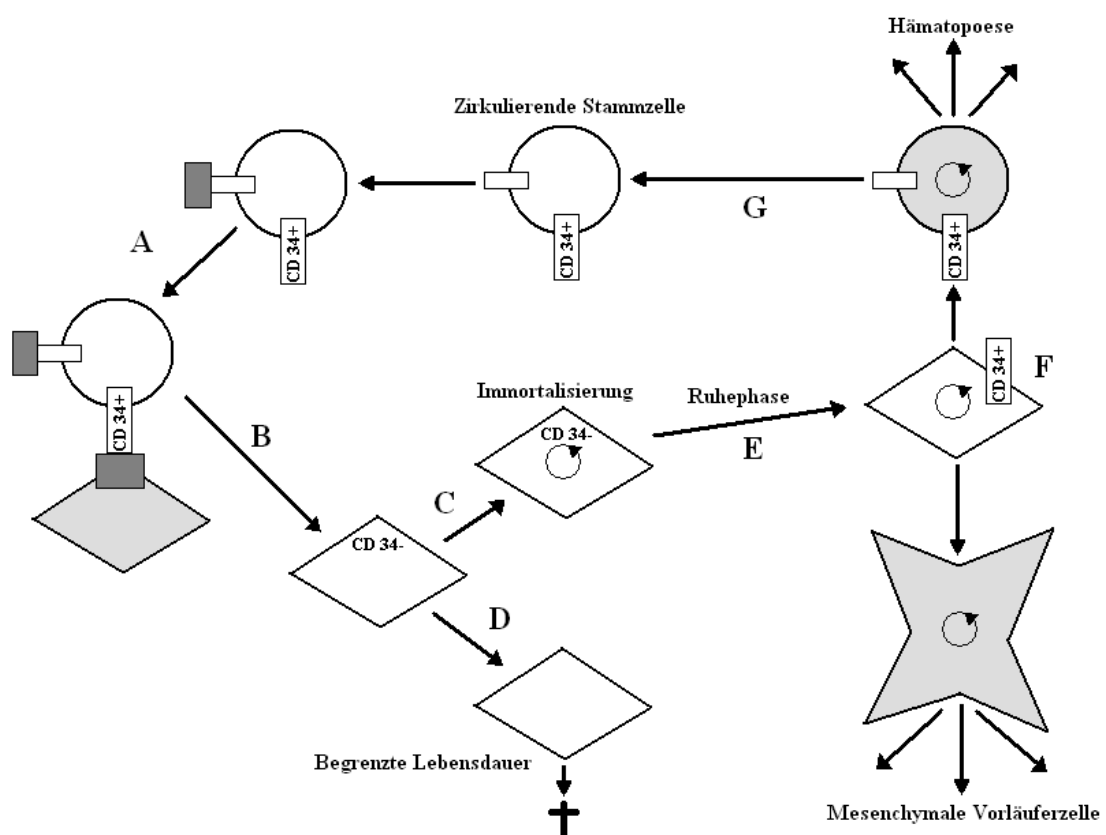


Abbildung 1.3 (nach[129]):

„Stammzellzyklus“ von genetisch modifizierten (immortalisierten) Stammzellen: zirkulierende Stammzellen exprimieren charakteristische Oberflächenantigene und –Rezeptoren, die wahrscheinlich lösliche Zytokine binden. Diese Zytokine initiieren das „homing“ der CD34⁻ Stammzellen. A) Zirkulierende CD34⁺ Stammzellen „homen“ zur Knochenmarkhöhle und interagieren mit Zellen des Knochenmarkmikromilieus. B) „homende“ Stammzellen nehmen wieder ein Ruhestadium und eine fibroblastenartige Morphologie im Knochenmarkmikromilieu auf. Die fibroblastenartigen Zellen exprimieren kein CD34 Antigen. C) Die ruhenden Stammzellen können mit Hilfe von geeigneten Vektorsystemen immortalisiert werden [87, 131]. D) Während der Ruhephase sind sogar immortalisierte Zellen refraktär gegenüber externen Signalen wie Wachstumsfaktoren oder parakrin produzierter Zytokine. Nicht immortalisierte Stammzellen haben in vitro eine begrenzte Lebensdauer, vermutlich auf Grund eines nicht geeigneten Milieus. E) Nachdem die Stammzellen durch die Ruhephase gegangen sind, können sie auf Differenzierungssignale ansprechen. Immortalisierte und angereicherte Stammzellen können zur Differenzierung in hämatopoetische Vorläuferzellen oder mesenchymalen Vorläuferzellen gebracht werden. F) Aktive Stammzelle. G) zirkulierende Stammzelle im peripheren Blut.

Allerdings tritt hämatopoetische Rekonstitution nicht in linearer Art und Weise in Erscheinung. Wie in Rekonstitutionsexperimenten am Tier gezeigt wurde, erscheint die Folgegeneration der transplantierten Zellen in der Peripherie nur zeitweise. Manchmal sind die transplantierten Zellen in der Peripherie präsent und verschwinden dann wieder, bevor sie etwas später wieder auftauchen. *Morely et al.* bezeichneten das als „oscillatory nature of hematopoiesis“ [105] und postulierten eine „Knochenmarktransitzeit“ für Stammzellen im Stammzellzyklus. Die „Knochenmarktransitzeit“ ist abhängig von einer Ruhephase in der CD34- Stammzellpopulation. Der weitaus größte Anteil der CD34- Stammzellen ist in der Ruhephase während sie im Knochenmarkmikromilieu verweilen. Diese Ruhephase wird durch Zellzyklus assoziierte Regulationsmechanismen und die fehlende Aktivierung von Signaltransduktionswegen vermittelt [63]. Andere Möglichkeiten, um einen Ruhestatus aufrecht zu erhalten, beinhalten verminderte Exprimierung von Wachstumsfaktorrezeptoren. Der Mechanismus der Ruhephase der Mehrheit der HSC im Knochenmarkpool ist ein effizienter Mechanismus, um einen lebenslangen Pool an hämatopoetischen Vorläuferzellen bereitzustellen.

1.2.6 Isolation von CD34- Stammzellen [129]

Wenn man den Vorteil des geforderten Stammzellzyklus und die „homing“-Fähigkeiten der zirkulierenden Stammzellen ausnutzt, können CD34-, fibroblastenartige Vorläuferzellen aus peripherem Blut durch Zytokin vermittelte Adhäsion an die Plastikoberfläche von Zellkulturflaschen isoliert werden. Ein Wachstumsfaktor, der das adhärente Wachstum vereinfacht und die fibroblastenartige Morphologie bewahrt, ist IL-6. Dieser Faktor ist ein starker Induktor der Proliferation CD34- Stammzellen und verhindert darüber hinaus eine Differenzierung in mehr determinierte hämatopoetische Vorläuferzellen [66, 67]. Obwohl es möglich ist, fibroblastenartige Zellen aus kleinen Mengen von PBMNC *in vitro* zu etablieren [64], gibt es eine kritische Zelldichte pro well oder Flasche, die vorhanden sein muss, um die notwendige Zell-Zell-Interaktion und eine ausreichende Konzentration an parakrinen Wachstumsfaktoren bereit zu stellen. Die fibroblastenartigen Zellen produzieren ein breites Spektrum an Wachstumsfaktoren, was für Knochenmarkstromazellen gezeigt wurde [163]. Die Lebensdauer von CD34-, fibroblastenartigen Zellen *in vitro* ist begrenzt. Allerdings können diese Zellen auf

verschiedene Art und Weise immortalisiert [146] und Zellklone etabliert werden [87]. Man kann diese Klone in Bezug auf funktionelle Eigenschaften und ihre Fähigkeiten, eine langzeitliche hämatopoetische Rekonstitution zu erreichen, untersuchen. Der Gebrauch von einzelnen Klonen zur Transplantation behindert bei Tieren offensichtlich nicht eine komplette hämatopoetische Rekonstitution [87]. Fibroblastenartige, CD34- Stammzellen können fast unbegrenzt angereichert werden, wobei zuerst ein unreifes Level der Differenzierung aufrechterhalten wird. CD34-, fibroblastenartige Vorläuferzellen können sowohl aus Knochenmark als auch aus peripherem Blut [64, 87] isoliert werden.

1.2.7 Mesenchymale Stammzellen [129]

Gegenstand aktueller Forschungen sind gemeinsame Vorläuferzellen des Knochenmarkmikromilieus und der Hämatopoese [81, 145]. Es gibt zunehmend Beweise, dass es ruhende oder in der Ruhephase befindliche CD34- HSC zwischen anderen fibroblastenartigen Zellen gibt, die als Hilfszellen dienen und notwendige Wachstumsfaktoren und sogar Zell-Zell-Kontakte liefern, um das empfindliche Gleichgewicht von Differenzierung und Proliferation der hämatopoetischen Vorläuferzellen in Balance zu halten [69]. Zusätzlich zeigt sich, dass so genannte „mesenchymale Stammzellen“ eigentlich das Knochenmarkstroma rekonstituieren und determinierte Vorläuferzellen in die Zirkulation entlassen [137], um im Wesentlichen am „Stammzellzyklus“ teilzunehmen. Allerdings sind mesenchymale Stammzellen Vorläuferzellen von anderen mesenchymalen Organsystemen, wie Chondrozyten, Osteoblasten und Myeloblasten [124]. CD34-, mesenchymale Stammzellen sind offensichtlich in der Lage, spezifisches Gewebe wie Endothelzellen und sogar Kardiomyozyten zu erzeugen [97]. Da frühe hämatopoetische und mesenchymale Stammzellen das CD34 Antigen nicht exprimieren, wurden große Bemühungen unternommen, neue Marker für diesen Zelltyp zu identifizieren. *Ziegler et. al.* entdeckten den „kinase insert domain-containing receptor“, kurz KDR-Rezeptor auf CD34- HSC [182], da sie bei diesen auch das Potential zur Neoangiogenese vermuteten. Offensichtlich gibt es eine gemeinsame Vorläuferzelle von CD34- hämatopoetischen und mesenchymalen Stammzellen. Dieser Zelltyp kann zur Bildung verschiedener spezifischer Gewebe führen (Abbildung 1.4), abhängig von Wachstumsfaktor vermittelten Signalen und einer internen Signalkontrolle.

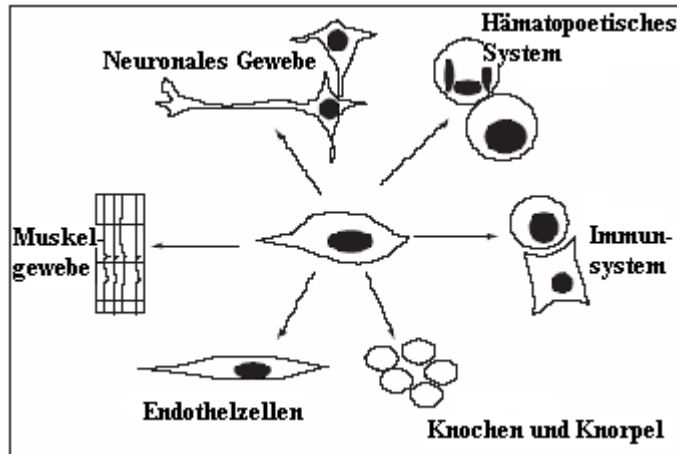


Abbildung 1.4 (nach[129]):

Verwendung von omnipotenten Stammzellen zur Erzeugung von individuell gestalteten Autotransplantaten. CD34-, fibroblastenartige Zellen können die Quelle für verschiedenste, spezifische Gewebe und sogar Organsysteme sein. CD34- Stammzellen können aus kleinen Mengen von PBMNC gewonnen werden.

Wenn man auch die neuen Vektorsysteme für in der Ruhephase befindliche Zellen nutzt [131], können CD34-, hämatopoetische und mesenchymale Stammzellen sehr effizient für Zell- und Gentherapie mit einem breiten Verwendungsspektrum eingesetzt werden.

1.3 Charakterisierung bestimmter Zelllinien

1.3.1 RM26

Die verwendeten Zellen RM26 entsprechen Zellklonen, die von *Huss et. al.* aus dem peripheren Blut von Mäusen isoliert, geklont und charakterisiert wurden [128]. Auf Grund ihres mesenchymalen Ko-Phänotyps gehören sie zu den sog. „adulten Stammzellen“ [164], was durch das Erreichen einer hämatopoetischen Rekonstitution bei syngenen Mäusen bewiesen werden konnte [87]. Die Zellklone sind CD34- und exprimieren keinerlei zelllinienspezifische Marker *in vitro* (lin-), jedoch das Sca-1 Antigen (Sca-1+), das bei gewissen Mäusestämmen Stammzellen identifiziert. Weiter wurden sie mit Hilfe des SV40 large-T antigen immortalisiert, was keinerlei Auswirkung hatte auf ihre Pluripotenz und ihre Fähigkeit, sich in viele Zelllinienarten zu differenzieren. Werden die aus mononukleären Zellen des Blutes gewonnenen Zellen kultiviert, zeigen sie eine fibroblastenartige Morphologie, was Abbildung 1.5 deutlich macht.

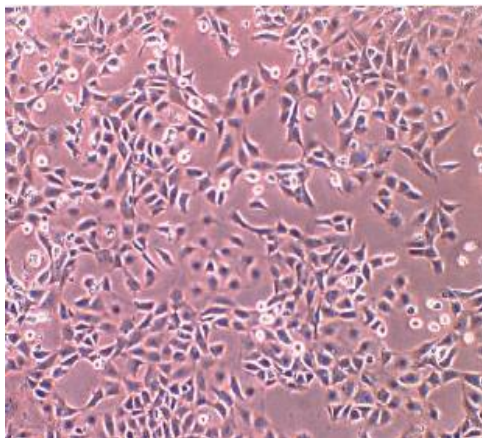


Abbildung 1.5:
RM26 Zellen in Zellkultur unter Standardwachstumsbedingungen ohne Matrix, die eine Differenzierung induziert (100-fache Vergrößerung).

1.3.2 L87/4

Die Zellen der Zelllinie L87/4 stammen aus dem menschlichen Knochenmark. Sie wurden isoliert, mit Hilfe des SV40 large-T antigen immortalisiert, klonal angereichert und charakterisiert [163, 164]. In einer Zellkultur zeigen sie, wie die RM26 Zelllinie, eine fibroblastenartige Morphologie (siehe Abbildung 1.6). Sie gehören zu den CD34-, adulten Stammzellen und wurden durch die Immortalisierung in ihrem biologischen Verhalten nicht verändert [134].

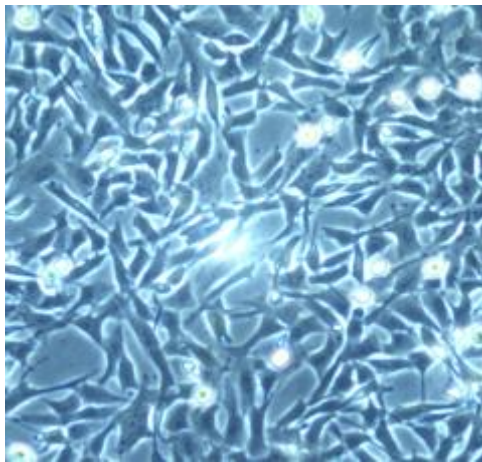


Abbildung 1.6:

L87/4 in Zellkultur unter Standardwachstumsbedingungen ohne eine Matrix, die eine Differenzierung induziert (100-fache Vergrößerung).

1.4 Einsatz verschiedener Immunsuppressiva

1.4.1 ATG

ATG ist ein Anti-Human-T-Lymphozyten-Immuneserum vom Kaninchen mit immunsuppressiver Wirkung. Es wird aus dem Serum immunisierter Kaninchen mit humanen T-Lymphozyten der Jurkat Zelllinie gewonnen. Die in ATG enthaltenen polyklonalen Antikörper binden an Oberflächenantigene humaner T-Lymphozyten und führen zu einer Depletion dieser Zellen. Die T-Zell-Depletion erfolgt vor allem durch Opsonisierung und Lyse der T-Zellen durch Komplementaktivierung. Veröffentlichte in vivo und in vitro Ergebnisse lassen den Schluss zu, dass der Effekt von ATG-Fresenius S durch Bindung unter anderem an CD2+, CD3+, CD4+, CD4+/CD28+, CD5+, CD7+, LFA-1+, und ICAM-1+ Lymphozyten zustande kommt. Durch diese Rezeptoren sind vor allem T-Lymphozyten charakterisiert. CD5 kommt auch auf proliferierenden B-Lymphozyten vor [47].

1.4.2 Thymoglobulin und Lymphoglobulin

Wie bei ATG handelt es sich bei Thymoglobulin und Lymphoglobulin jeweils um polyklonale Antikörper, die entweder vom Pferd (Lymphoglobulin) oder vom Kaninchen (Thymoglobulin) isoliert wurden [167].

1.4.2.1 Lymphoglobulin

Lymphoglobulin ist ein selektives Immunsuppressivum, das hauptsächlich auf die T-Lymphozyten wirkt. Lymphoglobulin erkennt die meisten Moleküle, die an der T-Zell-Aktivierungskaskade während der Abstoßungsreaktion beteiligt sind, wie z.B. den T-Zell-Rezeptor (TCR) und CD3, HLA-Klasse I Moleküle, CD4 und CD8 Korezeptoren, koaktivierende Moleküle oder die Adhäsionsmoleküle CD2, CD5, CD11a und CD18. Die immunsuppressive Wirkung beruht wahrscheinlich auf der erheblichen Lyse der T-Lymphozyten in Blut- und Lymphkreislauf. Die T-Lymphozyten werden durch

Komplement-abhängige Lyse und andere Mechanismen eliminiert, wie in vitro und bei Tieren in vivo nachgewiesen wurde [71].

1.4.2.2 Thymoglobulin

Thymoglobulin enthält Antikörper gegen die meisten Oberflächenantigene, die bei der Transplantatabstoßung an der T-Zell-Aktivierungskaskade beteiligt sind, wie z. B. CD2, CD3, CD4, CD8, CD11a, CD18, HLA-DR und HLA-Klasse I. Das wichtigste Wirkprinzip der Immunsuppression durch die Behandlung mit Thymoglobulin ist wahrscheinlich die Depletion der T-Lymphozyten. Der Mechanismus der T-Zell-Depletion betrifft die Fc-Fragment-abhängige Opsonisierung durch das Makrophagen-Monozyten-System. Die Komplement-abhängige Opsonisierung und Lyse sowie Apoptose-Mechanismen sind an der Wirkung beteiligt [72].

1.4.3 Basiliximab

Basiliximab ist ein monoklonaler, chimärer Mensch-Maus Antikörper. Dadurch, dass es sich um einen monoklonalen Antikörper handelt, ist dieses Medikament hochspezifisch für ein bestimmtes Epitop auf dem Zielantigen, den IL-2 Rezeptor auf T-Zellen. Chimär bedeutet bei diesem Antikörper, dass er sich aus den variablen Regionen eines monoklonalen, murinen Anti-CD25-Antikörpers (RFT5) und den konstanten Regionen eines menschlichen Antikörpers (schwere Ketten vom Typ IgG1, leichte Ketten vom Typ Kappa) zusammensetzt [2]. RFT5 bindet spezifisch und mit hoher Affinität an die α -Untereinheit des IL-2 Rezeptors (CD25), die nur von aktivierten, nicht aber von ruhenden T-Zellen exprimiert wird. Dies führt dazu, dass die ruhenden T-Zellen nicht beeinflusst werden. Zur Signalübertragung des IL-2 Rezeptors ist der komplette Rezeptor mit α -, β -, und γ -Untereinheit von Nöten, was bedeutet, dass durch die Blockierung der α -Untereinheit das aktivierende Signal für die T-Zelle nicht übertragen werden kann. Der Antikörper ist somit ein potenter Inhibitor der IL-2 vermittelten T-Zell-Proliferation [112].

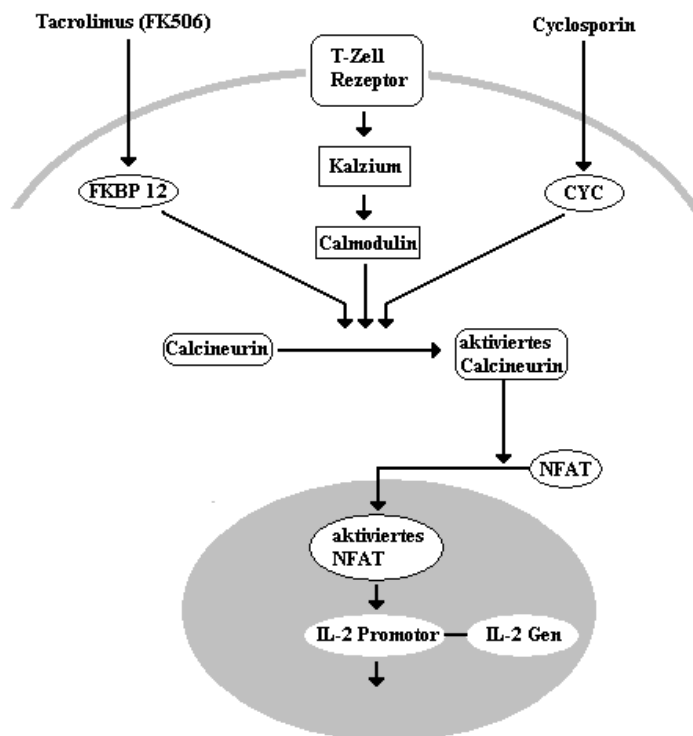
1.4.4 Ciclosporin A

Zur Regulation und Aktivierung von T-Lymphozyten sind bestimmte Zytokine notwendig. Ciclosporin, ein zyklisches Polypeptid, das von dem Pilz *Tolypocladium inflatum* gams produziert wird [167], hemmt die Neusynthese von Interleukin-2 (IL-2), wodurch nachfolgend die Proliferation und die Neuentstehung zytotoxischer T-Zellen supprimiert wird. Diese sind maßgeblich an Transplantatabstoßungen beteiligt [179, 21, 106]. Ciclosporin gehört zu den Calcineurininhibitoren (siehe Abbildung 1.7), was bedeutet, dass Ciclosporin in die Zellen eindringt und an so genannte Cyclophiline oder Immunophiline bindet. Es bildet sich ein Cyclophilin-Ciclosporin-Komplex, der dann die Serin-Threonin-Phosphatase Calcineurin inhibiert [92]. Daraufhin wird wiederum die Aktivierung bestimmter Transkriptionsfaktoren wie NF-KappaB oder NFATp/c (nuclear factor of activated T cells) negativ beeinflusst, die für die Aktivierung der Zytokin-Gene wichtig sind [75, 170]. Es kommt zu einem Stop des Zellzyklus der immunkompetenten Lymphozyten in der G0- oder G1-Phase, da die Zellteilung ohne gewisse Proteine wie IL-2 nicht möglich ist. Hauptangriffspunkt sind T-Helferzellen, die die Aktivität der für die Abstoßung eines Transplantates verantwortlichen zytotoxischen T-Zellen steigern [111]. Weiter hemmt Ciclosporin die Produktion und Freisetzung weiterer Lymphokine, die für die Proliferation reifer zytotoxischer T-Lymphozyten sowie für weitere Funktionen der Lymphozyten verantwortlich sind [78, 57].

1.4.5 Tacrolimus

Tacrolimus, auch FK506 genannt, ist ein aus *Streptomyces tsukubaensis* isoliertes Makrolid. Wie Ciclosporin gehört es zu den Calcineurininhibitoren [167]. Obwohl beide die Signaltransduktion durch die Verhinderung der Calcineurinaktivierung unterdrücken, schafft Tacrolimus dies über ein anderes Bindungsprotein. Es bildet mit dem FK506 binding protein 12 (FKBP12) einen Komplex und führt über diesen zur Calcineurininhibition (siehe Abbildung 1.7). Desweiteren gibt es in vivo und in vitro Studien, die zeigen, dass Tacrolimus eine 10-100-fach höhere immunsuppressive Potenz als Ciclosporin besitzt [90].

Abbildung 1.7 (nach [90]):



Immuno-philin-vermittelte Inhibition der T-Zellaktivierung:

Die Stimulation des T-Zell-Rezeptorkomplexes führt zu einem Inositol 1, 4, 5-Triphosphat vermitteltem Anstieg des intrazellulären Kalziumspiegels. Dies führt zu einer Transkription des Interleukin 2 Gens. Tacrolimus (FK506) und Cyclosporin A verhindern diesen Prozess, indem sie an ihre spezifischen Immunophilinen, das FKBP 12 (FK506-binding protein) und das CYC (Cyclophilin), binden. Dadurch inhibieren sie die Kalzium/Calmodulin-abhängige Phosphatase Calcineurin.

1.5 Transplantation und Immunmechanismen

Die Transplantation von Organen ist heute ein etabliertes und regelmäßig klinisch angewandtes Verfahren. Leider ist bei allogenen Transplantationen heute immer noch eine lebenslange Immunsuppression nötig, da es sonst zur Abstoßung des Transplantats kommen würde. Die Immunsuppression stellt den Patienten jedoch vor ein neues Problem, da Langzeit-Immunsupprimierte anfälliger für Infektionen und die Entwicklung von Malignomen sind [130] und gleichzeitig mit anderen Nebenwirkungen der Immunsuppressiva wie Nephrotoxizität, Blutdruckerhöhung und ZNS-Störungen zu kämpfen haben. Um diese Folgen der Immunsuppression zu vermeiden gibt es verschiedene Ansätze, die Immunsuppression zu verringern oder gar ohne Immunsuppression auszukommen. Eine Überlegung ist, durch zusätzliche, perioperative Stammzellgabe einen Chimärismus zwischen Empfänger und dem Spenderorgan aufzubauen [52]. Gemäß der in der heutigen Medizin noch gültigen Definition nach Winkler (1907) ist eine Chimäre ein Individuum, das aus genetisch verschiedenen Geweben zusammengesetzt ist. Ziel der zusätzlichen Stammzelltransplantation ist, einen immuntoleranten, chimären Zustand zwischen graft und host zu erreichen.

1.5.1 Transplantatabstoßung

Bei den Abstoßungsreaktionen werden drei Formen der Abstoßung unterschieden, die hyperakute, die akute und die chronische Abstoßung eines Transplantates. Unterschieden werden diese Formen nicht nur anhand ihres zeitlichen Auftretens, sondern vor allem anhand der histologischen Merkmale. Dies wird dadurch deutlich, dass eine akute und eine chronische Abstoßung parallel ablaufen können.

Die hyperakute Abstoßung tritt innerhalb von Minuten oder Stunden nach der Transplantation auf. Bei ihr sorgen vorbestehende Antikörper für eine Reaktion gegen das Gefäßsystem des Spenderorgans [44]. Allerdings ist sie heute selten, da routinemäßig ein Cross-matching bzw. Kreuzproben zwischen Spenderlymphozyten und Empfängerserum durchgeführt werden.

Die akute Abstoßung ist der vorherrschende Grund für Abstoßungsreaktionen zwischen dem 5. und 15. postoperativen Tag [125]. Während bei der hyperakuten Abstoßung die humorale Immunantwort auf das Transplantat im Vordergrund steht, spielt bei der akuten Abstoßung auch die zelluläre Immunantwort eine wichtige Rolle. Die antigenen Strukturen auf den Transplantatzellen führen über verschiedene Signalkaskaden zur Aktivierung von Makrophagen, zytotoxischen T-Zellen oder natürlichen Killerzellen, die ihre Zielzellen dann lysieren [118, 38, 53].

Die chronische Transplantatabstoßung ist heute die Hauptursache für den späten Transplantatverlust [169]. Nach der „Fourth Alexis Carrel Conference on Chronic Rejection and Accelerated Arteriosclerosis in Transplanted Organs“ wird die Diagnose der „chronischen Abstoßung“ basierend auf histomorphologischen Charakteristika des Biopsats und den klinischen Beobachtungen einer allmählich abnehmenden Transplantatfunktion gestellt [121, 174, 172]. Immunologisch werden diese Vorgänge v.a. durch T-Zellen, infiltrierende Monozyten und Makrophagen sowie durch deren Zyto- und Chemokine bedingt. Für das Verständnis der Wirkungsweise der in dieser Arbeit verwendeten Immunsuppressiva wird im Folgenden kurz auf grundlegende Immunmechanismen der Transplantatabstoßung eingegangen.

1.5.2 Mechanismen der Transplantatabstoßung

Das Immunsystem hat sowohl das humorale als auch das zelluläre Immunsystem zur Verfügung, um Fremdgewebe anzugreifen. Die zelluläre Immunantwort wird durch T-Zellen und weniger spezifisch durch Makrophagen und natürliche Killerzellen vermittelt. Die humorale Immunantwort geschieht durch Antikörper, Opsonisierung und Aktivierung des Komplementsystems. Die entscheidende Rolle spielt die zelluläre Immunantwort [14, 169]. Vor allem die Rolle von CD4- und CD8-T-Zellen wurde häufig untersucht [53, 154]. Demnach scheint die Abstoßung hauptsächlich durch CD4-T-Lymphozyten vermittelt zu sein, obgleich bei alleiniger Disparität von Klasse I-MHC Antigenen CD8-T-Zellen als potenter Mediator der Abstoßung fungieren können [154, 15, 95].

T-Zellen können allgemein nicht auf lösliche Strukturen reagieren. Sie benötigen Strukturen, die an der Zelloberfläche akzessorischer Zellen gebunden sind bzw. von diesen präsentiert oder exprimiert werden. Weiter erkennen CD4-T-Helferzellen ihre Antigene nur, wenn diese mit Hilfe von MHC-(major histocompatibility complex)-Klasse-II-Komplexen präsentiert werden. Die Helferzellen werden in Th1- und Th2-Zellen unterteilt, deren Immunantwort entweder zellvermittelt (Th1) oder humoral vermittelt (Th2) abläuft. CD8-zytotoxische-T-Zellen sind gegen Zellen gerichtet, die das Antigen mit Hilfe des MHC-Klasse-I-Komplexes präsentieren bzw. an ihrer Oberfläche tragen [123, 96].

Kommt es zu Abstoßungsreaktionen, so werden diese meist von CD4-T-Zellen initiiert. Diese erkennen Antigene, die entweder als intakte Moleküle von Spender-Antigen-präsentierenden-Zellen (direkte Erkennung) [16, 55] oder als Peptidfragmente von körpereigenen Antigen-präsentierenden-Zellen (APC) (indirekte Erkennung) [49, 142] präsentiert werden.

1.5.3 T-Zellaktivierung

Die spezifische MHC-restringierte Antigenerkennung durch T-Lymphozyten erfolgt über den T-Zell-Rezeptor (TCR). Der Rezeptor ist ein Heterodimer, bestehend aus einer α - und einer β -Kette. Die variablen Regionen des TCR machen seine Spezifität aus. Diese binden die prozessierten Peptidantigene, die auf der Oberfläche von APC an die MHC-Moleküle gebunden sind, sowie polymorphe Strukturen des MHC-Komplexes selbst [101]. Diese

Bindung zwischen dem Antigen, dem MHC-Komplex und dem TCR induziert dann die komplexe T-Zellaktivierung. Es werden noch einige andere Membranproteine auf der Oberfläche der T-Zelle exprimiert, die als akzessorische Moleküle bei Bindung an ihre entsprechenden Liganden die Interaktion des Antigen-MHC-Komplexes mit dem TCR verstärken. Dies macht es möglich, dass genug Zeit für weitere Kostimulatoren wie B7.1 oder B7H1 (siehe unten) ist, die Effektorfunktionen und die Aktivierung der T-Zelle zu beeinflussen. Korrelat einer erfolgten T-Zellaktivierung ist unter anderem die Synthese von IL-2, das die T-Zelle zur Proliferation und Differenzierung in die Effektorzelle anregt [103, 33, 23].

1.6 Die Kostimulatoren B7H1 und B7.1 und ihre Rolle bei der Immunantwort

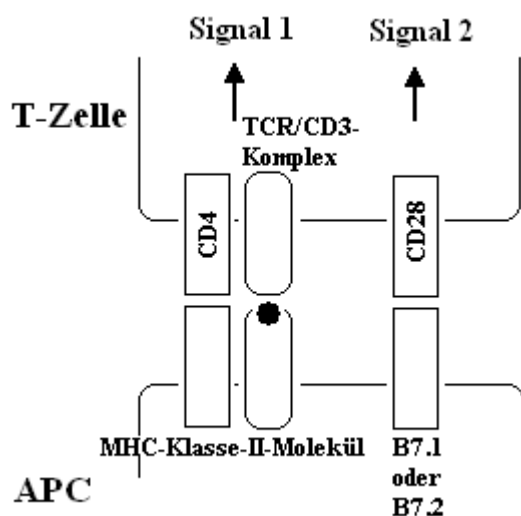
1.6.1 B7H1

B7H1 oder auch programmed death ligand 1 (PDL1) ist ein kostimulierendes Molekül, das auf Zellen des Knochenmarks aber auch auf Parenchymzellen anderer Gewebe exprimiert wird [46, 88, 122, 34]. Es fungiert als Ligand am inhibitorisch wirkenden, kostimulierenden Molekül programmed death 1 (PD1) auf T-Zellen und vermutlich noch an anderen Rezeptoren. B7H1 spielt eine wichtige Rolle bei der Regulierung der Immunantwort in vivo [132, 83] wie z.B. bei der Toleranz gegenüber Transplantaten [36, 116, 48, 138, 74]. Obwohl es Arbeiten gibt, die eine positive Stimulation der T-Zellen beschreiben [161, 177, 156], gibt es klare Hinweise darauf, dass B7H1, bezogen auf allogene Transplantate, vor allem inhibierend auf die Aktivierung von T-Zellen wirkt [51]. Dies geschieht durch Begrenzung der Anreicherung von alloreaktiven T-Zellen [138, 135], möglicherweise durch Anhalten des Zellzyklus [26], durch gesteigerte Apoptose der T-Zellen [138, 35, 73] oder durch aktive Regulation der allogenen Immunantwort durch eine Subpopulation von CD4+, CD25+ T-Zellen [138, 7].

1.6.2 B7.1

B7.1 oder auch CD80 ist ein kostimulierender Ligand, der vor allem auf antigenpräsentierenden Zellen (APC) exprimiert wird. Er bindet an die kostimulierenden Rezeptoren CD28 und CTLA-4 der T-Zellen und ist dadurch essentiell an der Aktivierung und der Regulation der T-Zellen und ihrer Immunantwort beteiligt [158]. Für eine optimale T-Zellaktivierung ist somit sowohl die Interaktion zwischen dem T-Zellrezeptor (TCR) und dem Peptid: MHC-Klasse-II-Komplex [18] als auch die Interaktion zwischen den kostimulierenden Rezeptoren der T-Zelle (z.B. CD28) mit ihren Liganden (z.B. B7.1) auf den antigenpräsentierenden Zellen nötig [31, 25]. Während diese Rezeptor-Ligandenpaare also verstärkend auf die T-Zellaktivierung wirken, können die oben genannten PD1 und B7H1 Rezeptor-Ligandenpaare zur Abschwächung der T-Zellaktivierung und damit der Immunantwort führen.

Abbildung 1.8 [130]:

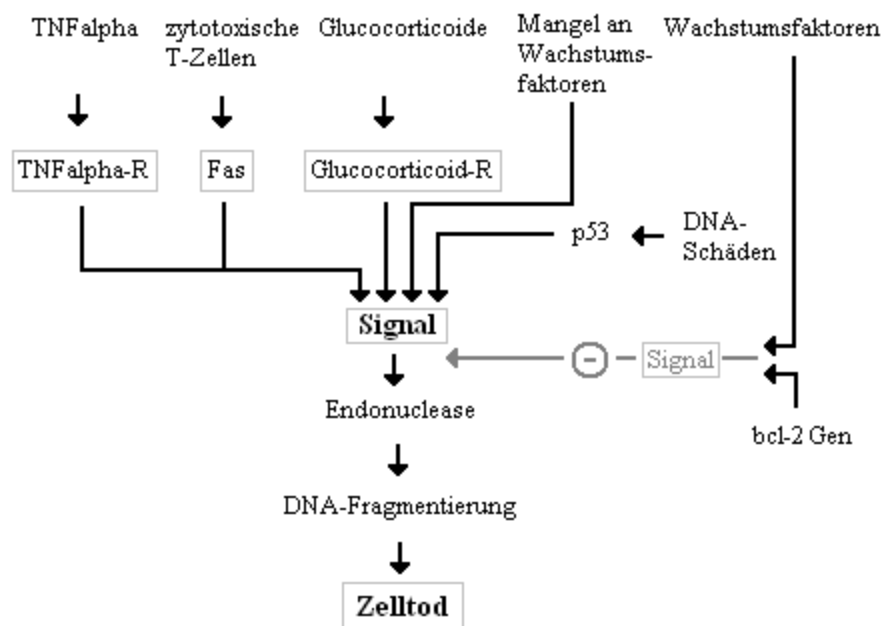


Auf antigenpräsentierenden Zellen werden als kostimulierende Signale vor allem B7-Moleküle exprimiert, die an das T-Zell-Protein CD28 binden. Die Bindung des T-Zell-Rezeptors (TCR) und seines Korezeptors CD4 an den Peptid: MHC-Klasse-II-Komplex auf der antigenpräsentierenden Zelle (APC) setzt ein Signal frei (Signal 1), das nur dann für eine klonale Vermehrung der T-Zellen sorgt, wenn aufgrund der Bindung von CD28 an B7-Moleküle ein kostimulierendes Signal (Signal 2) erzeugt wurde. CD28 und B7.1 (CD80) gehören beide zur Immunglobulin-Superfamilie.

1.7 Apoptose:

Die Apoptose beschreibt einen Prozess, der in vielen unterschiedlichen Zellen individuell ausgelöst werden kann. Man bezeichnet die Apoptose auch als programmierten Zelltod, da sie, einmal in Gang gesetzt, wie ein Programm abläuft und schließlich im Zelltod gipfelt. Nach Freisetzung von molekularen Signalen kommt es durch Kaskadenreaktionen zur Zellkernschrumpfung mit anschließendem Plasmamembranzerfall in viele Vesikel und somit zur Auflösung der Zelle. Die DNA der Zelle wird schnell abgebaut und bildet dabei Bruchstücke, die den Nucleosomen-assoziierten DNA-Teilen entsprechen. Es kommt bei der Apoptose zu keiner Entzündungsreaktion oder Antikörperbildung. Biochemisch ist die Apoptose ein induzierbarer, energieabhängiger Vorgang mit gesteigerter RNA- und Proteinbiosynthese. Dies unterscheidet die Apoptose klar von der Zellnekrose, die häufig mehrere Zellen eines geschädigten Organs betrifft, bei der es zur Zellschwellung und zum Verlust der Membranintegrität, aber erst relativ spät zum DNA-Abbau kommt und bei der regelmäßig eine entzündliche und immunologische Reaktion zu beobachten ist [93, 29, 1]. Eine wichtige Rolle bei der Apoptose spielt die Aktivierung einer spezifischen Endonuclease, die das Chromatin fragmentiert und so den Zelltod auslöst. In Abbildung 1.9 sind einige Auslöser der Apoptose dargestellt. Verdeutlicht wird vor allem die Tatsache, dass der programmierte Zelltod auf verschiedene Art und Weise auslösbar ist.

Abbildung 1.9: Einige Mechanismen, die eine Apoptose auslösen können (nach [93])



1.8 Fragestellung der vorliegenden Arbeit

Bei Transplantationen ist die Langzeit-Immunsuppression ein Problem, dem eventuell damit begegnet werden kann, dass man perioperativ Stammzellen einsetzt, um einen immuntoleranten Chinärismus zwischen Empfänger und Spenderorgan zu erreichen [52]. Dies ist die Grundlage dieser Arbeit. Sie geht von einem Therapieansatz aus, bei dem perioperativ sowohl Stammzellen als auch Immunsuppressiva zum Einsatz kommen. Da Immunsuppressiva in die Signalkaskade und in die Aktivität des Immunsystems eingreifen, die auch bei der Bildung einer Toleranz sehr bedeutsam sind, soll in der vorliegenden Arbeit untersucht werden, ob und in welcher Weise auch die Stammzellen von den Immunsuppressiva beeinflusst werden.

Um dies zu untersuchen wurden eine menschliche (L87/4) und eine murine (RM26) Stammzelllinie verwendet. Die Zellen wurden mit Immunsuppressiva inkubiert, um deren Einfluss auf das Proliferationsverhalten zu untersuchen und um festzustellen, ob die Zellen dadurch vermehrt Apoptose begehen. Es wurden dabei sechs verschiedene Immunsuppressiva in unterschiedlichen Konzentrationen getestet.

Weiter wurde untersucht ob die Stammzellen die Kostimulatoren B7H1 und B7.1 exprimieren und wie diese Expression auf verschiedene Konzentrationen der Immunsuppressiva reagiert. Grundlegend war die Frage, ob durch die Immunsuppressiva das Gleichgewicht der gegensätzlich wirkenden Kostimulatoren bezüglich Toleranz und Abstoßung des Transplantates in eine bestimmte Richtung beeinflusst wird.

Die konkrete Fragestellung der vorliegenden Arbeit lautet:

- a) Verändern die einzelnen Immunsuppressiva in verschiedenen Konzentrationen das Proliferationsverhalten der Zellen?
- b) Wie sieht der Vergleich zwischen den einzelnen Immunsuppressiva bezüglich ihrer Wirkung auf das Proliferationsverhalten der Zellen aus?

- c) Verändern die einzelnen Immunsuppressiva in verschiedenen Konzentrationen das Apoptoseverhalten der Zellen?
- d) Wie sieht der Vergleich zwischen den einzelnen Immunsuppressiva bezüglich ihrer Wirkung auf das Apoptoseverhalten der Zellen aus?
- e) Werden auf den Stammzelllinien die Kostimulatoren B7H1 und B7.1 exprimiert?
- f) Wie verschiebt sich das Gleichgewicht zwischen den beiden Kostimulatoren bei Behandlung der Stammzellen mit verschiedenen Konzentrationen der Immunsuppressiva?