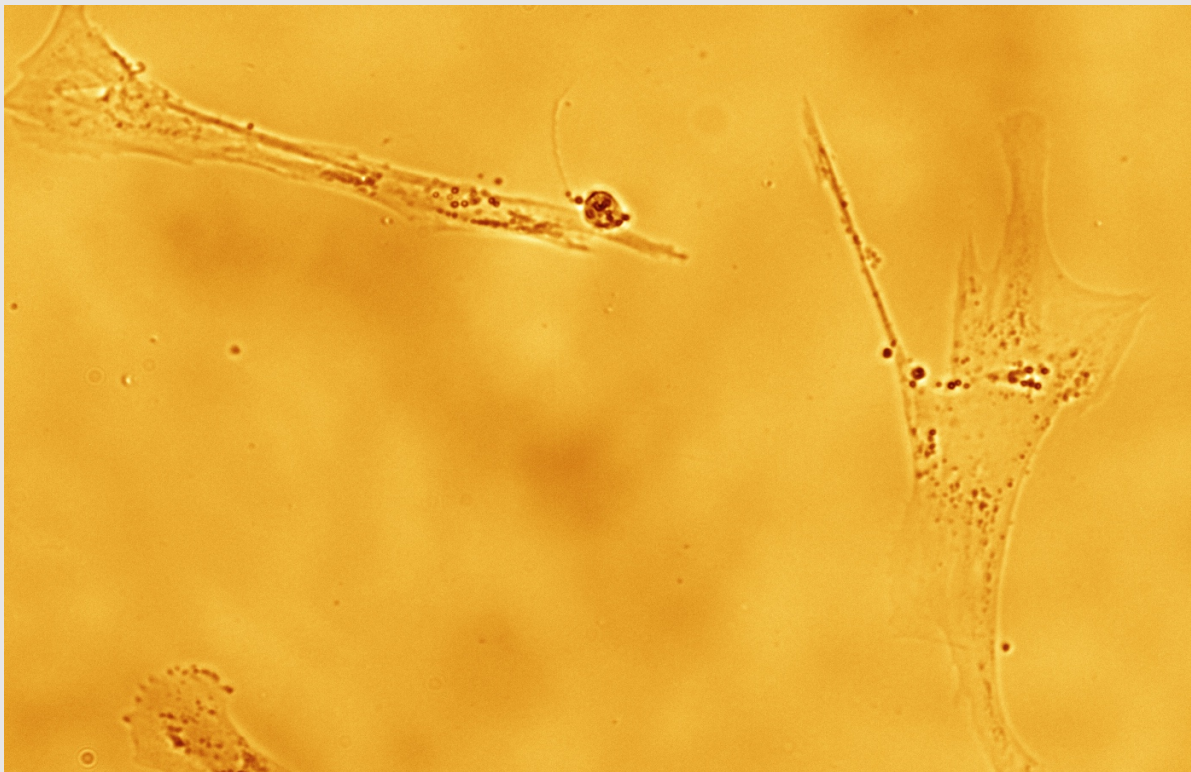


Maturaarbeit 2018 im Fach Biologie an der Kantonsschule Sursee

Ausgewählte Experimente zur Rolle der Lymphknotenstromazellen bei der Abstossung von Handtransplantationen



Autorin:

Mira Maranta, 6L
Schellenrainstr. 2
6210 Sursee

Betreuer:

Christoph Isenegger
Dorfstrasse 32b
6005 Luzern

Abstract

In dieser Arbeit werden ausgewählte Experimente zur Abstossung von Handtransplantaten durchgeführt. Die Rolle des Lymphsystems (vor allem der Lymphknoten, insbesondere der Lymphknotenstromazellen) bei einer Handtransplantation blieb bislang unerforscht. Ähnliche Versuche weisen aber stark daraufhin, dass die Lymphknotenstromazellen des Spenders einen positiven Effekt auf die Immunreaktion gegenüber des Handtransplantats aufweisen könnten.

Die Experimente werden in vitro mit Rattenzellen zweier Rattentypen durchgeführt. Dabei stellen die Zellen des einen Rattentyps den Transplantatempfänger dar und die Zellen des anderen Rattentyps den Spender des Transplantats. Es werden zwei unterschiedliche Arten von gemischten Lymphozytenreaktionen gemacht. Die zu analysierenden Parameter nach der gemischten Lymphozytenreaktion sind die T-Zellproliferation sowie die Anzahl Treg (regulatorische T-Zellen). Anhand dieser Parameter kann der Einfluss der Lymphknotenstromazellen von Spender und Empfänger getestet werden und mit einer normalen gemischten Lymphozytenreaktion (ohne Einfluss von Lymphknotenstromazellen) verglichen werden.

Es konnte gezeigt werden, dass die Lymphknotenstromazellen des Spenders die Immunreaktion des Empfängers positiv beeinflussen.

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung.....	5
1.1	Vascularized Composite Allotransplantation (VCA).....	6
1.2	Immunologische Grundlagen.....	7
1.2.1	Die spezifische Immunantwort.....	8
1.2.2	Antigene und Antikörper.....	9
1.2.3	Das MHC-Molekül.....	10
1.2.4	Abstossungsmechanismus des Allotransplantats.....	11
1.2.5	Akute Abstoßungsreaktion.....	13
1.2.6	Chronische Abstoßungsreaktion.....	13
1.2.7	Transplantat gegen Empfänger – Graft vs. Host disease (GVHD) ...	14
1.2.8	Immunologische Toleranz.....	14
1.2.9	Regulatorische T-Zellen (Treg).....	15
1.3	Das Lymphsystem.....	16
1.3.1	Lymphangiogenese und Transplantatabstoßung.....	17
1.3.2	Nutzung von lymphatischem Gewebe für die Transplantattoleranz	17
1.3.3	Die Lymphknotenstromazellen (LNSC).....	18
1.4	Gemischte Lymphozytenreaktion (MLR).....	18
1.5	Ziel und Hypothese.....	20
1.5.1	Das Ziel.....	20
1.5.2	Hypothese.....	20
2	Material und Methoden.....	21
2.1	Die Versuchstiere.....	21
2.2	Versuchsvorbereitung.....	22
2.2.1	LNSC züchten.....	22
2.2.2	Isolation von T-Zellen der Lewis Ratte anhand von MagnetSorting	24
2.2.3	Färbung der T-Zellen mit CFSE.....	25
2.2.4	Prästimulation der T-Zellen mit den LNSC für Experiment 1.....	26
2.2.5	Isolation und Bestrahlung der Milzzellen von Wistar- und Brown Norway Ratte.....	27
2.3	Die gemischte Lymphozytenreaktion (MLR).....	27
2.4	Immunphänotypisierung und Nachweis der Proliferation.....	30
2.4.1	Der Durchflusszytometer (FACS).....	30

2.4.2	Vorbereitung auf den FACS	30
2.4.3	Auswertung mit dem Computerprogramm FlowJo.....	31
3	Resultate	34
3.1	Reinheit und Verlust der T-Zellen	34
3.2	Experiment 1	35
3.2.1	Die T-Zellproliferation.....	35
3.2.2	Anzahl Treg Zellen.....	37
3.3	Experiment 2.....	39
3.3.1	T-Zellproliferation	39
3.3.2	Anzahl Treg Zellen.....	40
4	Diskussion	43
4.1	Allgemein	43
4.2	Die T-Zellproliferation im Zusammenhang mit den LNSC	44
4.3	Die Anzahl der Tregs in Bezug auf die LNSC	45
4.4	Überprüfung der Hypothesen	46
4.5	Folgeversuche	47
5	Reflexion.....	48
6	Quellenverzeichnis	50
6.1	Druck- und Onlinequellen	50
6.2	Abbildungsverzeichnis	51
7	Danksagung	53
8	Glossar	54
9	Anhang	57
10	Deklaration	64

1 Einleitung

Unter „Handtransplantation“ versteht man das Übertragen einer oder beider Hände eines Toten auf einen Menschen, dem eine oder beide Hände fehlen. Schon 1900 wurden erstmals Gliedmassen von Hunden transplantiert. Das Problem bei Transplantationen ist, dass der Körper alles Fremde abstösst. Wegen der heftigen Abstossungsreaktion starben die Tiere mit der transplantierten Gliedmasse schon nach kurzer Zeit. Daraufhin versuchte man die Abstossungsreaktion medikamentös zu unterbinden oder abzuschwächen. Die Transplantate mussten jedoch nach zwei Wochen wieder abgenommen werden, da trotz der Medikamente eine Abstossung stattfand. 1997 erschienen erste Berichte über eine erfolgreich verhinderte Abstossung einer transplantierten Hand an einem Menschen. Anhand einer bestimmten Wirkstoffkombination ist es gelungen, eine Abstossungstoleranz zu erlangen [1].

Bis heute wurde noch keine Handtransplantation in der Schweiz durchgeführt, da die Versicherungen nicht für die Behandlung mit Immunsuppressiva und den damit verbundenen Nebenwirkungen aufkommen [16]. Das medizinische Wissen und die chirurgische Infrastruktur dafür wären jedoch vorhanden. Trotz der kritischen Haltung der Versicherungen gegenüber der Handtransplantation forschte das Departement for BioMedical Research (DBMR) Bern zu konkreten Prozessen der lokalen Immunsuppression. Das TGMS – TAC Hydrogel, welches das Immunsuppressivum «Tracolimus» einschleust und somit lokal wirken kann, wird direkt in die transplantierte Hand gespritzt [17]. Ein Hydrogel ist eine Substanz, die zu einem Gel wird, sobald sie mit Wasser in Verbindung kommt. Durch diese Reaktion kann das Tracolimus im Hydrogel eingeschlossen werden [14]. Die lokale Behandlung mit dem immunsupprimierenden Hydrogel weist viel weniger Nebenwirkungen auf als die Behandlung mit bisher bekannten Methoden.

Bei einer Handtransplantation handelt es sich um eine Vascularized Composite Allotransplantation (VCA (s. Kap. 1.1)). Die Besonderheit an einer VCA ist ihre Gewebheterogenität. Durch die verschiedenen Gewebe von VCA-Transplantate ist diese Transplantatart aus immunologischer Sicht problematisch. Wegen der hohen immunologisch bedingten Abstossungsreaktionen gegenüber VCA-Transplantaten müssen die Empfänger des Transplantats lebenslang Immunsuppressiva einnehmen.

Die Nebenwirkungen, die durch die Immunsuppressiva herbeigeführt werden, stellen einen zentralen Kritikpunkt gegen VCA Transplantationen dar. Das Ziel der aktuellen Forschung zu VCA Transplantationen ist es, die Transplantattoleranz zu fördern und damit die Medikamenteneinnahme nach der Transplantation zu minimieren.

Für mich war schon zu Beginn klar, dass ich gerne eine Maturaarbeit im naturwissenschaftlichen Bereich schreiben möchte. Aufgrund meines Interesses an der Humanmedizin gelangte ich auf der Suche nach geeigneten Themen an das DBMR Bern. Dort bot sich mir die Möglichkeit, spezifischen Fragestellungen zur Handtransplantation nachzugehen.

1.1 Vascularized Composite Allotransplantation (VCA)

Die Vascularised Composite Allotransplantation ist eine Transplantation von mehreren Geweben wie Muskel, Knochenerven und Haut, die als eine Einheit gelten (z.B. Hand oder Gesicht) und von einem verstorbenen Spender zu einem Empfänger mit einer schweren Verletzung transplantiert wird. Wie schon erwähnt, sind VCA Transplantationen im Vergleich zu anderen Organtransplantationen wie beispielsweise eine Herz- oder Nierentransplantation, bei denen die Transplantationszusammensetzung *homolog*¹ ist, schwieriger durchzuführen (s. Abb. 1). Die am häufigsten durchgeführten VCA finden im Gesicht oder an der Hand statt. Weltweit wurden bis heute über 100 Transplantationen dieser Art durchgeführt. Da der Empfänger und der Spender nicht-identisches genetisches Material besitzen, kommt es zur natürlichen Abstossungsreaktion des Transplantats. Um die Abstossung zu unterdrücken, müssen die Empfänger des Transplantats lebenslang mit Immunsuppressiva behandelt werden.

Diese Medikamente verursachen starke Nebenwirkungen wie *opportunistische Infektionen*, Stoffwechselstörungen oder Organschäden [18].

¹ Alle kursiven Begriffe im Text sind im Glossar (Kap. 8) erklärt und alphabetisch geordnet.

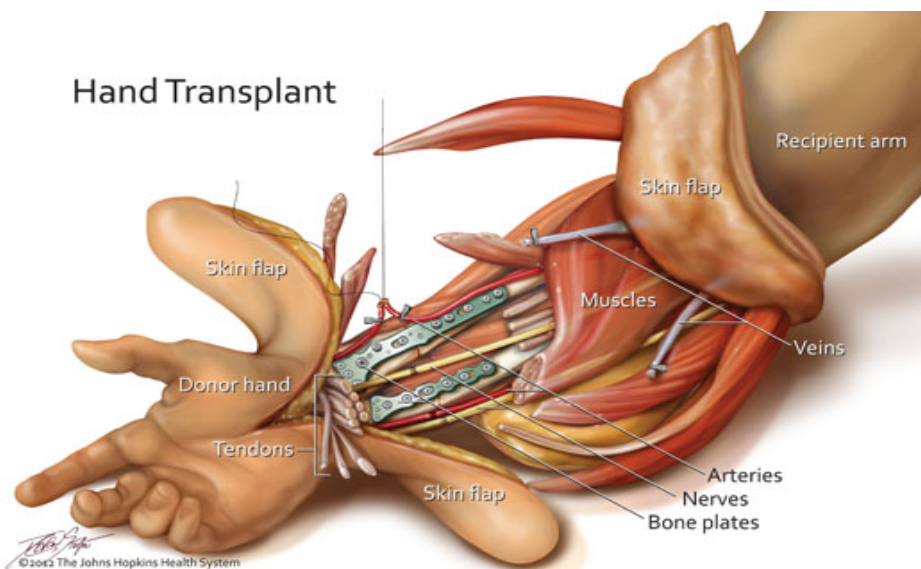


Abb. 1: Handtransplantat mit integrierten Knochenplatten. Zu sehen sind die verschiedenen Gewebetypen.

Aufgrund dessen müssen Mechanismen erforscht werden, die die Immunsuppressiva reduzieren oder sie sogar ganz vermeiden. Zuerst muss man den Mechanismus der Abstoßung richtig verstehen.

1.2 Immunologische Grundlagen

Bei der Immunabwehr von Fremdkörpern spielen das Immunsystem und das Lymphsystem (s. Kap. 1.3) eine zentrale Rolle. Das Immunsystem weist sowohl angeborene als auch erworbene Anteile auf. Letzteres setzt den Kontakt mit potenziellen Erregern voraus [19]. Die eigentlichen Abwehrzellen sind Lymphozyten, eine bestimmte Gruppe von weissen Blutzellen, und nutzen neben den Blutbahnen das lymphatische System als Netzwerk [5]. Sie werden auch in lymphatischen Organen wie beispielsweise der Milz, dem Knochenmark oder dem Thymus produziert, gelagert und reifen je nach Typ auch dort. Das Immunsystem hat viele verschiedene Abwehrmechanismen. Bei der Abstoßungsreaktion von Transplantationen handelt es sich um die spezifische Immunabwehr. Dass das Immunsystem ein ausgeklügelter und noch immer zum Teil unerforschter Mechanismus ist, macht es nicht einfacher, die Abwehrmechanismen zu umgehen und eine Transplantattoleranz zu schaffen [6].

1.2.1 Die spezifische Immunantwort

Neben der unspezifischen Immunabwehr, die auf Zellschäden jeder Art reagiert (z.B. beim Eindringen von Bakterien durch eine Wunde oder durch eine Vergiftung), gibt es auch die spezifische Immunantwort [5]. Die spezifische Immunreaktion ist Teil des erworbenen Immunsystems. Lymphozyten erkennen spezifische Erreger, im Fall einer Transplantation sind das die Zellen des Transplantats, die nicht-identisches Genmaterial aufweisen. Diese werden durch *Makrophagen* und spezifischen Antikörpern bekämpft [7]. Es werden B- und T-Lymphozyten aktiviert. Die B-Lymphozyten stellen zu den Antigenen des Erregers passende Protein-Antikörper her. Die T-Lymphozyten vermehren sich und greifen die fremden Zellen an [5].

Bezogen auf eine Transplantation wird das Transplantat schneller und heftiger abgestossen, wenn sich die Proteine der Antigene von Spender- und Empfängerzellen stark unterscheiden [7].

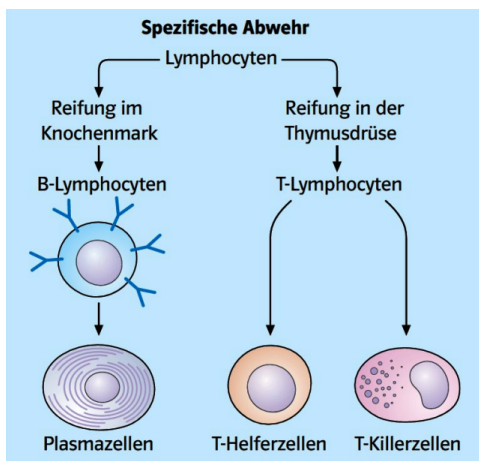


Abb. 2: Die Bildung von Lymphocyten bei einer spezifischen Abwehr.

Es können zwei Arten von spezifischer Immunität unterschieden werden: die humorale und die zellvermittelte Immunität.

1.2.1.1 Die humorale Immunität

Die *humorale Abwehr* greift die Erreger nur indirekt an. Die Anwesenheit von fremden Antigenen regt die Produktion von B-Zellen an. Die B-Zellen entwickeln sich zu Plasmazellen, wo Antikörper hergestellt werden. Die Antikörper docken dann an die fremden Antigene an, die auf der Zelloberfläche der Erregerzellen präsentiert werden.

Die B-Zellen bilden ausserdem Gedächtniszellen, welche bei einer zweiten Infektion mit demselben Erreger das fremde Antigen noch viele Jahre später wiedererkennen, um dann erneut die Abwehr zu starten [5].

1.2.1.2 Die zellvermittelte Immunität

Die zellvermittelte Immunität funktioniert anhand von T-Zellen, welche in der Thymusdrüse produziert werden. Die T-Zellen erkennen Antigene und vermehren sich ab dann sehr schnell. Es werden viele verschiedene Typen von T-Zellen produziert: Die zytotoxischen T-Zellen greifen den Erreger direkt an. Sie gelangen in den Blutstrom und dadurch an die infizierte Stelle, wo sie die infizierten Zellen zerstören. Die T-Helferzellen regen die Produktion von B-Lymphozyten und Makrophagen, die Zelltrümmer und Mikroorganismen einnehmen, zusätzlich an. Zum Schluss werden T-Suppressorzellen produziert, welche die Reaktion stoppen, indem sie die Funktion anderer T-Zellen und B-Zellen unterdrücken [5].

1.2.2 Antigene und Antikörper

Das Zusammenspiel von Antigenen und Antikörpern ist ausschlaggebend für die Erkennung von fremden Geweben. Antikörper sind körpereigene Proteine, die von B-Zellen produziert werden und fremde Antigene erkennen können. Jedes Individuum hat eigene Antigene, die auf den Zelloberflächen präsentiert werden. Fremde Antigene stimulieren die Produktion von dazu passenden Antikörpern. Die produzierten Antikörper binden die Antigene (Schlüssel-Schloss-Prinzip (s. Abb.3)). Dadurch werden fremde Zellen vom Immunsystem erkannt. Die verschiedenen Zelltypen, welche an einer Immunreaktion beteiligt sind, können durch bestimmte Marker festgestellt werden. *Monoklonale Antikörper* binden an spezifische Rezeptoren und können somit das Vorhandensein von verschiedenen Zelltypen nachweisen.

T-Helferzellen und zytotoxische T-Zellen zum Beispiel weisen CD-Oberflächenmoleküle auf. Anhand der monoklonalen Antikörper, die sich spezifisch an CD4-Rezeptoren der T-Helferzellen binden und anhand von Antikörpern, die sich an CD8-Rezeptoren der zytotoxischen T-Zellen binden, können diese Zelltypen identifiziert werden [7] [19].

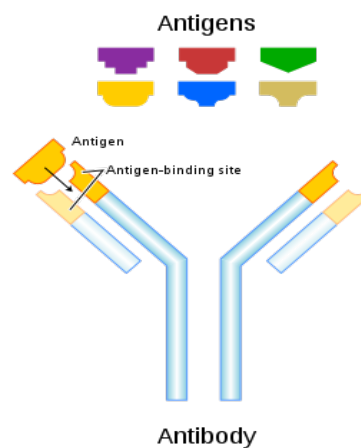


Abb. 3: Bindung von Antigen und Antikörper

1.2.3 Das MHC-Molekül

Um die Abstossungsreaktion eines Transplantats richtig zu verstehen, muss man die hauptverantwortlichen Moleküle genauer betrachten. Man nennt diese Haupt-histo-kompatibilitäts-komplex (MHC). Jeder Mensch besitzt zwei verschiedene MHC-Moleküle. Die MHC-Moleküle sind bei jedem Menschen verschieden, ausser bei eineiigen Zwillingen. MHC-Moleküle sind verantwortlich dafür, dass Antigene den T-Zellen angezeigt werden und erkannt werden können. So kann das Immunsystem zwischen körperfremden und körpereigenen Zellen unterscheiden. Es gibt zwei verschiedene Klassen von MHC-Molekülen [3].

MHC-Klasse 1 Moleküle kommen in allen Zellen mit einem Zellkern vor. Ist eine körpereigene Zelle von fremden Antigenen befallen, werden Bruchstücke dieser Antigene auf der Oberfläche der Zelle mithilfe des MHC-Klasse 1 Moleküls präsentiert und können dann von zytotoxischen T-Zellen und von CD8-Antikörpern erkannt werden. Infizierte Zellen können ausserdem für sie untypische Antigene produzieren, welche dann ebenfalls als fremd gelten und von den MHC-Molekülen präsentiert werden [2]. Sobald CD8 Rezeptoren oder zytotoxische T-Zellen an die Zelle angedockt haben, führt das zur *Apoptose* der Zelle [3].

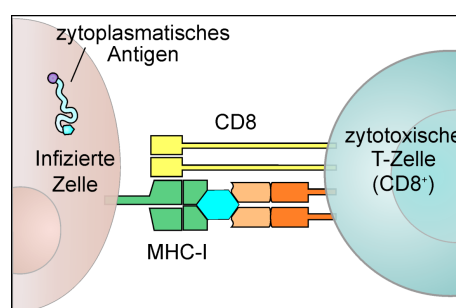


Abb. 4: Infizierte Zelle mit MHC-Klasse 1 Molekül und eine bindende zytotoxische T-Zelle.

MHC-Klasse 2 Moleküle kommen nur auf spezifischen Zellen des Immunsystems vor, nämlich auf antigenpräsentierenden Zellen (APCs), beispielsweise auf B-Zellen, Makrophagen oder *dendritischen Zellen*. Die MHC-Klasse 2 Moleküle werden von CD4-Antikörper und von T-Helferzellen erkannt. APCs können Antigene aufnehmen und verarbeiten, sodass diese danach auf der Zelloberfläche anhand der MHC-Klasse 2 Moleküle präsentiert werden [3].

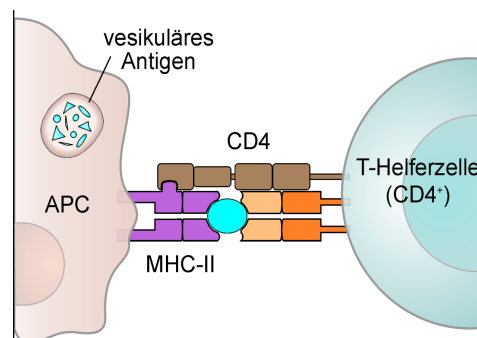


Abb. 5: APC mit MHC – Klasse 2 Molekülen und ein bindender CD4 Rezeptor.

1.2.4 Abstossungsmechanismus des Allotransplantats

Die MHC-Gene entscheiden darüber, ob ein Transplantat abgestossen oder toleriert wird. Da die MHC-Moleküle sehr *polymorph* sind, haben nie zwei Individuen exakt dasselbe Genmuster der MHC-Moleküle. So folgt also immer eine Abstossung, ausser bei eineiigen Zwillingen, denn ihre MHC-Moleküle besitzen identisches Genmaterial [2].

Bei einer Allotransplantation von nicht genidentischem Empfänger und Spender folgt natürlicherweise eine Abstossung[3]. Um vor der Transplantation auszuschliessen, dass der Empfänger bereits Antikörper gegen das Transplantat besitzt, wird eine «Kreuzprobe» durchgeführt. Dabei wird Blut vom Empfänger mit Blut des Spenders gemischt und die Reaktion verfolgt. Zeigt sich, dass der Empfänger tatsächlich schon Antikörper gegen das Transplantat besitzt, kann die Transplantation nicht durchgeführt werden, da das Transplantat noch während der Operation abgestossen werden würde. Diese Art von Abstossung nennt man «hyperakute Transplantatabstossung» [2].

Die MHC-Moleküle des Spenders können vom Empfänger auf direktem Weg und indirektem Weg erkannt werden.

Auf dem direkten Weg docken Empfänger-T-Zellen an die MHC-Moleküle des Spenders an, denn T-Zellen besitzen eine natürliche Anziehung zu MHC-Molekülen, egal ob diese

eigen oder fremd sind. Werden die MHC-Moleküle von den T-Zellen erkannt, können CD4- und CD8-Zellen aktiviert werden (s. Abb. 6).

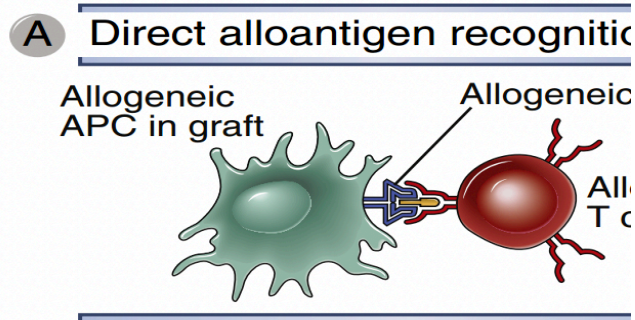


Abb. 6: Direkte Alloantigenerkennung, Erkennung eines Spender MHC-Moleküls durch Empfänger T-Zelle.

Der indirekte Weg funktioniert wie eine normale Antigenpräsentation. Bruchstücke von *allogenen* MHC-Molekülen werden von Empfänger-APCs verarbeitet und präsentiert (s. Abb. 7). Bei einer indirekten Erkennung können nur CD4-Zellen und T-Lymphozyten aktiviert werden, denn die Empfänger-APCs besitzen nur MHC-Klasse 2 Moleküle [3].

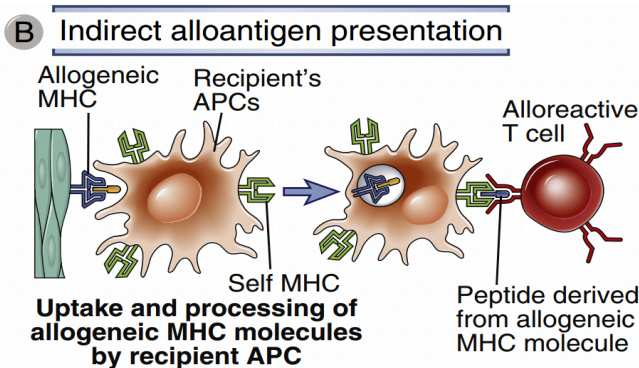


Abb. 7: Indirekte Alloantigenerkennung, erfassen und verarbeiten eines allogenen MHC-Moleküls von einem Empfänger APC.

Die Abstossung erfolgt beim direkten Weg schneller als beim indirekten, denn die Spender-APCs aus dem Transplantat aktivieren die T-Zellen des Spenders sehr schnell. Mit der Zeit nimmt die Anzahl von Spender-APCs ab. Die Abstossung mit dem indirekten Weg erfolgt langsamer und hält ein Leben lang an, denn die Empfänger-APCs müssen die Spenderantigene zuerst erfassen und verarbeiten. Durch die Aufnahme der Spenderantigene entstehen dann auch Gedächtniszellen [3].

Neben der hyperakuten Abstossung (s. Abb. 8, A) kann ein Transplantat auch akut oder chronisch abgestossen werden.

1.2.5 Akute Abstossungsreaktion

Die akute Abstossung beginnt, sobald der die Effektorzellen (T-Zellen) des Empfängers die allogenen Zellen erkannt haben und dazu passende Antikörper hergestellt wurden (s. Abb. 8, B). Akute Abstossung entsteht also zellvermittelnd oder humoral durch die Erkennung der fremden MHC Moleküle [25].

1.2.6 Chronische Abstossungsreaktion

Die chronische Abstossung erfolgt auf dem indirekten Weg. Eine chronische Abstossung kann auch noch Monate oder Jahre nach der Transplantation auftreten. Es kommt dann zu einer chronischen Abstossung, wenn CD4-Zellen, die auf MHC-Klasse 2 Moleküle reagieren, zu zytokinproduzierenden Effektorzellen differenzieren (s. Abb. 8, C). Durch die Zytokine wird eine Entzündung ausgelöst, und B-Zellen werden zusätzlich angeregt, mehr Antikörper gegen die Alloantigene zu produzieren [25].

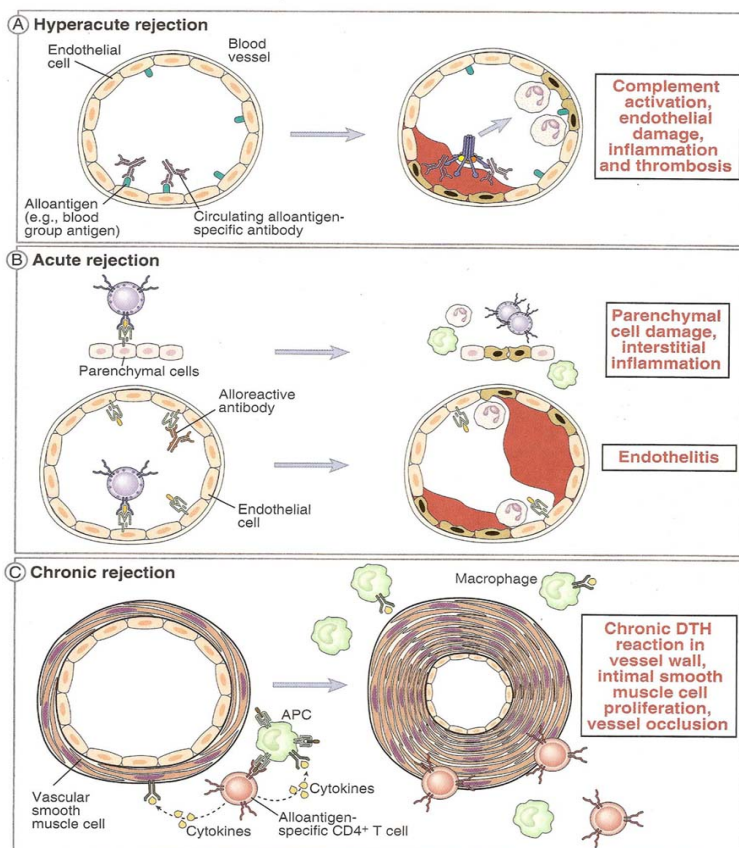


Abb. 8: Alle drei Arten der Transplantatabstossung in einer Blutbahn sind dargestellt.

1.2.7 Transplantat gegen Empfänger – Graft vs. Host disease (GVHD)

Nicht nur der Empfänger eines Transplantats kann auf die Spenderzellen reagieren, der Mechanismus kann auch umgekehrt ablaufen. Falls die Empfängerzellen nicht auf das Transplantat reagieren und nicht versuchen, die allogenen Zellen zu zerstören, könnten dafür die Spenderzellen reagieren. Die GVHD wird dadurch verursacht, dass die T-Zellen des Spenders die allogenen Zellen des Empfängers erkennen und dann den Körper angreifen. Eine GVHD kann akut oder auch chronisch ablaufen [25].

Die akute GVHD tritt schon wenige Stunden bis Tage nach der Transplantation auf. Eine akute GVHD kommt von der sehr unterschiedlichen Struktur der MHC Moleküle von Spender und Empfänger. Anzeichen einer akuten GVHD ist eine gerötete Haut des Transplantats. Ausserdem können multiple Zellen im Innern des Körpers (z. B. die Darmwand) geschädigt werden. Das kommt davon, dass bei der akuten GVHD *Endothelzellen* in der Leber oder in der Haut absterben [6] [25].

Die chronische GVHD wird ebenfalls durch eine schlechte Kompatibilität von Empfänger und Spender verursacht. Jedoch kann sie auch noch viele Jahre nach der Transplantation auftreten. Ursache einer chronischen GVHD sind (neben der unterschiedlichen MHC Molekülen) Stammzellen des Spenders, welche durch Zellteilung reife T-Zellen produzieren, die dann die Zellen des Empfängers angreifen. Chronische GVHD kann alle Organe des Empfängerkörpers befallen [6] [25].

1.2.8 Immunologische Toleranz

Das menschliche Immunsystem besitzt eine immunologische Toleranz gegenüber den eigenen Antigenen. Wäre diese Toleranz nicht vorhanden, käme es zur ständigen Bekämpfung der eigenen Körperzellen, wie es beispielsweise bei Autoimmunerkrankungen der Fall ist. Die Toleranz kann zentral und peripher gebildet werden [3].

Während der Lymphozytenreifung in den primären Lymphorganen, beispielweise in Thymus und Knochenmark, differenzieren sich die verschiedenen Typen von Lymphozyten. Dort beginnt die zentrale Toleranz. Lymphozyten, die auf eigene Antigene reagieren, werden sofort zerstört (Apoptose). Auch die regulatorischen T-Zellen (Treg) werden im Thymus gebildet. Sie sind verantwortlich dafür, dass die Toleranz aufrecht erhalten bleibt (s. Abb. 9).

Die periphere Toleranz findet – wie der Name bereits sagt – in der Peripherie statt und betrifft gereifte Lymphozyten, die die zentrale Toleranz umgangen haben.

Reife T-Lymphozyten, welche auf körpereigene Antigene reagieren, zerstören sich selbst oder ihre Reaktion auf die körpereigene Zelle wird unterdrückt. Zusätzlich können Treg Zellen T-Lymphozyten unterdrücken, welche auf eigene Antigene reagieren [3] (s. Abb. 9).

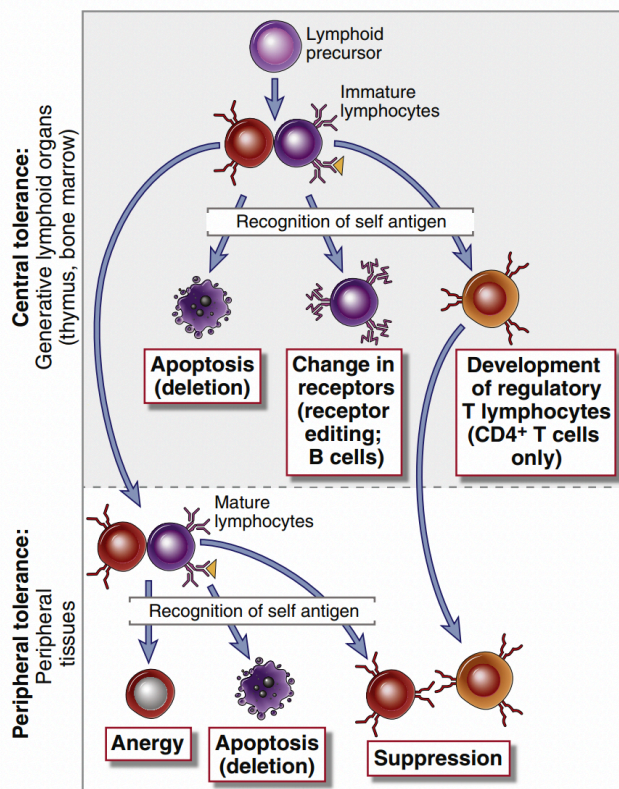


Abb. 9: Die zentrale und periphere Immuntoleranz.

1.2.9 Regulatorische T-Zellen (Treg)

Wie oben schon erwähnt, halten Treg Zellen die immunologische Toleranz aufrecht und unterdrücken Immunantworten gegen körpereigene Zellen. Sie entstehen im Thymus und sind eine Untergruppe von CD4-T-Lymphozyten. Die Produktion von Treg Zellen beginnt dann, wenn ein T-Lymphozyt eine körpereigene Zelle als fremd erkennt.

Treg Zellen können die Aktivierung und Funktion von anderen T-Lymphozyten unterdrücken (Suppression) und somit verhindern, dass diese auf körpereigene Zellen reagieren [3].

Experimente des DBMR Bern haben gezeigt, dass Tregs die Transplantattoleranz fördern können. Werden Tregs bei einer Transplantation in das Transplantat injiziert, kann eine akute und chronische Form von Transplantatabstossung verhindert werden. Die Tregs können die Aktivierung von anderen T-Zellen und alloantigenpräsentierende APCs unterdrücken und verhindern somit eine Reaktion auf allogene Antigene [6].

1.3 Das Lymphsystem

Bei der Abstossung von Transplantationen ist nicht nur das Immunsystem entscheidend, auch das Lymphsystem spielt eine zentrale Rolle. Es ist an der Produktion von Lymphozyten beteiligt, welche bei der Immunantwort wichtig sind. Grundsätzlich besteht das Lymphsystem aus spezialisierten Organen und Gefässen. Im Lymphsystem wird die Lymphe, eine klare Flüssigkeit, von den Lymphorganen zu den Lymphknoten und von diesen wiederum ins Blut transportiert [3]. Durch die Lymphe werden ausserdem transportiert fremde Antigene und alloantigenpräsentierende APCs zu den Lymphknoten transportiert. Die Lymphknoten aktivieren dann Lymphozyten, welche eine Immunreaktion auslösen.

Die Aktivierung erfolgt folgendermassen: naive T-Lymphozyten gelangen nach ihrer Reifung im Thymus (primäres Lymphorgan) in die Blutbahn. Naive Zellen sind Zellen, die noch keinen Kontakt zu Erregern hatten und noch nicht aktiviert wurden. Durch geöffnete Arteriolen können sie in die Milz oder in andere sekundäre Lymphorgane wie beispielsweise in die Lymphknoten eindringen. Falls die naiven T-Zellen in den sekundären Lymphorganen keine fremden Antigene erkennen, werden sie wieder in die Blutbahn zurückgeleitet. Dieser Kreislauf dauert so lange, bis ein fremdes Antigen erkannt wird (s. Abb. 10). Ab dann werden die Lymphozyten aktiviert und differenzieren sich. Ausserdem startet die *Proliferation*. Nach der Aktivierung kehren die Lymphozyten in den Kreislauf zurück, wo sie zu der Infektionsstelle gebracht werden [3].

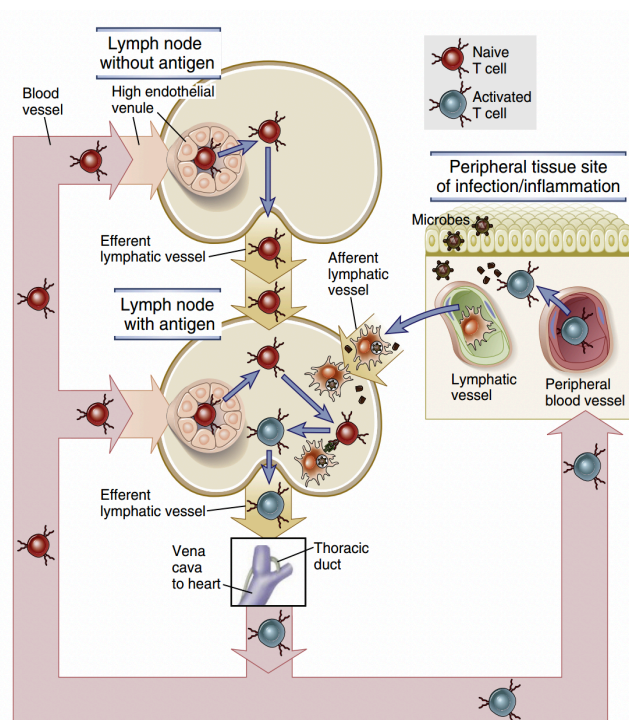


Abb. 10: Kreislauf von naiven und aktivierten T-Lymphozyten im Lymphsystem.

Bezüglich der Abstossungsreaktion von Allotransplantaten könnte das Lymphsystem zwei gegenteilige Auswirkungen haben, die genaue Wirkung ist jedoch noch zu erforschen.

1.3.1 Lymphangiogenese und Transplantatabstossung

Wenn man die Aufgabe des Lymphsystems betrachtet, kann man annehmen, dass das Lymphsystem ausschliesslich schädlich auf das Transplantat wirkt, da es die Immunreaktion fördert. Zudem findet nach einer Transplantation die Lymphangiogenese statt. Damit bezeichnet man die Bildung neuer Lymphgefässe nach der Transplantation. Sie ermöglicht den Transport von allogenen Antigenen und APCs, wodurch dann die Immunantwort gegen das Transplantat aktiviert wird. In Experimenten bei anderen Transplantationen (z.B. von Hornhaut oder von Inselzellen des Pankreas bei Mäusen) konnte eine grössere Transplantattoleranz beobachtet werden, wenn man die Lymphangiogenese vor der Operation durch verschiedene *Inhibitoren* spezifisch hemmte [3]. So könnte sich die Unterdrückung der Lymphangiogenese positiv auf die Transplantattoleranz auswirken.

1.3.2 Nutzung von lymphatischem Gewebe für die Transplantattoleranz

Andere Überlegungen versuchen, einen für das Transplantat positiven Effekt des lymphatischen Gewebes zu finden. Da lymphatisches Gewebe bei der Toleranzbildung und der Immunreaktion eine grosse Rolle spielt, könnte lymphatisches Gewebe genutzt werden, um die Transplantattoleranz zu fördern. Eine Lymphknotentransplantation bei Mäusen zeigte, dass die Genexpression von MHC-Klasse-2-Molekülen bei lymphatischen Endothelzellen für das Vorhandensein von Tregs sehr entscheidend ist, da die Selbstantigenpräsentierung (Präsentierung von körpereigenen Antigenen) gestärkt zu sein scheint. Zwar wurde bezüglich lymphatischer Endothelzellen bei einer VCA noch nicht geforscht, es ist jedoch anzunehmen, dass dort ähnliche Effekte zu beobachten sein werden. Die lymphatischen Endothelzellen würden wie eine Art «Antigenreservoir» wirken, wenn ihnen die Gewebeantigene des Spenders präsentiert werden. Durch die Präsentation von diesen Antigenen auf der Oberfläche der Endothelzellen werden spenderspezifische Tregs aktiviert und proliferieren, sodass eine Toleranz gegenüber dem Transplantat geschaffen wird [3].

1.3.3 Die Lymphknotenstromazellen (LNSC)

Die Lymphknotenstromazellen (LNSC, engl.= lymph node stromal cell) sind entscheidend für die Struktur der Lymphknoten. Die Lymphknoten und dessen Struktur sind insofern wichtig, da die Lymphknoten die periphere Toleranz (s. 2.2.8) beeinflussen. Die Antigenpräsentation im Lymphknoten ist ein wichtiger Bestandteil der Toleranzbildung gegenüber Alloantigenen. Im Lymphknoten werden T-Zellen zu Tregs spezialisiert, welche dann für die Transplantattoleranz essenziell sind. Die Stromazellen der Lymphknoten befinden sich in deren zentral gelegenen Medulla. Als Medulla (oder auch Mark) wird immer das Innerste (der Kernbereich) eines Organs bezeichnet [24]. LNSC bestehen aus verschiedenen Zellpopulationen, zum Beispiel aus Blutendothelzellen oder lymphatischen Endothelzellen sowie *fibroblastischen retrikulären Zellen*. Diese Zelltypen sind alle verantwortlich für die Struktur eines Gefäßes oder eines Gewebes. Durch ihre Position im Lymphknoten haben die LNSC wichtige Aufgaben. Beispielsweise sind sie für die molekularen Signale zuständig, welche die Lymphozyten an den richtigen Ort im Lymphknoten verteilen. Die verschiedenen Zelltypen in den LNSC umfassen ausserdem mehrere Unterdrückungsmechanismen, wie zum Beispiel die Zerstörung von selbstreaktiven T-Zellen. Durch diese Mechanismen sind die LNSC wichtig für die Toleranz gegenüber vielen verschiedenen Antigenen bei Immunantworten [21].

1.4 Gemischte Lymphozytenreaktion (MLR)

Die gemischte Lymphozytenreaktion (MLR= engl. Mixed Lymphocyte Reaction) ist eine Reaktion, die *in vitro* durchgeführt wird. Bei dieser Reaktion werden mononukleare Blutzellen (T-Zellen, B-Zellen, natürliche Killerzellen, Phagozyten, *dendritische Zellen*) vom Spender und vom Empfänger eines Transplantats gemischt. Die MLR gibt Auskunft über die Verträglichkeit von Empfänger- und Spenderzellen [2]. Diese Methode wird genutzt, um neue Therapien im Bereich der Abstossung von Transplantaten *in vitro* zu testen, bevor man sie *in vivo* anwendet [14]. Es wird quasi die Situation einer Transplantation *in vitro* imitiert.

Je unterschiedlicher die Struktur der MHC Moleküle dieser Individuen sind, desto weniger Verträglichkeit ist vorhanden. Nach der MLR läuft die Reaktion während ca. fünf bis sieben Tagen ab. Nachdem sie abgelaufen ist, wird das Ergebnis mittels eines Durchflusszytometers (FACS) und des dazugehörigen Computerprogramms «FlowJo» analysiert. Auf diese Analysegeräte wird später noch kurz eingegangen.

Vor allem die *T-Zellproliferation* ist entscheidend. Je mehr die T-Zellen proliferieren, desto heftiger wird die Abstoßung gegenüber dem Spendertransplantat sein [14]. Falls das Resultat eine extrem hohe T-Zellproliferation zeigt, ist der Spender ungeeignet oder die zu testende Therapie hat keine positive Wirkung gezeigt. Falls man eine therapeutische Methode testen will, muss man zur Kontrolle immer eine zweite MLR durchführen, bei welcher die Therapie nicht angewendet wird, um einen Vergleich zu haben.

Es gibt zwei verschiedene Arten von MLR. Bei der «Two-Way-MLR» werden die Blutzellen nicht beeinflusst, was dazu führt, dass sowohl die Spenderzellen als auch die Empfängerzellen reagieren. Also proliferieren Zellen vom Spender und die T-Zellen des Empfängers.

Die «One-Way-MLR» wird gemacht, wenn man nur die Proliferation des Empfängers betrachten möchte. Denn bei dieser Art werden die Lymphozyten des Spenders vor der MLR mit Gammastrahlung behandelt, sodass diese nur als Stimulatoren wirken, aber selber nicht reagieren [15].

Um die Zellen zu unterscheiden, werden sie vor der MLR mit passenden Antikörper versetzt. Jeder Art Antikörper dockt an andere T-Zelltypen an. Um die Proliferation der T-Zellen messen zu können, müssen die Zellen vor der MLR mit einem Farbstoff, dem *CFSE*, behandelt werden. Die Proliferation kann gemessen werden, indem die Stärke des Farbstoffs beurteilt wird. Denn je stärker die Zellen proliferieren, desto weniger intensiv wird der Farbstoff. Die Stärke der Zellproliferation wird anhand des Proliferationsindex angegeben [15].

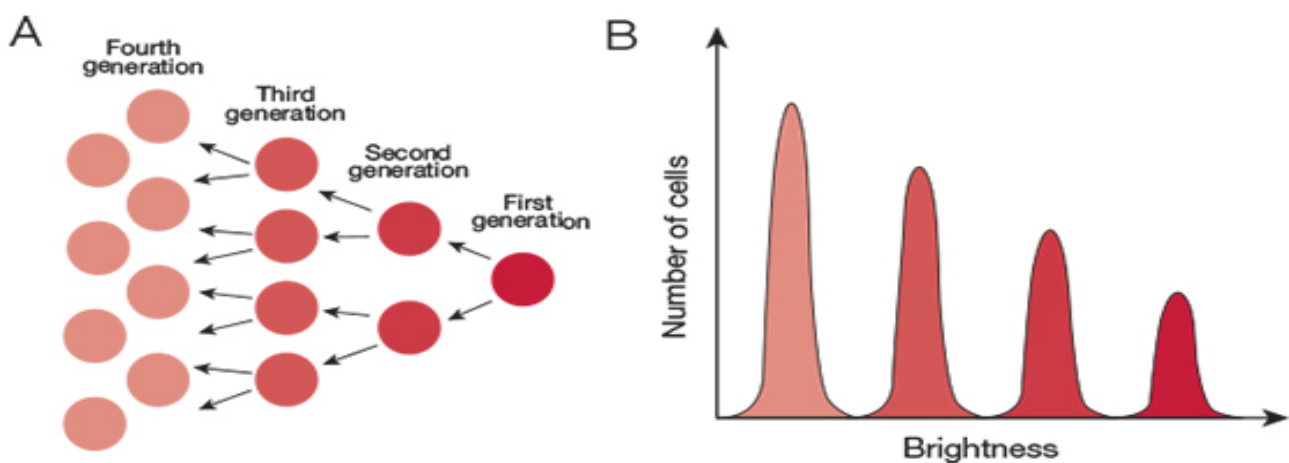


Abb. 11: Das Prinzip der Zellproliferation anhand der gefärbten Zellen. Bei jeder neuen Zellgeneration nimmt die Konzentration des Farbstoffes ab.

1.5 Ziel und Hypothese

1.5.1 Das Ziel

Bislang gab es keine Experimente zu den Auswirkungen von Lymphknotenstromazellen auf die Abstossung von Handtransplantaten.

Die Rolle des lymphatischen Systems wurde in folgenden zwei Experimenten genauer untersucht. Da bei einer VCA auch Lymphgefäße transplantiert werden, ist es naheliegend, dass diese eine zentrale Rolle spielen. In diesen Experimenten wurde untersucht, ob Lymphknoten (insbesondere Lymphknotenstromazellen) des Spenders die Transplantatabstossung durch die Antigentransportation verschlimmern oder ob sie eine Transplantattoleranz durch die Endothelzellen fördern können. Das Ziel der Experimente war, die Auswirkung von Lymphknotenstromazellen der Spenderratte und Lymphknotenstromazellen der Empfängerratte auf das Transplantat zu untersuchen. Die Resultate sollen eine erste Grundlage für die Entwicklung lymphatischer Methoden gegen die Abstossung von VCA Transplantaten sein.

1.5.2 Hypothese

Da die Auswirkung von lymphatischen Zellen auf die allospezifische T-Zell Aktivierung noch nicht bekannt ist, war der Ausgang der Experimente nicht genau vorauszusehen. Doch aufgrund des bereits existierenden Vorwissens über die Funktion der Lymphknotenstromazellen ergab sich folgende Hypothese:

Die Spenderlymphknotenstromazellen können die Abstossung verringern, da sie die Bildung und Aktivierung von spenderspezifischen T-regulatorischen Zellen (Treg) fördern und die T-Zellproliferation hemmen. In diesem Fall wird ein tieferer Proliferationsindex der T-Zellen als normalerweise erwartet und im besten Fall gibt es dazu einen leicht erhöhten Anteil von Tregs [14].

Ergänzend zum oben erwähnten offenen Ausgang der Experimente ist Folgendes anzumerken: Es ist nicht ausgeschlossen, dass die Stromazellen die Abstossungsreaktion auch negativ beeinflussen. Zudem könnten Empfängerlymphknotenstromazellen spezifisch immunsuppressiv auf die Empfängerzellen wirken [14].

2 Material und Methoden

Es wurde mit Stromazellen von Lymphknoten experimentiert. Für die Experimente wurden Rattenzellen verwendet. Die Auswirkung der Lymphknotenstromazellen (LNSC) auf die Zellen wurden anhand einer MLR getestet. Nach der Durchführung der Experimente in vitro wurden anschliessend die gewonnenen Erkenntnisse in vivo an dem Brown-Norway-zu-Lewis-Hinterbeintransplantationsmodell getestet. Das bedeutet, dass das Hinterbein von einer Brown Norway Ratte zu einer Lewis Ratte transplantiert wird. Jedoch konzentriert sich diese Arbeit ausschliesslich auf die in-vitro-Experimente. Zwei verschiedene in-vitro-Experimente wurden durchgeführt:

Experiment 1: T-Zellen des Transplantatempfängers (Lewis Ratte) wurden vor der MLR mit LNSC der Brown Norway Ratte und der Lewis Ratte prästimuliert. Das bedeutet, die LNSC und die Lewis T-Zellen wurden während zwei Tagen inkubiert. So besteht die Möglichkeit, dass die Zellen schon vor der MLR aufeinander reagieren. Die T-Zellen der Lewis Ratte sind die zu beobachtenden Reaktorzellen. Nach der Prästimulation wurde die MLR durchgeführt. Als Stimulatoren wurden Milzzellen von der Brown Norway Ratte und von einer «dritten Partie» (Wistar Ratte), die nichts mit der Transplantation zu tun hat (positive Kontrolle), verwendet. Zur Kontrolle wurde eine nicht mit LNSC-prästimulierte MLR durchgeführt.

Experiment 2: Hier fand die MLR direkt statt. Das heisst, die LNSC der Lewis und der Brown Norway Ratte wurden direkt auf die MLR-platte kultiviert, und die T-Zellen von der Lewis Ratte wurden mit den Zellen des Spenders (Brown Norway Ratte) und der dritten Partie (Wistar Ratte) direkt auf die LNSC stimuliert (die T-Zellen wurden also nicht prästimuliert). Dieselbe Zusammensetzung von Zellen wie bei Experiment 1 wurden auch hier verwendet.

2.1 Die Versuchstiere

In den zwei Experimenten wurde ausschliesslich mit unbehandelten Rattenzellen gearbeitet (d.h. ohne Einfluss von Medikamenten wie beispielsweise Immunsuppressiva etc.).

Die Zellen kommen von drei verschiedenen Rattentypen:

Die Lewis Ratte ist die Empfängerratte bei der Hinterbeintransplantation. Die Brown Norway Ratte ist der Spender des Hinterbeins. Diese beiden Rattentypen sind ideal für die Erforschung neuer Methoden gegen die Abstossung von VCA Transplantaten, denn sie sind in keiner Weise miteinander verwandt und stellen sehr unterschiedliche Komponente dar.

Unter diesen Bedingungen wird die Abstossung quasi provoziert.

Von der Brown Norway Ratte werden Milzzellen als Stimulatorzellen verwendet, aber auch die LNSC werden verwendet. Von der Lewis Ratte stammen die reagierenden Zellen (T-Lymphozyten), deren Proliferation und die Anzahl Tregs von Bedeutung sind, aber auch von der Lewisratte wurden LNSC verwendet.



Abb. 12: Die Lewis Ratte (links) und die Brown Norway Ratte (rechts) im Vergleich. Zu sehen ist die deutliche Unterschiedlichkeit (beispielsweise der Farbe) der beiden Rattentypen.

Milzzellen des dritten Rattentyps, der Wistar Ratte, dienen ausschliesslich als zusätzlicher Stimulator bei der MLR, sodass der Effekt der LNSC auf spenderunspezifische Zellen auch ersichtlich ist. Milzzellen sind besonders gut als Stimulatoren geeignet, da sich in der Milz viele Lymphozyten befinden, welche die T-Zellproliferation zusätzlich anregen. Zudem hat die Milz viele antigenpräsentierende Zellen, die eine starke Immunreaktion bei den T-Lymphozyten auslösen können.

2.2 Versuchsvorbereitung

Das Originalprotokoll der Versuchsvorbereitung und der Versuchsdurchführung aus dem DBMR Bern ist im Anhang (s. Kap. 9) zu finden.

2.2.1 LNSC züchten

Vor der MLR mussten die LNSC der Ratten gezüchtet werden.

- Es wurden isolierte LNSC von unbehandelten Lewis und Brown Norway Ratten aus dem -150° Kühler genommen und soweit aufgetaut, bis nur ein kleines Eisstück

(ca. 2mm Durchmesser) zurückblieb (sodass die Zellen keinen Temperaturschock erleiden).

- Die Zellen wurden in eine 15ml Tube gefüllt, die bereits mit 9 ml Kulturmedium (besteht zu 88% aus DMEM) gefüllt war. Die Tube musste immer auf Eis gelegt sein.
- Diese Lösung wurde 5min lang auf Stärke 300G zentrifugiert, um das DMSO (Dimethyl Sulfoxid, wird zur Zellgefrierung verwendet) von den Zellen abzutrennen. Die Zellen wurden dann mit Kulturmedium resuspendiert.
- Es wurden 10 µl der Zellsuspension in eine Tube (Eppendorf) pipettiert und mit Trypanblau (ein Farbstoff zur Bestimmung der Zellviabilität) im Verhältnis 1:1 ergänzt.
- Aus der neuen Suspension wurden 10 µl in die Zählkammer pipettiert, um die Zellen zu zählen. Es ist wichtig, dass die ungefähre Anzahl lebender Zellen bekannt ist, damit man das Verhältnis für die spätere MLR und die Präkultivierung optimal berechnen kann.
- Zellzählung:

Die Zählkammer wurde unter ein Mikroskop gestellt. Die Ansicht wird so weit vergrößert, dass vier Quadrate sichtbar sind. Die farblosen Zellen in zwei Quadranten werden gezählt, die (durch das Trypanblau) blaugefärbten Zellen sind tote oder perforierte Zellen und wurden nicht gezählt. Die Anzahl Zellen der Suspension wurde wie folgt berechnet:

$$\frac{\text{Zellen}}{\text{ml}} = \frac{\text{gezählte Zellen} * \text{Verdünnungsfaktor} * 10^4}{\text{Anzahl Quadrate}}$$

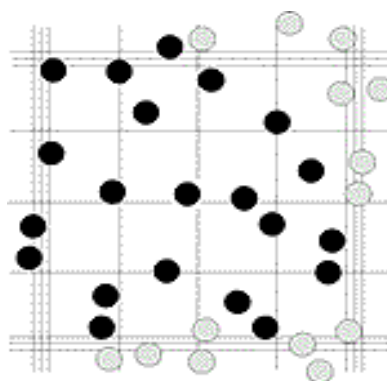


Abb. 13: Ein Quadrat einer Zählkammer. Zu sehen sind die toten Zellen (dunkel) und die lebenden Zellen (hell).

Nach der Zellzählung wurde eine 6-Well-Platte vorbereitet. In zwei Wells der Platte wurden $5 \cdot 10^5$ LNSC der Lewis Ratte und in zwei Wells $5 \cdot 10^5$ LNSC der Brown Norway Ratte gegeben. Die vorbereiteten LNSC wurden über Nacht bei 37° im Zellinkubator gelassen.

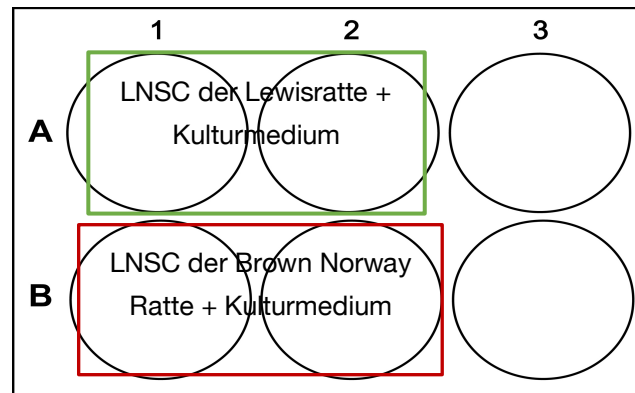


Abb. 14: So sieht die 6-Well-Platte zum Schluss aus.

2.2.2 Isolation von T-Zellen der Lewis Ratte anhand von MagnetSorting

Die T-Zellen der Lewis Ratte wurden im Experiment als Reaktorzellen gebraucht (reagierende Zellen vom Empfänger des Transplantats). Dazu werden die T-Zellen aus einem Zellgemisch der Milz isoliert. Dieser Schritt ist wichtig für die Resultate, da bei dem MagnetSorting die Reinheit und der Verlust an T-Zellen bestimmt wird. Die Reinheit und der Verlust der T-Zellen könnten die Ergebnisse möglicherweise beeinflussen, weshalb die Proben vor und nach dem MagnetSorting untersucht wurden.

- Milzzellen der Lewis Ratte wurden aus dem -105° Kühler genommen und bis auf ein kleines Eisstück aufgetaut.
- Die Zellen wurden in eine 15ml Tube mit 9ml Kulturmedium übertragen.
- Die Suspension wurde 5min bei Stärke 300G zentrifugiert um das DMSO von den Zellen zu trennen.
- Die Zellen wurden in 1ml Zellkulturmedium resuspendiert.
- 10 μ l wurden in einer Tube (Eppendorf) mit Trypanblau im Verhältnis 1:3 gemischt
- Die Zellsuspension wurde in die Zählkammer gegeben \rightarrow Zellzählung (s. 3.2.1)
- 50 μ l der unsortierten unbehandelten Milzzellen wurden für die spätere Untersuchung aufbewahrt.

T-Zell Isolation mit MagnetSorting:

Die T-Zellen wurden mit einem speziellen Verfahren, dem MagnetSorting, aus den Milzzellen isoliert. Die Zellsuspension wurde mit einem speziellen Set, einer Antikörpermischung (Pan T cell MicroBeads rat kit) behandelt. Erst dadurch konnte das MagnetSorting funktionieren.

Das MagnetSorting wurde zweimal durchgeführt, einmal für Experiment 1 und einmal für Experiment 2.

Das Prinzip des MagnetSorting:

Die Zellsuspension liess man durch einen speziellen Magneten laufen. Die T-Zellen wurden mit Antikörper (Typ OX-52) markiert. An diesen Antikörper sind sogenannte Beads (magnetische Zuckermoleküle) befestigt. Durch diese Beads blieben die T-Zellen am Magneten hängen. Dabei blieb eine T-Zell Fraktion (Zellen, die am Magneten sind) und eine negative Fraktion (restliche Zellen, z.B. B-Zellen, Monozyten etc.) zurück. Wichtig ist, dass das MagnetSorting keine vollkommene Reinheit an T-Zellen hervorbringt und dass einige T-Zellen nicht am Magneten hängen bleiben und so in die negative Fraktion gelangen. Deshalb wird die Analyse der Reinheit und des Verlustes der T-Zellen nach dem Sorting in dem Resultatteil nochmals aufgenommen.

Zur Kontrolle wurden folgende Proben entnommen:

- 50 µl der behandelten Zellsuspension vor dem Sorting
- 50 µl der negativen Fraktion
- 50 µl der T-Zell Fraktion

2.2.3 Färbung der T-Zellen mit CFSE

Die isolierten T-Zellen wurden mit dem Farbstoff CFSE behandelt, sodass später die T-Zellproliferation ausgewertet werden kann.

- Die isolierten T-Zellen der Lewisratte (reagierende Zellen) wurden in 2ml PBS (Phosphatgepufferte Salzlösung) zur Reinigung der Zellkultur suspendiert.
- Am oberen Rand der Tube wurde 2 µl CFSE (CellTrace) dazugegeben, sofort die Tube geschlossen und mit einem Vortex-Gerät (IKA Vortex) geschüttelt.

- Der Farbstoff wirkte 5min im Dunkeln ein, denn er würde am Licht an Intensität verlieren. Ab und zu wurde geschüttelt um eine gleichmässige Farbverteilung zu erhalten.
- Die Zellsuspension wurde mit 10ml Kulturmedium gewaschen und für 5min bei Stärke 300G zentrifugiert.
- Die zentrifugierten Zellen wurden noch einmal mit Kulturmedium gewaschen
- Zellzählung (s. Kap. 2.2.1).
- Die Zellen wurden im richtigen Verhältnis in Zellkulturenmedium resuspendiert, so dass 2ml Medium $5 \cdot 10^5$ Zellen beinhalteten.

Auch die Färbung wurde für beide Experimente, also zweimal, durchgeführt.

2.2.4 Prästimulation der T-Zellen mit den LNSC für Experiment 1

Für Experiment 1 wurden die reagierenden Zellen (T-Zellen aus dem MagnetSorting) der Empfängerratte (Lewis Ratte) und die LNSC prästimuliert.

- 2ml ($5 \cdot 10^5$ Zellen) der T-Zellsuspension (s. Kap. 2.2.2 und 2.2.3) wurden in die vorbereitete 6-Well-Platte mit den LNSC (s. Kap. 2.2.1) gegeben. Anschliessend wurden sie für 2 Tage im Zellinkubator bei 37° gelassen.

Tabelle 1: Zusammensetzung der verschiedenen Zellen auf der 6-well-Platte:

LNSC Brown Nor- way	LNS C Lewi s	Kon- trolle
+ T- Zellen	+ T- Zel- len	T- Zellen ohne LNSC
Ohne T- Zellen	Oh- ne T- Zel- len	

2.2.5 Isolation und Bestrahlung der Milzzellen von Wistar- und Brown Norway Ratte

Vor der Durchführung der Experimente mussten die Stimulatorzellen vorbereitet werden. Als Stimulatorzellen wurden Milzzellen einer unbehandelten Brown Norway Ratte (Spenderratte) und einer unbehandelten Wistar Ratte (dritte Partie, die nichts mit der Transplantation zu tun hat) isoliert.

- Milzzellen der Wistar Ratte und der Brown Norway Ratte wurden aus dem -150° Kühler genommen und aufgetaut, bis noch ein kleines Stück Eis vorhanden war.
- Die Zellen wurden in eine 15ml Tube mit 9ml Kulturmedium pipettiert, immer im Eis.
- Es wurde 5min zentrifugiert mit der Stärke 300G, um die Zellen vom DMSO zu trennen.
- Zellzählung (s. Kap. 2.2.1)

Bestrahlung der Stimulatorzellen:

Damit die Zellen bei der MLR nur als Stimulatoren wirken und nicht selbst reagieren, wurden sie mit radioaktiver Gammastrahlung bestrahlt. So wurde die Zelle innerlich abgetötet (durch die Gammastrahlung wird die DNA beschädigt), die Zelloberfläche und deren Antigene sind jedoch noch vorhanden und können so die T-Zellen stimulieren.

- Die Zellen wurden in 1ml kaltem Kulturmedium suspendiert.
- Die Zellen wurden 39min im Irradiator bestrahlt (Strahlendosis: 3000cGy)
- Nach der Bestrahlung wurden die Zellen mit Medium gewaschen.
- Die Zellen wurden im Verhältnis $2 \cdot 10^5$ Zellen pro 100 μ l in MLR Medium (normales Zellmedium + *Mercaptoethanol*) suspendiert und auf Eis gelegt.

2.3 Die gemischte Lymphozytenreaktion (MLR)

Die MLR wurde in einer 96-well-Platte durchgeführt. Die umliegenden Wells der Zellmixturen in der Platte wurden mit Wasser gefüllt, sodass die Zellen während der MLR nicht austrocknen. Die LNSC wurden vor der MLR mit einem Enzym (Trypsin) behandelt, sodass sie aufhö-

ren zu wachsen und dass sie nicht an der Oberfläche der Platte kleben. Die Zellen wurden mit folgendem Schema in der MLR gemischt:

	Negative Kontrolle	Test	Positive Kontrolle
prästimuliert mit LNSC der Lewisratte	170 µl T-Zellen + 30 µl MLR Medium	170 µl T-Zellen + 12.5 µl Brown Norway Stimulatorzellen	170 µl T-Zellen + 25 µl Wistar Stimulatorzellen
prästimuliert mit LSCN der Brown Norway Ratte	170 µl T-Zellen + 30 µl MLR Medium	170 µl T-Zellen + 7.5 µl Brown Norway Stimulatorzellen	170 µl T-Zellen + 15 µl Wistar Stimulatorzellen
Kontrolle	170 µl T-Zellen	170 µl T-Zellen + Brown Norway Stimulatorzellen	170 µl T-Zellen + Wistar Stimulatorzellen

Experiment 1:

Tabelle 2: Das System der gemischten Lymphozytenreaktion von Experiment 1:

Experiment 2:

Tabelle 3: Das System der gemischten Lymphozytenreaktion von Experiment 2

	Negative Kontrolle	Test	Positive Kontrolle
MLR mit Lewis LNSC	200 µl T-Zellen + 200 µl MLR Medium	200 µl T-Zellen + 200 µl Brown Norway Stimulatorzellen	200 µl T-Zellen + 200 µl Wistar Stimulatorzellen
Kontrolle (keine LNSC)	200 µl T-Zellen + 200 µl MLR Medium	200 µl T-Zellen + 200 µl Brown Norway Stimulatorzellen	200 µl T-Zellen + 200 µl Wistar Stimulatorzellen
MLR mit Brown Norway LNSC	100 µl T-Zellen + 100 µl MLR Medium	100 µl T-Zellen + 100 µl Brown Norway Stimulatorzellen	100 µl T-Zellen + 100 µl Wistar Stimulatorzellen
Kontrolle (keine LNSC)	100 µl T-Zellen + 100 µl MLR Medium	100 µl T-Zellen + 100 µl Brown Norway Stimulatorzellen	100 µl T-Zellen + 100 µl Wistar Stimulatorzellen

Die T-Zellen der Lewis Ratte in der MLR sind Reaktorzellen (Zellen des Empfängers (s. Kap. 2.2.2)). Die Stimulatorzellen (s. Kap. 2.2.5) sind Milzzellen der Wistar Ratte (dritte Parite) und der Brown Norway Ratte (Spender). Diese Zellen stimulieren die T-Zellen (Reaktorzellen).

Die negative Kontrolle ist eine MLR ohne Stimulatorzellen und wird durchgeführt, um den Effekt der LNSC auf die T-Zellen zu beobachten, ohne dass die T-Zellen zusätzlich stimuliert werden. In der positive Kontrolle wird die MLR mit Stimulatorzellen der dritten Partie (Wistar Ratte) gemacht, sodass auch der spenderunspezifische Effekt der LNSC analysiert werden kann. Der Test ist die MLR mit den Stimulatorzellen des Spenders (Brown Norway Ratte) und stellt die echte Situation einer Transplantation dar. Zur Kontrolle wird die MLR ohne Prästimulation oder direkte Stimulation durch LNSC durchgeführt.

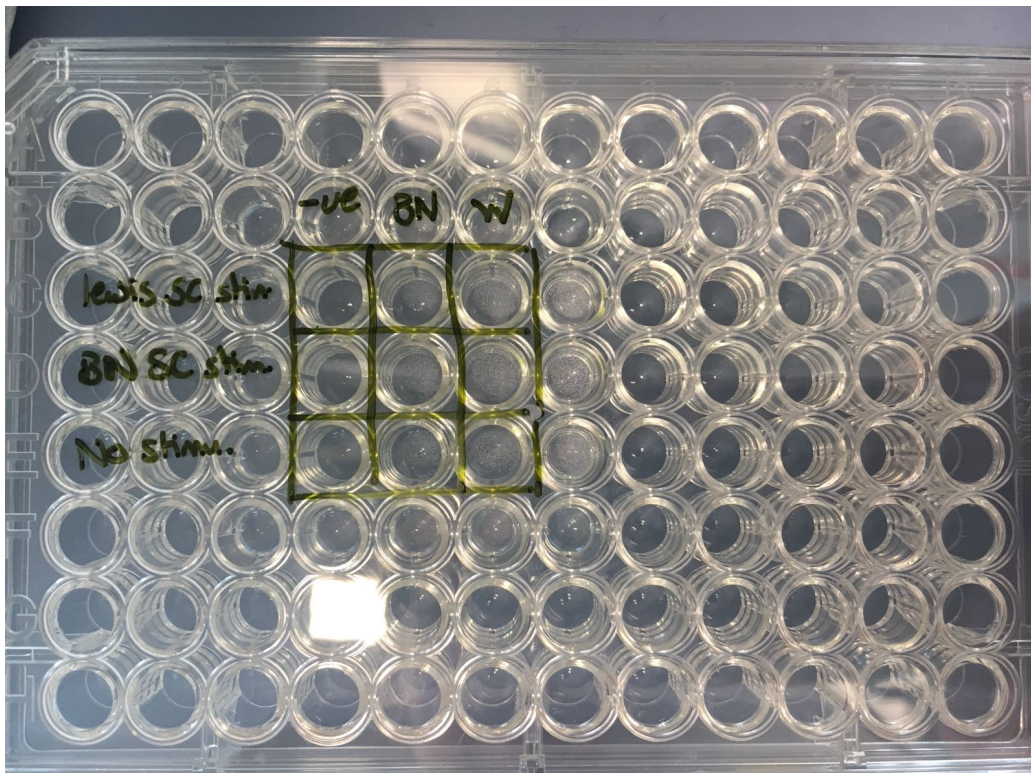


Abb. 15: Bild der 96-Well-Platte, dargestellt ist die durchgeführte MLR von Experiment 1

Die MLR hat während fünf Tagen im Inkubator (37°) stattgefunden.

2.4 Immunphänotypisierung und Nachweis der Proliferation

Nachdem die Zellen während fünf Tagen im Inkubator reagiert haben, wurde die Immunphänotypisierung und Proliferation der T-Zellen im FACS (Durchflusszytometer) analysiert. Die Immunphänotypisierung analysiert die Expression verschiedener Antigene auf der Oberfläche der Zellen. Dadurch können verschiedene Merkmale der Zellen, beispielsweise der genaue Zelltyp, bestimmt werden.

2.4.1 Der Durchflusszytometer (FACS)

Der Durchflusszytometer und das Analyseprogramm FlowJo sind fundamentale Geräte für die Auswertung der durchgeführten MLR. Im FACS werden die Zellen vermessen, sodass man sie charakterisieren kann. Die Zellen der Zellsuspension werden nacheinander durch einen Laserstrahl geführt. Die Streuung des Strahls gibt dann Auskunft über die Komplexität und Grösse der Zelle. Das Flüssigkeitssystem des FACS (s. Abb. 16) ist dafür zuständig, dass die Zellen einzeln bestrahlt werden. Der Laser (s. Abb. 16) dient als Lichtquelle. Das optische System besteht aus Reflektoren, die nur eine Lichtgeschwindigkeit (Wellenlänge) aufnehmen. Andere Wellenlängen werden zu den Detektoren geleitet (s. Abb. 16), welche dafür verantwortlich sind, dass das Lichtsignal an den Computer weitergeleitet wird. Der Computer kann dann die Signale in Rohdaten umwandeln, welche danach mit dem Programm FlowJo grafisch dargestellt werden [2].

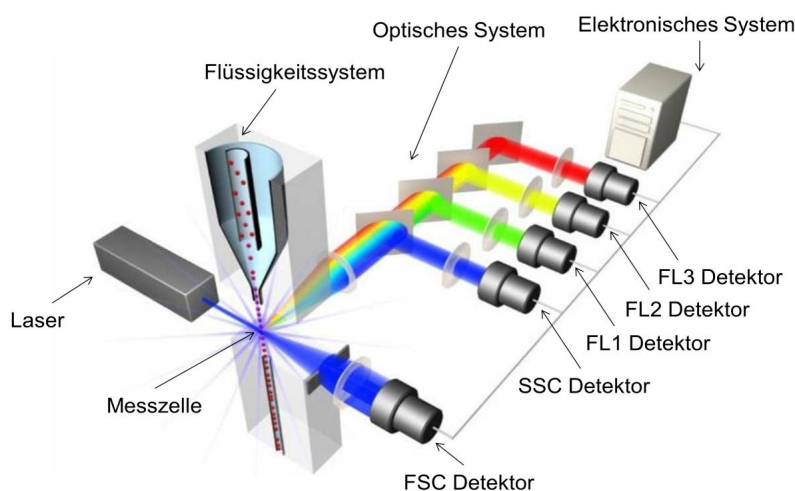


Abb. 16: Funktionsweise eines FACS, verschiedenen Funktionssysteme

2.4.2 Vorbereitung auf den FACS

- T-Zellen wurden von den LNSC gelöst und in eine FACS Tube pipettiert, dann mit 1ml *PBS Puffer* gewaschen.
- Die Suspension wurde 5min bei 300G Stärke zentrifugiert, und der Puffer wurde entsorgt.
- 0.5 μ l *fixierbarer Viabilitätsfarbstoff* wurde hinzugefügt, um die lebenden Zellen zu kennzeichnen.
- 15min wurde bei 4° inkubiert, dann wurde 5min bei gleicher Stärke zentrifugiert, und der restliche Farbstoff wurde entsorgt.

Die Zellen mussten vor der Analyse mit dem FACS mit Antikörper bearbeitet werden. Die Antikörper dockten an die Antigene der antigenpräsentierenden Zelloberflächen an, sodass diese Zellen identifiziert werden konnten. Folgender Antikörpermix (pro Tube) wurde verwendet:

CD4 APC-Cy7, 0.13 μ L (Bio Legend, 201518)

CD8 PE-Cy7, 1 μ L (Miltenyi Biotec – Ref: 130-102-685)

CD3 PerCP, 1 μ L (Miltenyi Biotec – Ref: 130-102-67)

- Die Zellen wurden mit dem Antikörpermix versehen, dann 15min bei 4° inkubiert.
- Die Zellen wurden mit 1.9ml Puffer gewaschen, 5min zentrifugiert, dann wurde 500ml Fixierlösung hinzugefügt und 30min im Dunkeln inkubiert.
- Danach wurden die Zellen mit *Permeabilisierungspuffer* gewaschen und zentrifugiert.
- 0.25 μ L *FoxP3-A450* und 2 μ L *Helios-PE* wurden hinzugefügt, dann wurde die Suspension 30min im Dunkeln inkubiert.
- Die Suspension wurde mit 1.9ml *Permeabilisierungsfixierlösung* gewaschen und zentrifugiert.

Es folgte die Analyse mit dem FACS.

2.4.3 Auswertung mit dem Computerprogramm FlowJo

Die im Folgenden erläuterten Schritte dienten als Vorbereitung, um die Hauptresultate richtig auswerten zu können.

Nachdem die Zellen durch den FACS erfasst wurden, wurden die Rohdaten mit dem Programm FlowJo grafisch dargestellt. Um diesen Daten nützliche Informationen zu entziehen, wurde wie folgt vorgegangen:

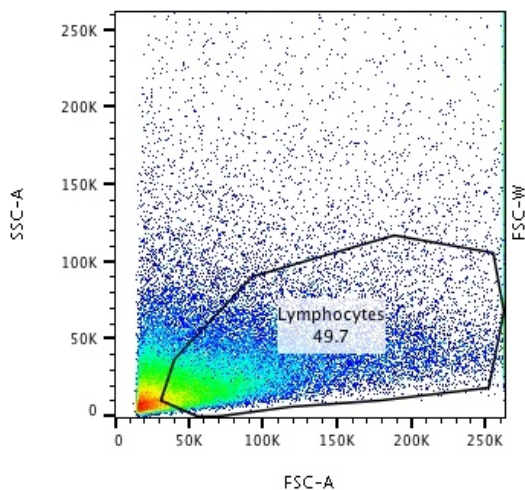


Abb. 17: Die analysierten Zellen

Zuerst mussten die lebenden Lymphozyten anderen Zelltypen aufgetrennt werden. Dazu geben die Parameter SSC-A und FSC-A Auskunft. SSC-A kennzeichnet die Grösse der Zelle und FCS-A kennzeichnet die Komplexität (=«Kompliziertheit») der Zelle. So konnten die Lymphozyten bestimmt werden (s. Abb.17: die markierten Lymphozyten).

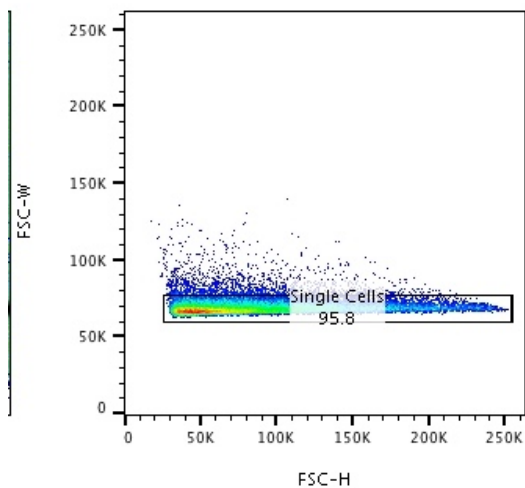


Abb. 18: Alle lebenden Zellen, einige kleben aneinander

Nun kleben einige Zellen noch zusammen. Die eingerahmten Zellen (s. Abb. 18) sind einzelne Zellen. Wichtig sind nur die einzelnen Zellen, da zwei aneinander klebende Zellen keine brauchbaren Daten liefern.

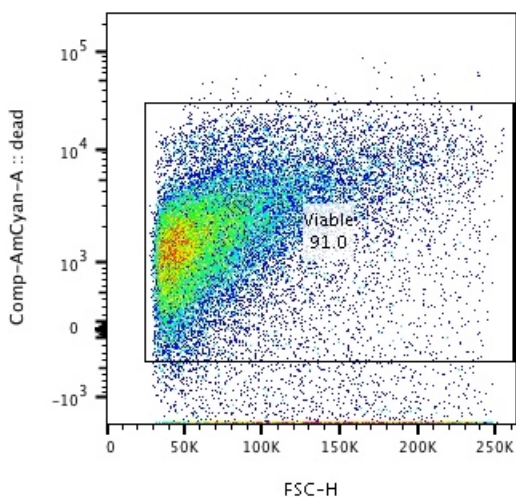
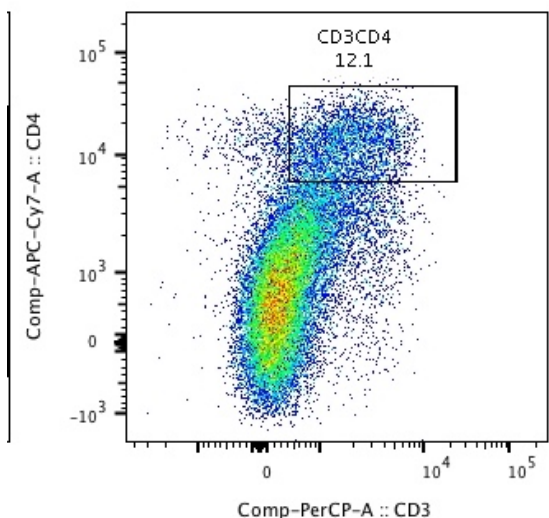


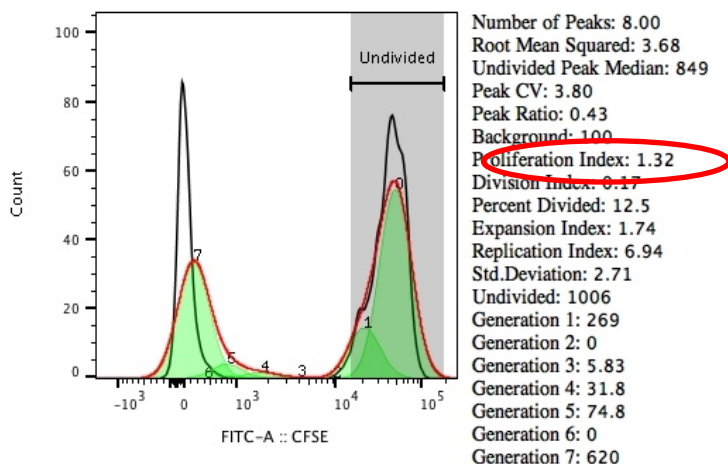
Abb. 19: Die lebende Zellen befinden sich im positiven Bereich der Y-Achse

Da während der MLR auch Zellen gestorben sind, mussten die lebenden Zellen (mit Hilfe des Viabilitätsfarbstoffs) von den toten Zellen abgegrenzt werden (s. Abb. 19).



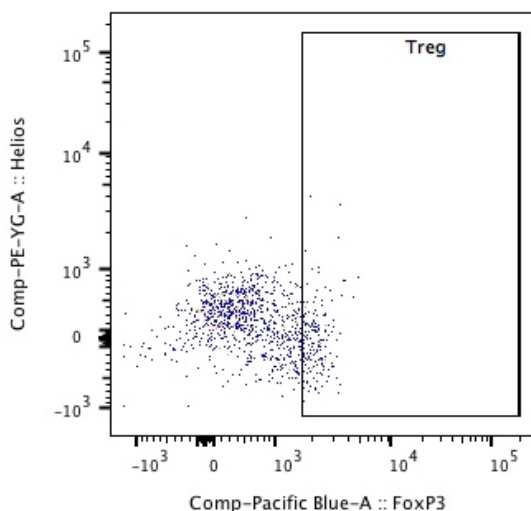
Von den lebenden Lymphozyten wurden die T-Lymphozyten anhand von CD3 und CD4 Zelltypmarker auf der Zelloberfläche aussortiert. Die eingerahmten Zellen sind T-Lymphozyten (s. Abb. 20).

Abb. 20: Die T-Lymphozyten werden ausgewählt



Die T-Zellproliferation ist sehr wichtig für die Auswertung der Experimente, da dadurch festgestellt werden kann, ob und wie heftig eine Immunreaktion stattgefunden hat. Der Proliferationsindex gibt die Proliferation in Zahlen an. Das Diagramm (s. Abb. 21) stellt die Verdünnung des Farbstoffs CFSE grafisch dar. Jeder Peak in dem Diagramm stellt eine neue Zellgeneration dar.

Abb. 21: Die Proliferation in Peaks, rechts steht der Proliferationsindex (rot markiert)



Neben der T-Zellproliferation ist auch die Anzahl an Treg Zellen wichtig. Treg Zellen weisen die Marker Helios und FoxP3 auf und können so identifiziert werden. Die Anzahl Treg Zellen von der Gesamtmenge der T-Zellen wird in Prozent angegeben. In Abb. 22 sind ist die gesamte T-Zell Menge dargestellt, die Treg Zellen sind eingerahmt.

Abb. 22: Treg Zellen sind umrahmt

3 Resultate

3.1 Reinheit und Verlust der T-Zellen

Zuerst musste die Reinheit und der Verlust der T-Zellen nach dem T-Zellsorting untersucht werden. Die Reinheit sowie der Verlust der T-Zellen könnten die Resultate eventuell beeinflussen und sind deshalb in der späteren Interpretation der Resultate zu beachten.

In Folgendem sind die Resultate dieser Voruntersuchungen dargestellt.

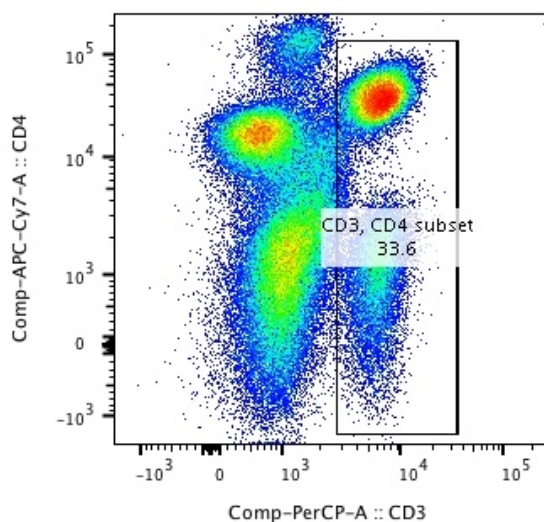


Abb. 23: Lymphozyten vor dem Sortieren der T-Zellen

Abb. 23 zeigt die Lymphozytensuspension der Lewis Ratte vor dem MagnetSorting. Die T-Zellen (CD3 und CD4 Marker) sind umrahmt. Der Anteil an T-Zellen in der Gesamtsuspension beträgt 33.6%.

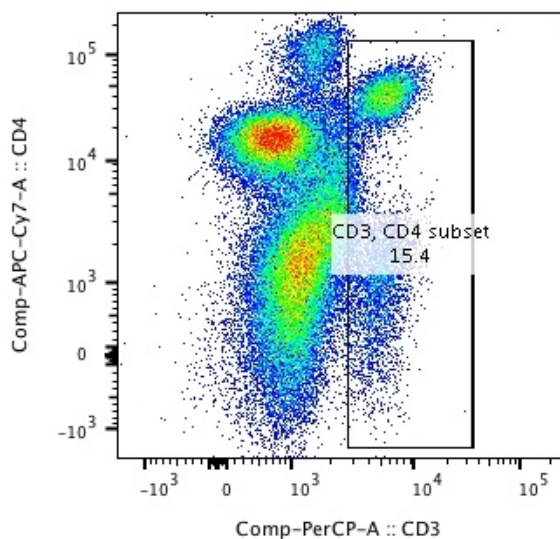
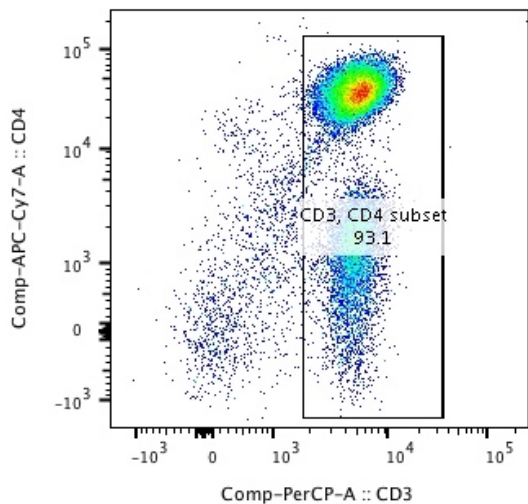


Abb. 24: Die negative Fraktion nach dem Sorting

Abb. 24 zeigt die negative Fraktion, das heisst die restlichen Zellen, welche nach dem Sorting nicht am Magneten hängen geblieben sind. Diese Suspension sollten nur noch Restlymphozyten, aber keine T-Zellen enthalten, da diese theoretisch alle aussortiert sein müssten. Es ist jedoch ersichtlich, dass 15.4% der negativen Fraktion T-Zellen sind. Das ist aber normal.



In Abb. 25 sind die Zellen der positiven Fraktion abgebildet, also alle aussortierten Zellen. Theoretisch sollten in dieser Fraktion nur T-Zellen sein. Die Analyse zeigte aber, dass 93.1% der Gesamtfraktion T-Zellen sind. Das bedeutet, dass 6.9% dieser Fraktion keine T-Zellen sind. Dies gilt aber trotzdem als eine hohe Reinheit.

Abb. 25: Die positive Fraktion

3.2 Experiment 1

Im folgenden Abschnitt sind die von FlowJo ausgewerteten Rohdaten dargestellt. Die entscheidenden Werte sind die der T-Zellproliferation und die Anzahl der Treg Zellen.

3.2.1 Die T-Zellproliferation

Die Proliferation der T-Zellen wird mit einer bestimmten Zahl, dem Proliferationsindex, angegeben. Folgende Tabelle zeigt die Proliferationsindizes der untersuchten MLR:

Tabelle 4: Die Proliferationsindizes von Experiment 1 systematisch dargestellt

Prästimulation der Lewis T-Zellen	MLR	Proliferationsindex
Mit Brown Norway LNSC	Lewis T-Zellen + Brown Norway Stimulatorzellen	2.13
Mit Brown Norway LNSC	Lewis T-Zellen + Wistar Stimulatorzellen	3

Mit Brown Norway LNSC	Lewis T-Zellen + keine Stimulatoren	1.05
Mit Lewis LNSC	Lewis T-Zellen + Brown Norway Stimulatorzellen	2.12
Mit Lewis LNSC	Lewis T-Zellen + Wistar Stimulatorzellen	1.41
Mit Lewis LNSC	Lewis T-Zellen + keine Stimulatoren	1.13
Keine Prästimulation	Lewis T-Zellen + Brown Norway Stimulatorzellen	2.15
Keine Prästimulation	Lewis T-Zellen + Wistar Stimulatorzellen	1.32
Keine Prästimulation	Lewis T-Zellen + keine Stimulatoren	1.03

In der folgenden Grafik sind die Ergebnisse der Proliferation zusammengefasst:

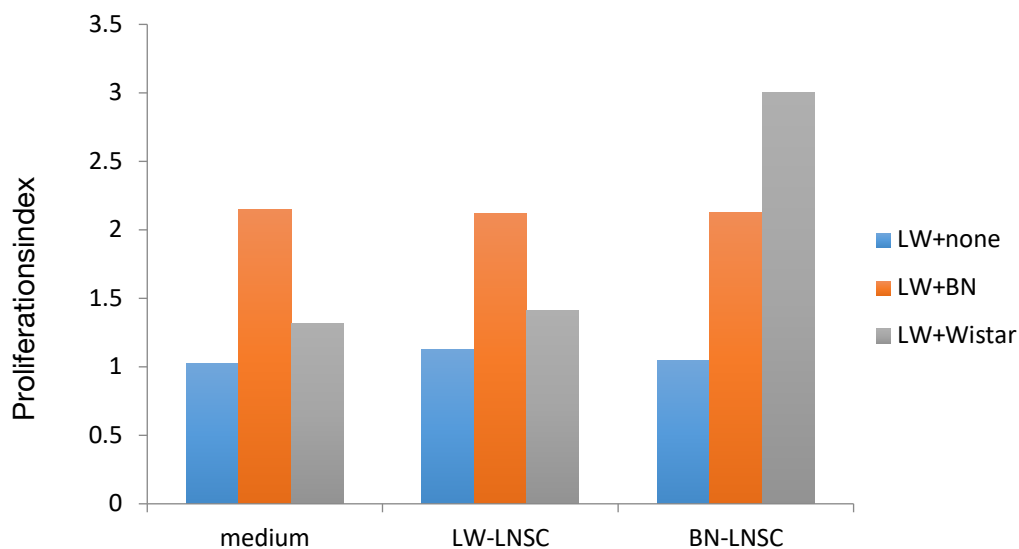


Abb. 26: Verschiedene Proliferationsindizes von Experiment 1

Der orange Balken in der Grafik stellt die MLR mit den Brown Norway Stimulatorzellen (Test) dar. Der blaue Balken zeigt die MLR ohne Stimulatorzellen (negative Kontrolle). Der graue Balken zeigt die MLR mit den Wistar Stimulatorzellen (positive Kontrolle). Die Y-Achse beschriftet die verschiedenen Prästimulationen.

„LW-LNSC“ steht für Prästimulation mit Lewis LNSC, „BN-LNSC“ für Prästimulation mit Brown Norway LNSC und „Medium“ ist die Kontrolle ohne Prästimulation.

In der Grafik ist deutlich zu sehen, dass die Proliferation der positiven Kontrolle (grauer Balken) in Kombination mit den Brown Norway LNSC am höchsten ist. Die restlichen zwei Proliferationsindizes der positiven Kontrolle sind circa halb so gross. Die Proliferation des Tests (oranger Balken) bleibt für alle Stimulationen etwa gleich.

Auch die Proliferation der negativen Kontrolle bleibt immer etwa auf dem gleichen Wert.

3.2.2 Anzahl Treg Zellen

Mit der Anzahl Treg Zellen ist die Menge von Treg Zellen im Vergleich zur Gesamtmenge der T-Zellen gemeint. Die Treg Zellen geben Auskunft über die Toleranz gegenüber den transplantierten Zellen. In folgender Tabelle wird die Anzahl Tregs der verschiedenen Stimulationen in Prozent dargestellt.

Es ist anzumerken, dass ein Treg Wert unter 10% eine komplette Abstossung bedeutet und ein Wert über 60% eine «Graft vs. Host Disease» (zytotoxische Reaktion von transplantierten Immunzellen gegen den Wirtsorganismus, s. Kap. 1.2.7).

Tabelle 5: Die Anzahl Tregs systematisch dargestellt

Prästimulation der Lewis T-Zellen	MLR	Anzahl Treg (%)
Mit Brown Norway LNSC	Lewis T-Zellen + Brown Norway Stimulatorzellen	13
Mit Brown Norway LNSC	Lewis T-Zellen + Wistar Stimulatorzellen	10.9
Mit Brown Norway LNSC	Lewis T-Zellen + keine Stimulatoren	9.8
Mit Lewis LNSC	Lewis T-Zellen + Brown Norway Stimulatorzellen	10.5
Mit Lewis LNSC	Lewis T-Zellen + Wistar Stimulatorzellen	9.16
Mit Lewis LNSC	Lewis T-Zellen + keine Stimulatoren	4.23

Keine Prästimulation	Lewis T-Zellen + Brown Norway Stimulatorzellen	9.93
Keine Prästimulation	Lewis T-Zellen + Wistar Stimulatorzellen	5.8
Keine Prästimulation	Lewis T-Zellen + keine Stimulatoren	3.9

Die folgende Grafik fasst die Anzahl Tregs zusammen und stellt sie im Vergleich dar:

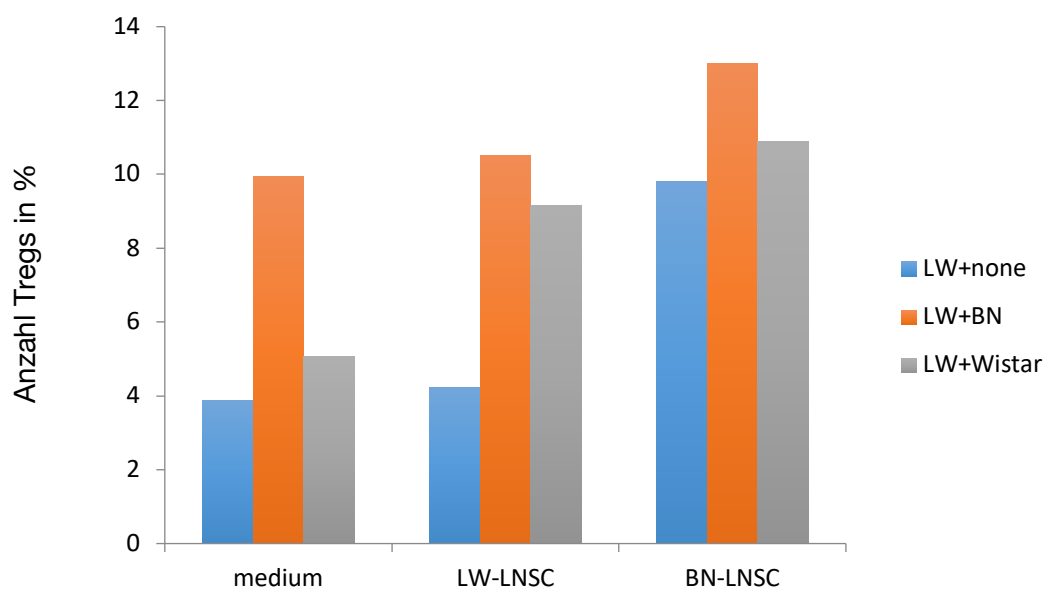


Abb. 27: Anzahl Tregs von Experiment 1

Die Informationen zu den verschiedenen Balken sowie den Abkürzungen der X-Achse sind unter der Grafik der Prästimulation nachzulesen, hier handelt es sich um dieselben.

Die Y-Achse gibt die Anzahl Tregs in Prozent an.

Die Grafik zeigt einen Anstieg von Tregs im Test mit den Brown Norway LNSC (oranger Balken). Der Anstieg ist jedoch bei der negativen Kontrolle (blauer Balken) noch grösser. Bei der positiven Kontrolle ist sowohl bei der Lewis LNSC Prästimulation sowie bei der Brown Norway LNSC Prästimulation einen Anstieg der Tregs zu erkennen.

3.3 Experiment 2

In diesem Kapitel werden die ausgewerteten Daten nach der Analyse mit dem Computerprogramm FlowJo von Experiment 2 behandelt. Ausschlaggebend sind ebenfalls die T-Zellproliferation und die Anzahl der Treg Zellen.

3.3.1 T-Zellproliferation

In folgender Tabelle sind die verschiedenen Proliferationsindizes von Experiment 2 im Vergleich zusammengestellt.

Tabelle 5: Die Proliferationsindizes von Experiment 2 systematisch dargestellt

Direkte Stimulation der Lewis T-Zellen während der MLR	MLR	Proliferationsindex
Mit Brown Norway LNSC	Lewis T-Zellen + Brown Norway Stimulatorzellen	1.71
Mit Brown Norway LNSC	Lewis T-Zellen + Wistar Stimulatorzellen	1.67
Mit Brown Norway LNSC	Lewis T-Zellen + keine Stimulatoren	1.32
Mit Lewis LNSC	Lewis T-Zellen + Brown Norway Stimulatorzellen	3.05
Mit Lewis LNSC	Lewis T-Zellen + Wistar Stimulatorzellen	2.53
Mit Lewis LNSC	Lewis T-Zellen + keine Stimulatoren	1.16
Keine Stimulation	Lewis T-Zellen + Brown Norway Stimulatorzellen	2.51
Keine Stimulation	Lewis T-Zellen + Wistar Stimulatorzellen	2.97
Keine Stimulation	Lewis T-Zellen + keine Stimulatoren	1

Die Grafik bildet die verschiedenen Proliferationsindizes von Experiment 2 im direkten Vergleich ab:

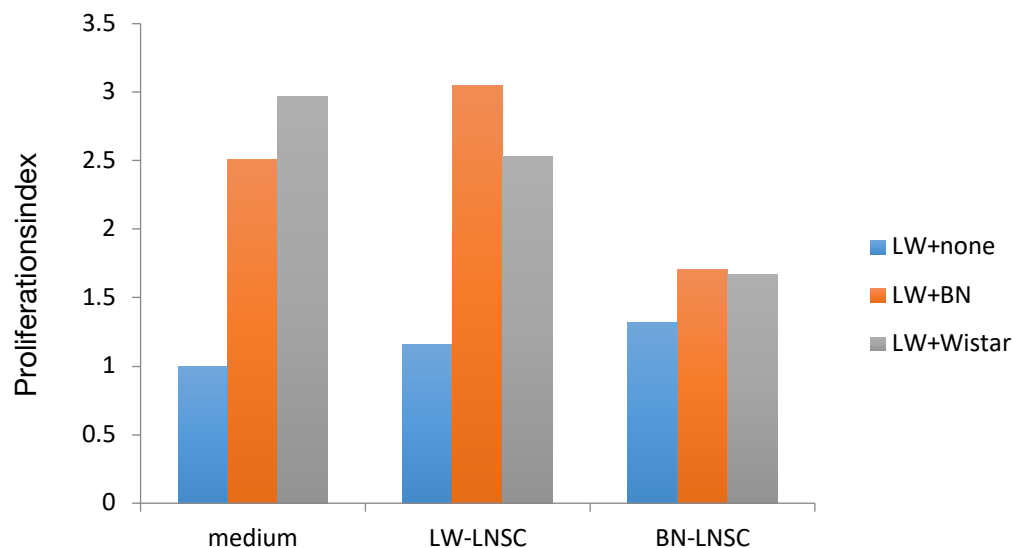


Abbildung 28: Verschiedene Proliferationsindizes von Experiment 2

Die Informationen zur Achsenbeschriftung, den Abkürzungen und die Legende der Balken sind in Kap. 3.2.1 (s. Abb. 26) nachzulesen.

In dieser Grafik ist deutlich zu erkennen, dass die Proliferation der positiven Kontrolle (grauer Balken) und des Tests (oranger Balken) bei der Stimulation durch Brown Norway LNSC tiefer liegt als bei der Stimulation durch Lewis LNSC und bei der Kontrolle.

Die Werte der negativen Kontrolle (blauer Balken) bleibt jedoch immer etwa gleich.

3.3.2 Anzahl Treg Zellen

In folgender Tabelle wird die Anzahl Tregs der verschiedenen Stimulationen in Experiment 2 in Prozent gezeigt.

Auch hier ist nochmals kurz darauf hinzuweisen, dass ein Treg Wert unter 10% eine komplette Abstossung bedeutet und ein Wert über 60% eine «Graft vs. Host Disease» (s. Kap. 1.2.7).

Tabelle 6: Die Anzahl der Tregs systematisch dargestellt

Direkte Stimulation der Lewis T-Zellen während der MLR	MLR	Anzahl Treg Zellen in %
Mit Brown Norway LNSC	Lewis T-Zellen + Brown Norway Stimulatorzellen	3.12
Mit Brown Norway LNSC	Lewis T-Zellen + Wistar Stimulatorzellen	5.39
Mit Brown Norway LNSC	Lewis T-Zellen + keine Stimulatoren	3.01
Mit Lewis LNSC	Lewis T-Zellen + Brown Norway Stimulatorzellen	2.16
Mit Lewis LNSC	Lewis T-Zellen + Wistar Stimulatorzellen	2.05
Mit Lewis LNSC	Lewis T-Zellen + keine Stimulatoren	5.19
Keine Stimulation	Lewis T-Zellen + Brown Norway Stimulatorzellen	4.78
Keine Stimulation	Lewis T-Zellen + Wistar Stimulatorzellen	3.83
Keine Stimulation	Lewis T-Zellen + keine Stimulatoren	4.16

In folgender Grafik ist die Anzahl Tregs von Experiment 2 zusammengefasst und im Vergleich dargestellt.

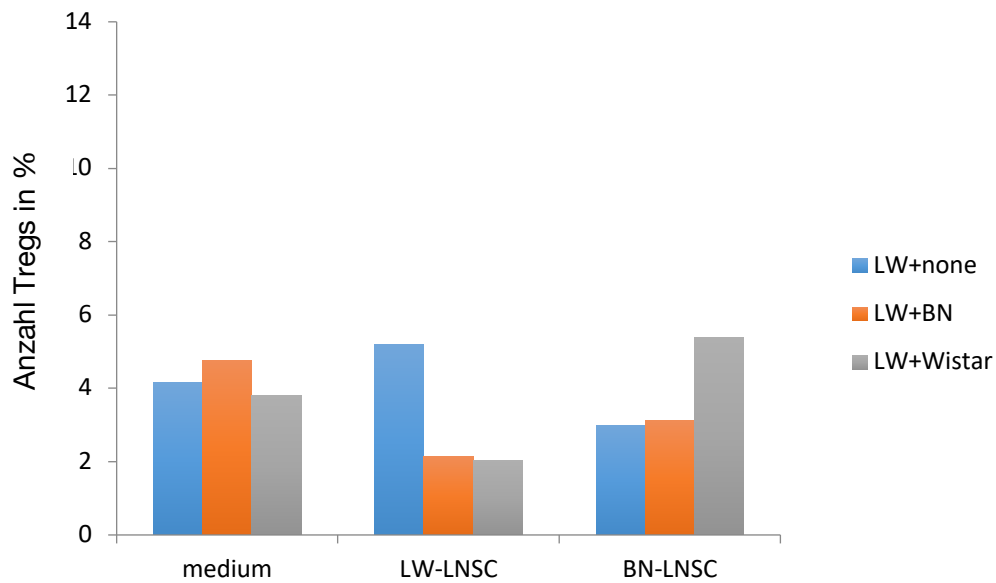


Abb. 29: Anzahl Tregs von Experiment 2.

Die Achsenbeschriftung, Abkürzungen und Balken dieser Grafik die gleichen wie in Abb. 27. Die Informationen dazu sind in Kap. 3.2.2 nachzulesen.

Die Anzahl Tregs sinkt im Test bei der Stimulation durch Lewis LNSC und Brown Norway LNSC (oranger Balken).

Die Anzahl Tregs der negativen Kontrolle (blauer Balken) steigt im Vergleich zu der Kontrolle bei der Stimulation durch die Lewis LNSC leicht an, nimmt dafür bei der Stimulation durch die Brown Norway LNSC leicht ab.

Die Anzahl Tregs bei der positiven Kontrolle (grauer Balken) nimmt im Vergleich zu der Kontrolle bei der Stimulation durch Lewis LNSC etwa um die Hälfte ab, steigt aber bei der Stimulation durch die Brown Norway LNSC um die Hälfte an.

4 Diskussion

4.1 Allgemein

In dieser Arbeit wurde die Wirkung von LNSC auf ein Handtransplantat in vitro untersucht. Dafür wurde eine MLR mit verschiedenen Zellkombinationen durchgeführt. Die in-vitro-MLR ist eine geeignete Methode zur Analyse der Auswirkungen von LNSC auf die T-Zellproliferation. Denn anhand der MLR können die gewünschten Parameter (T-Zellproliferation und Treg Zellen) gut getestet und analysiert werden. Eine MLR schafft ausserdem einen starken Realitätsbezug zu der richtigen Situation (in-vivo-Situation) einer Handtransplantation. Es wurde auch deutlich, dass eine MLR mit direkter Stimulation der T-Zellen durch die LNSC den Effekt der LNSC besser aufzeigt als eine MLR, wo zuvor eine Prästimulation durch die LNSC stattgefunden hat.

Eine Prästimulation der T-Zellen durch LNSC ist daher nicht weiterzuempfehlen. Denn die T-Zellen verbringen während der Präinkubation 48 Stunden in einer unfreundlichen Umgebung, da ihnen überlebenswichtige Stoffe fehlen. Unter diesen Umständen sind die T-Zellen später für die MLR in keinem optimalen Zustand. Das müsste man jedoch überprüfen, indem man die T-Zellen vor der MLR untersucht. Dies wurde aber bei diesem Experiment nicht gemacht, da schon vor der Prästimulation durch die LNSC wenig T-Zellen vorhanden waren. Doch es kann davon ausgegangen werden, dass sich T-Zellen besser eignen um den Effekt der LNSC zu testen, wenn die MLR direkt nach der Isolation der T-Zellen aus dem Blut der Ratte stattfindet.

Das MagnetSorting für das Aussortieren der T-Zellen ist auch eine geeignete Methode um T-Zellen aus einem Lymphozytenmix zu gewinnen. Je nach dem kann dadurch mehr oder weniger stark auf die Reinheit der T-Zellen geachtet werden.

Die Reinheit der T-Zellen könnte besser sein als in diesen Experimenten. Es ist nicht klar, ob eine nicht 100 prozentige Reinheit die Resultate beeinflusst, doch es könnte sein, dass dies eine Auswirkung auf die Resultate dieser Arbeit hatte. Dies müsste man aber genauer untersuchen.

Die Milzzellen der Wistar und der Brown Noway Ratten sind gut als Stimulatorzellen einzusetzen, denn in der Milz befinden sich viele verschiedene Arten von Lymphozyten, die eine Immunreaktion der Empfängerzellen (T-Zellen) provozieren.

Stromazellen der Lymphknoten eignen sich insofern gut, da sie im Zentrum der Lymphkno-

ten liegen und (ebenso wie die Milzzellen) viele verschiedene Typen von Lymphozyten beinhalten.

Unbedingt zu bedenken ist, dass die Resultate dieser zwei Experimente nicht unbedingt repräsentativ sind. Die Resultate sind noch sehr vorläufig, denn nur eine Durchführung der Experimente reicht nicht, um eine geltende Aussage über die Auswirkungen von Lymphknotenstromazellen auf ein Handtransplantat zu machen. Um die Gültigkeit der Resultate zu bestätigen, muss das Experiment mehrfach wiederholt werden, um andere Resultate ausschliessen zu können. Ausserdem sollten die Auswirkungen der Lymphknotenstromazellen auch in anderen Systemen oder Methoden, beispielsweise in vivo, getestet werden [14].

4.2 Die T-Zellproliferation im Zusammenhang mit den LNSC

Die T-Zellproliferation ist der ausschlaggebendste Parameter zur Bestimmung der Immunreaktion des Empfängers. Denn je mehr die T-Zellen proliferieren, desto heftiger findet die Reaktion statt und desto ungünstiger ist es somit für das Transplantat.

Die Prästimulation mit den LNSC der Lewis Ratte (Empfänger) und der Brown Norway Ratte (Spender) in Experiment 1 zeigte bezüglich der T-Zellproliferation keine grossen Veränderungen. Die Proliferation beim Test (mit Stimulatorzellen der Brown Norway Ratte) blieb immer gleich. Das bedeutet, dass keine der LNSC die T-Zellproliferation beeinflusste. Dies könnte daran liegen, dass die Stromazellen schon während der Prästimulation abgestorben sind. Sehr wahrscheinlich hatte auch die schlechte Kondition der T-Zellen nach der Prästimulation einen grossen Einfluss auf die Resultate. Es kann aber auch sein, dass sie tatsächlich keinerlei Einfluss auf die Immunreaktion haben, wenn sie schon vor der Transplantation miteinander in Kontakt gekommen sind. Es ist noch zu erwähnen, dass die T-Zellproliferation der positiven Kontrolle (Stimulatorzellen der Wistar Ratte) bei der Prästimulation mit den Brown Norway LNSC etwa doppelt so hoch ist als bei der Kontrolle und der Prästimulation durch die Lewis Ratte. Dies kommt daher, dass die T-Zellen auf zwei verschiedene fremdartige Zellen reagieren. Zum einen werden die T-Zellen stimuliert durch allogene Antigene der LNSC von der Brown Norway Ratte und zum anderen durch allogene Antigene der Wistar Stimulatorzellen. Die T-Zellen proliferieren daher insgesamt mehr als bei der Kontrolle oder bei der Stimulation durch die LNSC der Lewis Ratte (denn diese besitzen keine fremden Antigene). Dieses Ergebnis zeigt, dass eine Prästimulation mit den

LNSC der Brown Norway Ratte weder die spenderspezifische noch die spenderunspezifische Immunreaktion hemmen kann [14].

In Experiment 2, wo die MLR direkt stattfand, war hingegen ein Unterschied zu erkennen. Wo die T-Zellen im Test (Stimulatorzellen der Brown Norway Ratte) bei der Stimulation durch die Lewis LNSC und bei der Kontrolle recht stark proliferierten, senkte sich die Proliferation bei der Stimulation durch die Brown Norway LNSC um etwa die Hälfte. Das bedeutet, dass die Brown Norway LNSC tatsächlich einen kleinen aber merkbaren positiven Effekt auf die Immunreaktion haben. Sie konnten in diesem Experiment nämlich die Proliferation um die Hälfte minimieren. Das heisst konkret, dass die Brown Norway LNSC spenderspezifisch (also bei den Brown Norway Stimulatorzellen) die Immunreaktion hemmen können. Dies ist ein vernünftiges Ergebnis, denn in dieser Kombination findet der Kontakt zwischen den Empfänger-T-Zellen und den Stimulatorzellen vom Spender direkt in der Gegenwart der LNSC des Spenders statt.

Interessant ist auch, dass die Proliferation bei der Stimulation durch die Brown Norway LNSC nicht bei den spenderspezifischen Stimulatorzellen sondern auch bei den Stimulatorzellen der dritten Partie (Wistar Ratte) etwa um die Hälfte gesunken ist. Das bedeutet, dass die Brown Norway LNSC nicht nur spenderspezifisch die Immunreaktion hemmen können, sondern dass sie auch die spenderunspezifische Immunreaktion verringern können [14].

4.3 Die Anzahl der Tregs in Bezug auf die LNSC

Ein weiterer wichtiger Punkt zur Interpretation der Auswirkungen von LNSC auf Handtransplantationen ist die Anzahl der Tregs. Die spenderspezifische Tregs fördern die Akzeptanz des Transplantats. Die beste Kombination aus Anzahl Tregs und T-Zellproliferation wäre also, wenn bei einer MLR die T-Zellproliferation deutlich gesunken und die Anzahl Tregs signifikant gestiegen wäre. Dann wäre ein deutlich positiver Effekt der Immunreaktion festzustellen, da die Reaktion selbst weniger stattfinden würde und zusätzlich die Toleranz gegenüber dem Transplantat gesteigert wäre.

In Experiment 1 konnte man tatsächlich eine Verbesserung der Anzahl Tregs erkennen. Im Test (Stimulatorzellen der Brown Norway Ratte) ist die Anzahl der Tregs bei der Prästimulation durch die Brown Norway LNSC um 2% angestiegen. Das würde bedeuten, dass die

Prästimulation durch die Brown Norway LNSC die Toleranzbildung durch die Tregs anregen würde. Doch es ist zu bezweifeln, dass die Tregs spenderspezifisch sind. Denn die Proliferation wurde durch die Prästimulation mit den Brown Norway LNSC nicht beeinflusst, das heisst, dass die Immunreaktion genau so stark stattgefunden hat wie ohne Prästimulation durch LNSC. Das deutet stark daraufhin, dass der Anstieg an Tregs eine andere Ursache hatte. Denn anders als die Proliferation der T-Zellen kann die Bildung von Tregs auch durch andere Zellen, wie zum Beispiel die LNSC oder einfach die T-Zellen, ausgelöst werden. Diese wären dann nicht toleranzfördernd gegenüber den Zellen des Transplantats, sondern gegenüber den anderen Zellen. Ausserdem steigt die Anzahl Tregs auch bei der positiven und der negativen Kontrolle an, was zusätzlich darauf hindeutet, dass diese Tregs nicht spenderspezifisch sind.

In Experiment 2 kam es sogar zu einer leichten Abnahme an Tregs. Die Anzahl der Tregs sank im Test bei der Stimulation durch die Brown Norway LNSC und die Lewis LNSC um fast die Hälfte. Bei der positiven Kontrolle jedoch stieg die Anzahl bei der Stimulation durch die Brown Norway LNSC und sank bei der Stimulation durch die Lewis LNSC im Vergleich zu der Kontrolle.

Das deutet in Kombination mit den Resultaten der T-Zellproliferation darauf hin, dass auch diese Schwankung der Anzahl an Tregs nichts mit der Transplantation selbst zu tun hat, sondern dass diese Tregs spenderunspezifisch sind und der Anstieg oder der Abfall an Tregs von anderen Zellen her kommt.

Die Anzahl Tregs ist also viel weniger entscheidend als die T-Zellproliferation, da sie von vielen verschiedenen Faktoren beeinflusst werden kann. Es war aber trotzdem wichtig, die Tregs auch zu untersuchen, denn falls die Ergebnisse deutlich auf spenderspezifische Tregs hingewiesen hätten, hätte dies zusätzlich bestätigt, dass die LNSC des Spenders einen positiven Effekt auf die Immunreaktion haben. Denn dies hätte bedeutet, dass die LNSC des Spenders nicht nur die Immunreaktion der T-Zellen verringern können, sondern dass sie zusätzlich eine Toleranz gegenüber dem Transplantat bilden können [14].

4.4 Überprüfung der Hypothesen

Die Hypothese, dass die Lymphknotenstromazellen der Brown Norway Ratte einen positiven Effekt auf die Abstossung des Transplantats haben könnte, wurde in Experiment 2 bestätigt. Für Experiment 1 trifft dies jedoch nicht zu. Die LNSC der Lewis Ratte (Empfängerratte) hat-

te in beiden Experimenten kaum Auswirkungen auf die Immunreaktion (weder positiv noch negativ).

Obwohl die Hypothese theoretisch bestätigt werden kann, ist man vom Ziel der Verhinderung einer Abstossung noch sehr weit entfernt. Es wurde zwar ein kleiner positiver Effekt der Brown Norway LNSC auf die Immunreaktion beobachtet, jedoch können die LNSC noch lange keine Transplantatabstossung verhindern. Das heisst, dass der Einsatz von LNSC des Spenders bei Handtransplantationen nun mit anderen Methoden wie beispielsweise der lokalen Immunsuppression kombiniert werden muss, um ein optimales Ergebnis zu erzielen.

4.5 Folgeversuche

Als nächstes muss das Experiment auf jeden Fall in vivo getestet werden. Das wurde mittlerweile sogar schon durchgeführt, und die Erkenntnisse der in-vitro-Experimente wurden in vivo bestätigt. Die Empfängerratten (Lewis Ratten), die unmittelbar vor der Transplantation einen Lymphknoten der Spenderratte (Brown Norway Ratte) eingesetzt bekommen hatten, haben das Transplantat über mehreren Wochen hinweg nicht abgestossen.

Als nächsten Schritt könnte man Kombinationen von den verschiedenen Methoden in vitro und anschliessend in vivo testen. Man könnte zum Beispiel das Einsetzen eines Spenderlymphknotens vor der Transplantation mit einer schwachen lokalen Immunsuppression verbinden.

Für eine weitere Maturaarbeit könnte das Thema Handtransplantation aber auch in einem ganz anderen Zusammenhang, beispielsweise auf einer ethischen Basis, behandelt werden. Man könnte sich die Frage stellen, ob es moralisch vertretbar ist, so viele Versuchstiere zu «missbrauchen», nur um eine Transplantation, die nicht einmal lebensrettend ist, zu ermöglichen. Oder ob ein Mensch mit einer transplantierten Hand mit dem Wissen, dass er die Hand eines Verstorbenen trägt, leben kann oder überhaupt möchte. Die Transplantationsmedizin generell wirft viele ethische und moralische Fragen auf, die auch in der Gesellschaft aktuell für viele Diskussionen sorgen. Dies ist aber eine andere Art der Behandlung des Themas und hätte deshalb den Rahmen dieser Maturaarbeit gesprengt.

5 Reflexion

Wenn ich auf den Entstehungsprozess meiner Arbeit und das Endprodukt zurückblicke, bin ich im Grossen und Ganzen zufrieden und auch stolz auf meine Arbeit. Zu Beginn war ich überfordert und wusste nicht, wie ich mit dem Schreiben beginnen soll. Auch während des Schreibens hatte ich oft das Gefühl, die Anforderungen einer naturwissenschaftlichen Arbeit nicht zu erfüllen oder falsch umzusetzen. Mit der Zeit wurde es jedoch leichter, vor allem als ich den Einleitungsteil fertig hatte. Denn alles Wissen des Theorieteils musste ich mir neu aneignen, was mir zwar Spass gemacht hat und mich sehr interessiert hat, aber auch viel Zeit gekostet hat. Es gefällt mir, dass ich anhand meiner Arbeit viel neues Wissen bezüglich Immunologie und Transplantationsmedizin erlangen konnte.

Auch den Aufenthalt im Labor war eine spezielle Erfahrung und sehr interessant für mich, da ich einen Einblick in das Leben eines Forschers oder eines Laboranten gewinnen konnte. Ich weiss noch, dass ich zu Beginn meiner Zeit im Labor etwas überfordert war mit der Thematik und all den angewandten Methoden. Auch dass im Labor ausschliesslich Englisch gesprochen wurde, bereitete mir anfangs Schwierigkeiten. Doch jetzt bin ich stolz und sehr dankbar, dass ich weiss, wie das Arbeiten im Labor funktioniert und dass ich moderne Methoden und Geräte dieser Forschung kennenlernen durfte.

Mit meinem Zeitmanagement bin ich jedoch weniger zufrieden. Denn eigentlich wollte ich nach den Sommerferien eine grobe erste Fassung der Arbeit zustande gebracht haben, hatte aber letztlich zu diesem Zeitpunkt erst die Einleitung fertig, obwohl ich circa drei Wochen Zeit zum Schreiben eingeplant hatte. Ich konnte zwar den Rückstand einigermaßen gut aufholen, hatte aber immer etwas Stress, weil ich wusste, was noch alles zu tun war. Denn ich unterschätzte auch den Gesamtaufwand, der sich mit der Zeit einfach summiert. Ich habe ausserdem wegen meinen mangelhaften Computerkenntnissen unnötig viel Zeit mit Formalem und der Formatierung der Arbeit verbracht. Für zukünftige Arbeiten werde ich jemanden um Hilfe bitten, der besser mit Computern umgehen kann und mir verschiedene Dinge bezüglich Formatierung vor und auch während dem Schreiben zeigen kann.

Bezüglich der spezifischen Forschung zum Thema Handtransplantation ist meine Meinung allerdings etwas zweigeteilt. Einerseits finde ich es beeindruckend, welche riesige und weltweite Forschung in Bern betrieben wird. Dass diese Forschung weltweit ist, merkt man auch daran, dass Menschen aus den verschiedensten Nationen in diesem Labor arbeiten.

Ich denke auch, dass das DBMR mit ihrer Forschung viel erreichen kann und dass die Forschung auf lange Sicht gesehen wirklich viel bewirken und ermöglichen kann. Ich finde auch, dass die Forschung zu einem guten Zweck betrieben wird. Doch es hatten sich während dem Schreiben meiner Arbeit auch einige Zweifel an der gesamten Forschung über Handtransplantationen entwickelt. Ich habe mich gefragt, ob es Sinn macht, jahrelange Forschung zu betreiben, um eine Transplantation ermöglichen zu können, die Menschen nicht das Leben rettet, sondern nur das Leben der Betroffenen verbessern soll. Nur schon den „Missbrauch“ von so vielen Versuchstieren regt ein gewisses Unbehagen in mir. Dann kommt noch hinzu, dass es schon Alternativen für Menschen, denen eine Hand fehlt, gibt. Beispielsweise Handprothesen. Zudem stiess ich auf Berichte, in welchen Leute mit einer transplantierten Hand erzählten, dass sie die Hand wieder abnehmen liessen, da sie nicht mit der Hand eines Toten leben konnten und es moralisch nicht mit sich vereinbaren konnten. Ich bin grundsätzlich immer für den medizinischen Fortschritt und will auch überhaupt nicht behaupten, dass ich gegen die Forschung zu Handtransplantationen bin (sonst hätte ich nicht dieses Thema gewählt), doch ich wollte einfach einige bedenkliche Aspekte, die mich während meiner Arbeit beschäftigt haben, auch erwähnen.

Doch grundsätzlich kann ich sagen, dass meine persönlichen Ziele und Anforderungen an die Arbeit erfüllt sind.

6 Quellenverzeichnis

6.1 Druck- und Onlinequellen

- [1] Wikipedia. Handtransplantation. <https://de.wikipedia.org/wiki/Handtransplantation>
- [2] Bilal Ben Brahim. Durchflusszytometrische Analyse bei einer gemischten Lymphozytenreaktion. Maturaarbeit Gymnasium Biel-Seeland, 2016
- [3] Adriano Taddeo. Introduction VCA Lymphatic System. DKF Bern, 2017
- [4] Navigator – Medizin. Opportunistische Infektionen. http://www.navigator-medizin.de/hiv_aids/die-wichtigsten-fragen-und-antworten-zu-hiv-aids/aids-begleiterkrankungen/opportunistische-infektionen-allgemein/462-was-sind-opportunistische-infektionen.html
- [5] Steve Parker. Der menschliche Körper. Dorling Kindersley, 2014
- [6] Valentina Schaller. New Perspective in Hand Transplantation, Local Delivered Immunosuppression in Vascularized Composite Allotransplantation. Maturaarbeit Kantonsschule Limmattal, 2016
- [7] Andrea Becker et al. Natura, Biologie für Gymnasien. Ernst Klett, Stuttgart/Leipzig 2012
- [8] Wikipedia. Apoptose. <https://de.wikipedia.org/wiki/Apoptose>
- [9] Wikipedia. Dendritische Zellen. https://de.wikipedia.org/wiki/Dendritische_Zelle
- [10] DocCheck Flexikon. Allogen. <http://flexikon.doccheck.com/de/Allogen>
- [11] DocCheck Flexikon. B-Lymphozyt. <http://flexikon.doccheck.com/de/B-Lymphozyt>
- [12] Wikipedia. Inhibitor. <https://de.wikipedia.org/wiki/Inhibitor>
- [13] DocCheck Flexikon. Endothelzelle. <http://flexikon.doccheck.com/de/Endothelzelle>
- [14] Adriano Taddeo, Murtenstrasse 50 Bern (DBMR), mündliche Überlieferung, April 2018
- [15] Mai Abdelhafez, Murtenstrasse 50 Bern (DBMR), mündliche Überlieferung, April 2018
- [16] U. Brügger et al. The health technology assessment of the compulsory achhident insurance scheme of hand transplantation in Switzerland. The Journal of Hand Surgery, November 2014
- [17] T. Gajanayake et al. A single localized dose of enzyme-responsive hydrogel improves long-term survival of a vascularized composite allograft. Science Translational Medicine, August 2014
- [18] Palmina Petruzzo et al. Report of the International Registry on Hand and Composite Tissue Allotransplantation. Current Transplantation Reports, Dezember 2017
- [19] Lauren Sompayrac. How the immune System works. John Wiley&Sons, 2016

[20] DocCheck Flexikon. Fibroblastische Retikulumzelle.

http://flexikon.doccheck.com/de/Fibroblastische_Retikulumzelle

[21] C. Colin Brinkman et al. Anatomy of Tolerance. Lippincott Williams & Wilkins, August 2013

[22] Wikipedia. Carboxylfluorescein succinimidyl ester.

https://en.wikipedia.org/wiki/Carboxyfluorescein_succinimidyl_ester

[23] Christoph Isenegger, Dorfstrasse 32b Luzern, schriftliche Mitteilungen, Sommer 2018

[24] DocCheck Flexikon. Medulla. <http://flexikon.doccheck.com/de/Medulla>

[25] Abul K. Abbas et al. Cellular and Molecular Immunology. Elsevier Saunders, Philadelphia 2015

6.2 Abbildungsverzeichnung

Abb. 1: Johns Hopkins Medicine. Comprehensive Transplant Centre.

https://www.hopkinsmedicine.org/transplant/programs/reconstructive_transplant/hand_transplant.html [Stand: Juli 2018]

Abb. 2: Nawitonic. Immunabwehr, Unspezifische und Spezifische Immunabwehr.

http://nawitonic.de/100_immuneresponse_basic_graphics.html [Stand: Juli 2018]

Abb. 3: Wikipedia. Antigen.

<https://en.wikipedia.org/wiki/Antigen> [Stand: August 2018]

Abb. 4 und Abb. 5: DocPlayer. Immunologie – Grundlagen.

<https://docplayer.org/24610429-Immunologie-grundlagen.html> [Stand: August 2018]

Abb. 6 und Abb. 7: Adriano Taddeo. Introduction VCA Lymphatic System. DKF Bern, 2017

Abb. 8: Biosiva. Transplantation.

<http://biosiva.50webs.org/imtr.htm> [Stand: August 2018]

Abb. 9 und Abb. 10: Adriano Taddeo. Introduction VCA Lymphatic System. DKF Bern, 2017

Abb. 11: Thermo Fisher Scientific. Superior Life-Cell Tracing, Generation after Generation.

<https://www.thermofisher.com/ch/en/home/references/newsletters-and-journals/bioprobes-journal-of-cell-biology-applications/bioprobes-70/celltrace-far-red-cell-proliferation-kit.html>

[Stand: August 2018]

Abb. 12: Janvier Labs. Inzuchtratten.

<https://www.janvier-labs.com/forschungsmodelle/per-arten/auszucht-ratten.html>

[Stand: August 2018]

Abb. 13: Information über Zellzählung. <http://www.lo-laboroptik.de/deutsch/info/info.html>
[Stand: August 2018]

Abb. 14: Cell Signaling Networks. Templates. <http://www.cellsignet.com/media/templ.html>,
bearbeitet [Stand: September 2018]

Abb. 15: Fotoaufnahme von Mira Maranta. April 2018, DBMR Bern.

Abb. 16: Grundlagen der Durchflusszytometrie. Uni Salzburg.

http://www.uni-salzburg.at/fileadmin/oracle_file_imports/2081233.PDF

[Stand: September 2018]

Abb. 17/18/19/20/21/22: Adriano Taddeo, Murtenstrasse 50 Bern (DBMR), Grafiken aus
einer PowerPoint Präsentation, bearbeitet.

Abb. 23/24/25: Adriano Taddeo Murtenstrasse 50 Bern (DBMR), Grafiken aus einer Power-
Point Präsentation, bearbeitet.

Abb. 26/27/28/29: Adriano Taddeo Murtenstrasse 50 Bern (DBMR), Grafiken aus einer
PowerPoint Präsentation, bearbeitet.

Titelbild: mikrosiopisch analysierte LNSC nach der Prästimulation mit T-Zellen. Mai Abdel-
hafez, Murtenstrasse 50 Bern (DBMR), Bilddateien per E-Mail, bearbeitet.

7 Danksagung

Zuerst möchte ich mich gerne bei meinem Betreuer Herr Isenegger bedanken, der mir während dem ganzen Entstehungsprozess meiner Arbeit immer mit Rat und Tat zur Seite stand. Ich schätzte es sehr, dass er immer gut erreichbar war, mir auf dringende Anliegen oder Fragen eine rasche Antwort gab und dass er sich auch für meine Arbeit interessierte.

Einen riesigen Dank gilt natürlich dem DBMR Bern und Dr. Prof. Robert Rieben. Ich bin sehr dankbar, dass ich die Möglichkeit hatte, in diesem professionellen Labor mit all diesen speziellen Geräten und den Rattenzellen Versuche durchführen zu können.

Doch den noch grösseren Dank geht an Dr. Adriano Taddeo und Mai Abdelhafez, die mich während dem zweiwöchigen Aufenthalt im Labor des DBMR betreut haben und mir auch während der Schreibphase sehr geholfen haben. Sie haben nie die Geduld verloren und haben meine Fragen (auch wenn sie bestimmt manchmal nervig waren) immer verständlich beantwortet. Ich hätte mir keine bessere Betreuung vorstellen können!

Ausserdem bedanke ich mich bei Pascal Bösch für das Korrekturlesen. Ebenso möchte ich meinem Götti, Stefan Fischer, für den Druck der Arbeit danken.

8 Glossar

allogen

«anderswo entstanden», beispielsweise ein Organ eines anderen Menschen [10]

Apoptose

eine Art «Selbstzerstörungsprogramm» einer Zelle [8]

CFSE

= Carboxyfluorescein-Succinimidylester. CFSE ist ein fluoreszierender Zellfärbestoff, der in die Zelle eindringen kann. Anhand der Succinimidylgruppe kann CFSE eine kovalente Bindung zu intrazellulären Molekülen aufbauen [22]

dendritische Zellen

sind verwandt mit T- und/oder B-Zellen, präsentieren und erkennen Antigene [9]

Endothelzellen

Zellen, die im Inneren von Gefäßwänden auftreten. Sie konstruieren eine «regulierbare Barriere zwischen dem Blutgefäß und dem Extravasalraum» [13]

Fibroblastische retikuläre Zellen

spezifische Art von Retikulumzellen, die in retikulärem Bindegewebe vorkommen. Sie sind verantwortlich für den Aufbau von der extrazellulären Matrix [20]

fixierbarer Viabilitätsfarbstoff

Farbstoff, der nur in lebende Zellen eindringt und somit die lebensfähigen Zellen kennzeichnet [15]

FoxP3-A450

Zelltypmarker, der intrazellulär wirkt. Erkennt Tregs anhand des Transkriptionsfaktors [15]

Helios-PE

Zelltypmarker, der intrazellulär wirkt. Bindet an ein bestimmtes Antigen von Tregs [15]

homolog

einheitlich, im Text auf die Gewebetypen bezogen

humorale Abwehr

antikörpervermittelte Abwehr [5]

Inhibitoren

Stoffe, die chemische Vorgänge hemmen oder sie sogar ganz verhindern [12]

in vitro

Unter künstlichen Bedingungen ausserhalb eines Organismus [23]

in vivo

das Experiment findet innerhalb des lebenden Organismus statt [15]

Makrophagen

Leukozyten, erkennen körperfremde Zellen [6]

Mercaptoethanol

farblose Flüssigkeit mit einer Hydroxygruppe und einer Mercaptogruppe. Sie kann Wachstum und Differenzierung in Zellkulturen fördern [15]

monoklonale Antikörper

Antikörper von einer bestimmten Sorte (sortenreine Antikörper) [7]

opportunistische Infektionen

eine Infektion, die durch Krankheitserreger entstanden ist die den durch eine Primärkrankheit geschwächten Körper befallen haben und die Infektion ausgelöst haben [4]

PBS Puffer

dieser Puffer wird zur Waschung von Zellen nachdem sie mit anderen Stoffen in Kontakt kamen [15]

Permeabilisierungsfixierlösung

fixiert die intrazellulären Zelltypmarker in der Zelle [15]

Permeabilisierungspuffer

Puffer, der Löcher in die Zelloberfläche macht, sodass die intrazellulär wirkenden Zelltypmarker in die Zelle eindringen können [15]

polymorph

die Moleküle besitzen viele verschiedene Allele (Ausprägungsformen) [2]

Proliferation

Zellteilung, nachdem die Lymphozyten ein fremdes Antigen erkannt haben [6]

9 Anhang

Versuchsprotokoll Mai Abdelhafez, DBMR Bern

Mixed lymphocyte reaction pre- (Exp.1) and co-stimulated (Exp.2) with lymph node stromal cells

On Tuesday 03.04.2018

1. Medium preparation:

- 1.1. Prepare the **cell culture medium** by mixing:
 - 1.1.1. Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) cat. No 31330-038 GIBCO DMEM /F-12 (1:1)
 - 1.1.2. 10 % Fetal Bovine Serum (Superior - F0615 Biochrom) – E406.1, -20°C bottom left shelf – 50mL aliquots in Falcon tubes
 - 1.1.3. 1% Penicillin streptomycin (P/S): P/S GIBCO Cat No 1542-122. (5 ml aliquots at -20°C). Catalogue Number: SLGP033NK
 - 1.1.4. 1% L-glutamine (5 ml aliquots at -20°C).
- 1.2. Prepare the **MLR-medium** you need. For 50 mL:
 - 1.2.1. 50 mL medium
 - 1.2.2. 2-ME stock solution final concentration 0.05 mM (50 µL from 50mM stock, GIBCO, 31350-010)

2. Culture LNSC from naive Lewis and Brown Norway rats:

- 2.1. Get LNSC which have been isolated from naive rats lymph nodes (Brown Norway and Lewis rats) from -150°C, thaw till a small ice chunk is left.
 - 2.2. Transfer to a 15 mL tube prefilled with 9 mL culture medium, on ice.
 - 2.3. Spin down 5' at 300x g to wash away the DMSO. Re-suspend the cells with culture medium.
 - 2.4. Pipet 10 µl of cells in an Eppendorf tube + 10 µl of Trypan blue (0,04%) (1:1 dilution)
 - 2.5. Transfer 10 ul to the countess cell counting chamber slides
 - 2.6. Count as described. Cell count = average of cell number in 2 squares X 10⁴ X 2.
- In 6-well plate: Seed 5x10⁵ cells into each well (prepare 2 wells for Lewis LNSC and 2 wells for BN LNSC).
- 2.7.
 - 2.8. Incubate at 37°C, 5% CO₂ overnight.

On Wednesday 04.04.2018

3. Spleenocytes ISOLATION

- 3.1. Get spleenocytes which have been isolated from naive Lewis rat spleen (**responders**) from -150°C, thaw till a small ice chunk is left.
- 3.2. Transfer to a 15 mL tube prefilled with 9 mL culture medium, on ice.
- 3.3. Spin down 5' at 300x g to wash away the DMSO.
- 3.4. Re-suspend the cells in 1 mL cell culture medium.
- 3.5. Pipet 10 µl of cells in an Eppendorf tube + 30 µl of Trypan blue (0,04%) (1:3 dilution)
- 3.6. Transfer 10 µl to the countess cell counting chamber slides
- 3.7. Count as described. Cell count = average of cell number in 2 squares X 10⁴ X 4.
- 3.8. Cell number results from see lab book p.70.

3.9. Take 50 μ L sample from unsorted **responder** cells for staining.

4. Magnetic isolation of T-cells from Lewis spleenocytes (responder cells)

- 4.1. Use the Pan T Cell MicroBeads rat kit (Miltenyi Biotec, 130-090-320).
- 4.2. Follow the instruction provided by the manufacturer.
- 4.3. Keep all the kit material on ice or inside the refrigerator before use.
- 4.4. Buffer: 1x PBS, 0.5% BSA and 2mM EDTA. Sterile filter it and keep at 4°C.
- 4.5. Use Column (MS columns, MACS, cat: 130-042-201, lot: 5171017103, exp.: 16.10.2020) and filter (pre-separation filter (30 μ m), MACS, cat: 130-041-407, lot: 5170915030, exp: 18.09.2020).

4.6. Take 50 μ L sample from the negative fraction and the sorted cells for staining.

5. PROLIFERATION TRACKING

- 5.1. Re-suspend the **responder cells** in 2 mL of PBS
- 5.2. Add at the top of the tube wall 2 μ L of 5mM stock solution of CellTrace CFSE (final working concentration 5 μ M). Immediately close the tube and vortex.
- 5.3. Incubate 5 min at RT protected from light, mixing from time to time to allow a uniform distribution of the colorant
- 5.4. Wash by adding an excess of culture medium at room temperature
- 5.5. Centrifuge 300x g for 5 min.
- 5.6. Wash using fresh media for 1x.
- 5.7. Pipet 10 μ l of cells in an Eppendorf tube + 10 μ l of Trypan blue (0,04%) (1:1 dilution)
- 5.8. Transfer 10 ul to the countess cell counting chamber slides
- 5.9. Count as described and resuspend in the right volume to have 5×10^5 cells/ 2 mL **in cell culture medium.**

6. Pre-stimulation of responder cells with LNSC

- 6.1. Add 2mL (5×10^5 cells) of sorter T-cells (**responders**) to have 1:1 cell ratio on LNSC (from 2.7) as the follow:

BN LNSC	BN LNSC	No cells
Lewis LNSC	Lewis LNSC	No cells

- 6.2. Incubate for 2 days at 37°C.

On Thursday 05.04.2018

7. Culture of Lewis naive LNSC

- 7.1. Get LNSC which have been isolated from naive rats lymph nodes (Lewis rats) from -150°C, thaw till a small ice chunk is left.
- 7.2. Transfer to a 15 mL tube prefilled with 9 mL culture medium, on ice.
- 7.3. Spin down 5' at 300x g to wash away the DMSO. Re-suspend the cells with 1 mL culture medium.
- 7.4. Pipet 10 μ l of cells in an Eppendorf tube + 10 μ l of Trypan blue (0,04%) (1:1 dilution)
- 7.5. Transfer 10 ul to the countess cell counting chamber slides
- 7.6. Count as described. Cell count = average of cell number in 2 squares X 10^4 X 2. Cell count = 1.3×10^6 Cells. Add 300 μ l cell culture media to have final cell concentration 10^5 cells/ 100 μ l.

- 7.7. In 96-well plate: Add 200 μl into each well to have 2×10^5 cells (prepare 3 wells for Lewis LNSC). Incubate at 37°C , 5% CO_2 for at least 3 hours.
- 7.8. Culture the rest (700 μl) into 2 wells of 6 well-plate.
- 7.9. Incubate at 37°C , 5% CO_2 overnight.

8. Spleenocytes ISOLATION

- 8.1. Get spleenocytes which have been isolated from naive rats spleen (Wister, Brown Norway (**stimulators**) and Lewis rats (**responders**)) from -150°C , thaw till a small ice chunk is left.
- 8.2. Transfer to a 15 mL tube prefilled with 9 mL culture medium, on ice.
- 8.3. Spin down 5' at 300x g to wash away the DMSO.
- 8.4. Re-suspend the cells in 1 mL cell culture medium.
- 8.5. Pipet 10 μl of cells in an Eppendorf tube + 90 μl of Trypan blue (0,04%) (1:10 dilution)
- 8.6. Transfer 10 μl to the countess cell counting chamber slides
- 8.7. Count as described. Cell count = average of cell number in 2 squares $\times 10^4 \times 10$.
- 8.8. Cell number BN = $51 \times 10^4 \times 10 = 5.1 \times 10^6$ Cells
Lewis = $434 \times 10^4 \times 10 = 43.4 \times 10^6$ Cells
Wister = $127.5 \times 10^4 \times 10 = 12.75 \times 10^6$ Cells

9. Irradiation of BN and Wister spleenocytes (**stimulator cells**)

- 9.1. Add 5mL cold culture media (forgotten- cells were only suspended in 1 mL ice cold medium) to the Wister, Brown Norway spleenocytes (**stimulators**) and irradiate cells at 3000cGy, 30Gy (39 min and 1sec).
 - Mu35, B-flour, Pin for the lock: 126. Take the yellow key and GC40 key.
 - Insert the GC40 key in the irradiator.
 - User ID: 20299
 - Pin code: 20299
 - At the bottom of the sample chamber the dose rate is 2.79 Gy/min.
- 9.2. Wash your cells 1x with fresh medium, be gentle, they are dizzy.
- 9.3. Re-suspend in the right volume to have 2×10^5 cells/100 μL in MLR medium. **Keep on ice.**

10. Magnetic isolation of T-cells from Lewis spleenocytes (**responder cells**)

- 10.1. Use the Pan T Cell MicroBeads rat kit (Miltenyi Biotec, 130-090-320).
- 10.2. Follow the instruction provided by the manufacturer.
- 10.3. Keep all the kit material on ice or inside the refrigerator before use.
- 10.4. Buffer: 1x PBS, 0.5% BSA and 2mM EDTA. Sterile filter it and keep at 4°C .
- 10.5. Use Column (MS columns, MACS, cat: 130-042-201, lot: 5171017103, exp.: 16.10.2020) and filter (pre-separation filter (30 μm), MACS, cat: 130-041-407, lot: 5170915030, exp: 18.09.2020).
- 10.6. Spin down 5' at 300x g.
- 10.7. Re-suspend the cells in 1 mL cell culture medium.
- 10.8. Pipet 10 μl of cells in an Eppendorf tube + 10 μl of Trypan blue (0,04%) (1:1 dilution)
- 10.9. Transfer 10 μl to the countess cell counting chamber slide. Cell count = average of cell number in 2 squares $\times 10^4 =$ Ask Mira.
- 10.10. Split into 2, the first half used for proliferation tracking (see next step).

- 10.11. and the other half spun down and re-suspended in culture medium (2 mL) + 0.2 µl IL-2 (250000 U/mL, 0.1 mg/mL, MACS, cat: 130-094-121, lot: 5180216159, exp.: 20.05.2019) for Friday 06.04.2018.

11. PROLIFERATION TRACKING

- 11.1. Re-suspend the **responder cells** in 2 mL of PBS
 11.2. Add at the top of the tube wall 2 µL of 5mM stock solution of CellTrace CFSE (final working concentration 5 µM). Immediately close the tube and **vortex**.
 11.3. Incubate 5 min at RT protected from light, **mixing from time to time to allow a uniform distribution of the colorant**.
 11.4. Wash by adding an excess of culture medium at room temperature 1x.
 11.5. Centrifuge 300x g for 5 min.
 11.6. Re-suspend in the right volume to have 2×10^5 cells/ 100 µl **in cell culture medium**.

12. MLR

- 12.1. Use the 96 well-plate that have been prepared in the morning (7.1-7.7).
 12.2. Add 100 µL of **responder cells** to all wells then add the corresponding **stimulators** to have a 1:1:1 ratio (2×10^5 : 2×10^5 : 2×10^5 , LNSC: **responders: stimulators**)
 12.3. Transfer in incubator for 5 days. **Continue on Tuesday 10.04.2018**
 12.4. On day 2-3 add 50 µL of MLR medium per well?? **Not done**

Experiment 2:

	Negative control	Test	Positive control
Test	Lewis LNSC + 200 µl Responder cells (Lewis T cells) + 200 µl MLR medium	Lewis LNSC + 200 µl Responder cells (Lewis T cells) + 200 µl BN stimulator	Lewis LNSC + 200 µl Responder cells (Lewis T cells) + 200 µl Wister stimulator
Control	No Lewis LNSC: 200 µl Responder cells (Lewis T cells) + 200 µl MLR medium	No Lewis LNSC: 200 µl Responder cells (Lewis T cells) + 200 µl BN stimulator	No Lewis LNSC: 200 µl Responder cells (Lewis T cells) + 200 µl Wister stimulator

On Friday 06.04.2018

13. Sampling and preparing of Lewis T-cells (**responders**)

- 13.1. Draw all the supernatant containing T cells from **step 6** for **experiment 1** (poll T cell pre stimulated with each type of LNSC together). Into 15 mL falcon tube, label as: Lewis T-cells pre stimulated with BN LNSC or Lewis T-cells pre stimulated with Lewis LNSC or Lewis T-cells negative stimulation.
 13.2. Add to 1 mL PBS. Mix well and **sample 100 µl for staining**.
 13.3. **Draw 100 µl of T-cell suspension from 10.11 after well mixing for FACS staining**. Transfer the rest into 15 mL falcon tube (Label as: T-cell, Exp 2).

- 13.4. Spin 300x g for 5 min and re-suspend into 2 mL sterile 1x PBS (continue with step 17).

14. Culture of BN naive LNSC

- 14.1. Use BN LNSC from experiment 1 after removal of T-cells (steps 13.1).
- 14.2. Wash each of the wells (both Lewis and BN LNSC) as well as wells from (7.8) with 2 mL pre warmed sterile 1x PBS. Discard the PBS.
- 14.3. Add 0.6 mL pre warmed 0.5% Trypsin/5 mM EDTA. Incubate for 2 min at 37 °C. Check the detachment of the cells if necessary leave for one more minute.
- 14.4. Stop the reaction by adding 1 mL **ice-cold medium** in each well and wash the wells to ensure the detachment of all the cells.
- 14.5. Transfer and pool similar wells into a 15 mL tube prefilled with 9 mL culture medium, on ice.
- 14.6. Spin down 5' at 300x g to wash away Trypsin. Re-suspend the BN LNSC with 1 mL culture medium.
- 14.7. Pipet 10 µl of BN LNSC in an Eppendorf tube + 10 µl of Trypan blue (0,04%) (1:1 dilution)
- 14.8. Transfer 10 µl to the countess cell counting chamber slides
- 14.9. Count as described. Cell count = average of cell number in 2 squares X 10⁴ X 2. Cell count = 29.5 x 10⁴ x2 = 5.9 x 10⁵ Cells.
- 14.10. Spin down 5' at 300x g to wash away Trypsin. Re-suspend the BN LNSC with 0.6 mL culture medium.
- 14.11. In 96-well plate: Add 200 µl into each well to have almost 2x10⁵ cells (prepare 3 wells for Lewis LNSC). Incubate at 37°C, 5% CO₂ for at least 3 hours. To be used in step 18.
- 14.12. Re-suspend Lewis LNSC from step 14.6 into 900 µl HI FBS and add 100 µl DMSO transfer directly into -80 °C and into -150 °C on Monday 09.04.2018 (170/13/box 9 from up/ position 64 and 65).

15. Spleenocytes ISOLATION

- 15.1. Get spleenocytes which have been isolated from naive rats spleen Wister and Brown Norway (**stimulators**) from -150°C, thaw till a small ice chunk is left.
- 15.2. Transfer to a 15 mL tube prefilled with 9 mL culture medium, on ice.
- 15.3. Spin down 5' at 300x g to wash away the DMSO.
- 15.4. Re-suspend the cells in 1 mL cell culture medium.
- 15.5. Pipet 10 µl of cells in an Eppendorf tube + 90 µl of Trypan blue (0,04%) (1:10 dilution)
- 15.6. Transfer 10 µl to the countess cell counting chamber slides
- 15.7. Count as described. Cell count = average of cell number in 2 squares X 10⁴ X 10.
- 15.8. Cell number BN = 328 X 10⁴ X 10 = 32.8 x 10⁶ Cells
Wister = 95 X 10⁴ X 10 = 9.5 x 10⁶ Cells

16. Irradiation of BN and Wistar spleenocytes (stimulator cells**)**

- 16.1. Add 5mL cold culture media to the Wistar, Brown Norway spleenocytes (**stimulators**) and irradiate cells at 3000cGy, 30Gy (39 min and 1sec).
- Mu35, B-flour, Pin for the lock: 126. Take the yellow key and GC40 key.
 - Insert the GC40 key in the irradiator.
 - User ID: 20299
 - Pin code: 20299
 - At the bottom of the sample chamber the dose rate is 2.79 Gy/min.
- 16.2. Wash your cells 1x with fresh medium, be gentle, they are dizzy.

- 16.3. Re-suspend in the right volume to have 2×10^5 cells/100 μ L in **MLR medium**.
Keep on ice.

17. PROLIFERATION TRACKING

- 17.1. Continue from step 13.4
 17.2. Add at the top of the tube wall 2 μ L of 5mM stock solution of CellTrace CFSE (final working concentration 5 μ M). Immediately close the tube and **vortex**.
 17.3. Incubate 5 min at RT protected from light, **mixing from time to time to allow a uniform distribution of the colorant**.
 17.4. Wash by adding an excess of culture medium at room temperature 1x.
 17.5. Centrifuge 300x g for 5 min.
 17.6. Re-suspend **experiment 1** tubes into 0.5 mL MLR medium and **experiment 2** tube into 1.5 mL MLR medium.
 17.7. Pipet 10 μ L of cells in an Eppendorf tube + 10 μ L of Trypan blue (0,04%) (1:1 dilution)
 17.8. Transfer 10 μ L to the countess cell counting chamber slides
 17.9. Count as described.
 17.10. Negative stimulation T-cells cell count = $12 \times 10^4 \times 2 = 2.4 \times 10^5$ cells / 0.5 mL.
 BN LNSC stimulated T-cells cell count = $5 \times 10^4 \times 2 = 10^5$ cells / 0.5 mL
 Lewis LNSC stimulated T-cells cell count = $8 \times 10^4 \times 2 = 1.6 \times 10^5$ cells / 0.5 mL
 17.11. T-cell, **Exp 2** cell count = $23.25 \times 10^4 \times 2 \times 1.5 = 6.97 \times 10^5$ cells / mL
 17.12. **Note: number of T-cells were much less than expected**

18. MLR

- 18.1. Use the 96 well-plate that have been prepared in the morning (14.10).
 18.2. Add 100 μ L of **responder cells (from 17.11)** to all wells then add the corresponding **stimulators (16.3)** to have a 1:1:1 ratio (2×10^5 : 2×10^5 : 2×10^5 , LNSC: responders: stimulators).
 18.3. Transfer in incubator for 5 days. **Continue on Wednesday 11.04.2018**
 18.4. On day 2-3 add 50 μ L of MLR medium per well?? **Not done**

Experiment 2:

	Negative control	Test	Positive control
Test	BN LNSC + 100 μL Responder cells (Lewis T cells) + 100 μ L MLR medium	BN LNSC + 100 μL Responder cells (Lewis T cells) + 100 μ L BN stimulator	BN LNSC + 100 μL Responder cells (Lewis T cells) + 100 μ L Wistar stimulator
Control	No BN LNSC: 100 μL Responder cells (Lewis T cells) + 100 μ L MLR medium	No BN LNSC: 100 μL Responder cells (Lewis T cells) + 100 μ L BN stimulator	No BN LNSC: 100 μL Responder cells (Lewis T cells) + 100 μ L Wistar stimulator

- 18.5. Use U- shape bottom 96 well-plate to prepare experiment 1 MLR.
 18.6. Add equal cell count from both the **responders (17.10)** and **stimulator (16.3)** to each well to have a 1:1:1 ratio (2×10^5 : 2×10^5 : 2×10^5 , LNSC: **responders: stimulators**).

Experiment 1:

	Negative control	Test (BN)	Positive control (Wistar)
Test 1 Lewis pre	170 µl Responder cells (Lewis T cells) + 30 µl MLR medium	170 µl Responder cells (Lewis T cells) + 12.5 µl BN stimulator	170 µl Responder cells (Lewis T cells) + 25 µl Wistar stimulator
Test 2 BN pre	170 µl Responder cells (Lewis T cells) + 30 µl MLR medium	170 µl Responder cells (Lewis T cells) + 7.5 µl BN stimulator	170 µl Responder cells (Lewis T cells) + 15 µl Wistar stimulator
Control	170 µl Responder cells (Lewis T cells) + 30 µl MLR medium	170 µl Responder cells (Lewis T cells) + 20 µl BN stimulator	170 µl Responder cells (Lewis T cells) + 40 µl Wistar stimulator

19. Immunophenotyping and Detection of proliferation

- 19.1. On day 5:Collect the cells and transfer in FACS tube
 19.2. Wash with 1mL PBS
 19.3. Spin down 5` @1500rpm and discard supernatant.
 19.4. Add 0.5 µL of Fixable viability dye per tube, vortex.
 19.5. Incubate 15`@ 4°C. Wash with 1.9mL, spin down 5` @1500rpm and discard supernatant.
 19.6. Stain the cells with Ab`s as follows :
 ▪ CD4 APC-Cy7 - 0.13 µL (Bio Legend, 201518)
 ▪ CD8 PE-Cy7 – 1 µL (Miltenyi Biotec – Ref: 130-102-685),
 ▪ CD3 PerCP - 1 µL (Miltenyi Biotec – Ref: 130-102-674),
 19.7. Vortex, incubate 15`@ 4°C.
 19.8. Wash with 1.9mL, spin down 5` @1500rpm and discard supernatant.
 19.9. Add 500 µL of Fixation/Permeabilization solution (prepared diluting 1:4 the concentrate in diluent), vortex, incubate 30`@ RT in the dark.
 19.10. Wash with 1.9mL (as much as fits) of permeabilization buffer (1:10 in qH2O)
 19.11. Vortex, spin down 5` @1500rpm and discard supernatant.
 19.12. Add 0.25 µL of FoxP3-A450 (v- eBioscience – Ref: 48-5773-82) and 2 µL of Helios-PE (Miltenyi Biotec – Ref: 130-104-001), vortex, incubate 30`@ RT in the dark.
 19.13. Add 1.9mL mL permeabilization buffer, vortex, centrifuge 1500 rpm, 5', discard supernatant.
 19.14. Acquire using Flow cytometer and analyze using the proliferation tool of the program FlowJo

10 Deklaration

„Ich erkläre hiermit,

- dass ich die vorliegende Arbeit selbständig und nur unter Benutzung der angegebenen Quellen verfasst habe,
- dass ich auf eine eventuelle Mithilfe Dritter in der Arbeit ausdrücklich hinweise,
- dass ich vorgängig die Schulleitung und die betreuende Lehrperson informiere, wenn ich diese Maturaarbeit, bzw. Teile oder Zusammenfassungen davon veröffentlichen werde, oder Kopien dieser Arbeit zur weiteren Verbreitung an Dritte aushändigen werde.“

Ort: Sursee

Datum: 10.10.2018

Unterschrift: